

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***MICROCOCCUS LUTEUS* METABOLİTLERİNİN *HELICOBACTER*
PYLORI'NİN KOKOİD FORMU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Didem AKTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Melahat BAĞIROVA

Temmuz, 2019

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***MICROCOCCUS LUTEUS* METABOLİTLERİNİN, *HELICOBACTER*
PYLORI'NİN KOKOİD FORMU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Didem AKTAŞ tarafından hazırlanan tez çalışması 22.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğretim Üyesi Melahat BAĞIROVA

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Jüri Üyeleri

Dr. Öğretim Üyesi Melahat BAĞIROVA, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Bekir Sami KOCAZEYBEK, Üye

İstanbul Üniversitesi

Danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Mekahat BAĞIROVA sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "*Micrococcus luteus* metabolitlerinin *Helicobacter pylori*'nin kokoid formu üzerindeki etkisinin incelenmesi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim

Didem AKTAŞ

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün TYL-2018-3326 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca geniş bilgi birikimi, yol göstericiliği ve tecrübesiyle çalışmam süresince değerli katkılarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Melahat BAĞIROVA'ya ve her zaman yanımda olan saygıdeğer hocalarım Sayın Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e ve ayrıca gerek çalışma sırasında gerekse tez yazımı sırasında gösterdiği ilgi ve destekten dolayı Sayın Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a,

Tezimin değerlendirilmesinde önemli katkıları bulunan Sayın Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e ve hem tezimin değerlendirilmesinde hem de kültür çalışmalarında kullanılan klinik *H. pylori* suşlarının temininde Sayın Prof. Dr. Bekir Sami KOCAZEYBEK'e,

Tez çalışmamın yürütülmesi için maddi destek sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Ayrıca deneysel çalışmalarda kullanılan *H. pylori* suşunun temininde önemli katkıları olan Sayın Prof. Dr. Betigül ÖNGEN'e,

Deneylerimin yapılması sırasında bilgi ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Gamze TARI, Tural SAFAROV, Etkin PARLAR, Umut OĞLUOĞLU, Sahar DİNPARVAR, Atıf Can DEMİRCİOĞLU ve Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı öğrencilerinin her birine,

Bölümümüzün kurulmasında emekleri geçen Prof. Dr. Mustafa AKDESTE ve Prof. Dr. Huriye KUZU'ya, bölümümüzün değerli bölüm başkanı, öğretim üyeleri ve asistanlarına, Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına ve Fen Bilimleri Enstitüsüne, Bana tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan ve beni destekleyen sevgili annem Zuhal SARİKA'ya, kardeşlerim Gizem AKTAŞ, Pelin AKTAŞ, Selin KARAKURT ve eniştem Bahadır KARAKURT'a ve bütün aileme,

Ve "Bilim gerçeği bilmektir. Hayattaki en hakiki mürşit, ilimdir." Sözleriyle bilime olan sevgimin ve bağlılığımın temelini oluşturan, görüşleri ile bana her daim yol gösteren Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Didem AKTAŞ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ.....	X
KISALTMA LİSTESİ	XI
ŞEKİL LİSTESİ	XII
TABLO LİSTESİ.....	XV
ÖZET	XVI
ABSTRACT.....	XIX
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez.....	4
2 GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 <i>Helicobacter pylori</i>	6
2.1.1 <i>Helicobacter pylori</i> ve Kısa Tarihçesi.....	6
2.1.2 <i>Helicobacter pylori</i> Morfolojik ve Karakteristik Özellikleri	6
2.1.3 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Dünyadaki ve Türkiye'deki Prevelansı	9
2.1.4 <i>Helicobacter pylori</i> Bulaşma Yolları	10
2.1.5 <i>Helicobacter pylori</i> ve Neden Olduğu Hastalıklar	12
2.1.6 <i>Helicobacter pylori</i> Tanı Yöntemleri	16
2.1.7 <i>Helicobacter pylori</i> Tedavi Yöntemleri	21
2.1.8 Antibiyotik Tedavisi Başarısızlığının Nedenleri, Antibiyotik Etki ve Direnç Mekanizmaları	24
2.1.9 <i>Helicobacter pylori</i> Kokoid Formu ve Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişki	33

2.1.10	<i>Helicobacter pylori</i> ve Canlı Fakat Kültürde Üretilmeyen Bakteri Sınıfı.....	34
2.1.11	<i>Helicobacter pylori</i> Kokoid Formunun Genel Özellikleri	36
2.1.12	<i>Helicobacter pylori</i> Spiral Formdan Kokoid Forma Dönüşümü sırasında Meydana Gelen Değişiklikler	37
2.1.13	<i>Helicobacter pylori</i> Kokoid Formu Oluşumunu Etkileyen Faktörler	38
2.1.14	<i>Helicobacter pylori</i> Kokoid Formunun İnfektivitesi	41
2.2	<i>Micrococcus luteus</i>	43
2.2.1	<i>Micrococcus luteus</i> Hakkında Genel Bilgiler.....	43
2.2.2	<i>Micrococcus luteus</i> ve Resusitasyon Promatör Faktör.....	44
2.2.3	Resusitasyon Promatör Faktör ve Lokalizasyonu.....	45
2.3	Resusitasyon	46
2.3.1	<i>Helicobacter pylori</i> ve Kokoid Formunun Resusitasyon Çalışmaları	46
2.3.2	Resusitasyon Promatör Faktör ile Gerçekleştirilen Resusitasyon Çalışmaları	46
3	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	48
3.1	Materyal.....	48
3.1.1	Ekipman	48
3.1.2	Kimyasallar.....	50
3.1.3	Deneylerde Kullanılan Tampon, Besiyerleri, Antibiyotikler ve Kimyasalların Hazırlanışı.....	52
3.1.3.1	Tamponlar	52
3.1.3.2	Besiyerleri	52
3.1.3.3	Antibiyotikler	53
3.1.3.4	Kimyasallar ve Solüsyonlar	54
3.1.3.4.1	Bradford Reaktifi.....	54

3.1.3.4.2 SDS-PAGE Solüsyonları.....	54
3.1.3.4.3 SEM Analizi Fiksasyon Solüsyonu	55
3.1.3.5 Deneylerde Kullanılan Bakteri Suşları	56
3.2 Metod.....	56
3.2.1 <i>Helicobacter pylori</i> Deneysel Çalışmalar	56
3.2.1.1 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Kriyobanktan Çıkarılması ve Kriyoprezervasyonu	56
3.2.1.2 <i>Helicobacter pylori</i> Devamlı Kültürünün Yapılması	57
3.2.1.3 <i>Helicobacter pylori</i> Karakteristik Özelliklerin Belirlenmesi ..	57
3.2.1.4 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Kokoid Formlarının Oluşturulması ve Görüntülenmesi	58
3.2.2 <i>Micrococcus luteus</i> Deneysel Çalışmalar	60
3.2.2.1 <i>Micrococcus luteus</i> Devamlı Kültürünün Yapılması ve Kriyoprezervasyonu	60
3.2.2.2 <i>Micrococcus luteus</i> Büyüme Eğrisinin Çıkarılması.....	60
3.2.2.3 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimini İçeren Metabolitlerin Üretimi ve Karakterizasyonu	61
3.2.3 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimi İçeren Metabolitlerin Karakterizasyonu	62
3.2.3.1 Bradford Protein Tayin Yöntemi	62
3.2.3.2 SDS-PAGE Analizi ile Boyut Analizi	63
3.2.4 Resusitasyon Promatör Faktörleri İçeren <i>Micrococcus luteus</i> Ekstrasellüler Metabolitlerinin <i>Helicobacter pylori</i> Kokoid Formlarının Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi	64
3.2.4 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimini İçeren Metabolitin <i>Helicobacter pylori</i> Kokoid Formu Üzerindeki Resusitasyon Etkisinin Kontrolü.....	66

4 DENEYSEL SONUÇLAR	67
4.1 <i>Helicobacter pylori</i> ve Elde Edilen Deneysel Çalışma Sonuçları.....	67
4.1.2 <i>Helicobacter pylori</i> Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi	67
4.1.2 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Spiral Formlarının Kokoid Forma Dönüştürülmesi	69
4.1.2.1 Beş Farklı Koşulda İnoküle Edilen <i>Helicobacter pylori</i> Bakterilerinin Zamana Bağlı Total Bakteri Sayıları	70
4.1.3 Farklı Ortam Koşullarına Maruz Bırakılan <i>Helicobacter pylori</i> Bakterilerinin Morfolojilerinin SEM ile Görüntülenmesi	71
4.1.4 Flow Sitometre Analiz Sonuçları.....	76
4.2 <i>Micrococcus luteus</i> ile Gerçekleştirilen Deneysel Çalışma Sonuçları	86
4.2.2 <i>Micrococcus luteus</i> Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi	87
4.2.3 <i>Micrococcus luteus</i> Büyüme Eğrisi.....	88
4.2.5 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimini İçeren Metabolitlerin SDS- PAGE ile Protein Boyutlarının Tayini	89
4.2.1 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimini İçeren Metabolitlerin Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	90
5 SONUÇ VE ÖNERİLER	97
Kaynakça.....	104
Tezden Üretilmiş Yayınlar	120

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat
A ₆₀₀	600 nanometrede alınan Absorbans Ölçümü
Da	Dalton
g	Gram
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
nm	Nanometre
γ	Gama
μ	Mikro
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre

KISALTMA LİSTESİ

Ala	Alanin
AMX	Amoksisilin
ATP	Adenozin Trifosfo
BHI	Step Test
BSA	Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin)
C	Sitozin
CagA	Sitotoksin ilişkili Gen A
CFU	Koloni Oluşturan birim (Colony Forming Unit)
CLA	Klaritromisin
DAP	Diaminopimelikasit
FBS	Fetal Sığır Serumu
G	Guanin
Gly	Glisin aminoasidi
H ₂ O	Su
HpaA	Adezin A
IL-8	İnterlökin 8
LMM	Laktat minimal medyum
MALT	Mukozal ilişkili lenfoid doku (Mucosal Associated Lenfoid Tissue)
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MNZ	Metronidazol
OD	Optik Yoğunluk
PBS	Fosfat tamponu
RPF	Resusitasyon Promatör Faktör
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
TET	Tetrasiklin
TSA	Triptikaz Soya Agar
ÜreA	Üreaz Proteini Kodlayan Gen
UV	Ultraviyole
VacA	Vakuol Oluşturucu Sitotoksik Protein
VBNC	Canlı Fakat Kültüre Edilemeyen Bakteri Sınıfı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1	<i>H. pylori</i> spiral formunun SEM ve gram boyama görüntüleri.....	7
Şekil 2.2	<i>H. pylori</i> 'nin kendine has vida hareketi, <i>H. pylori</i> 'nin mide epitel hücrelerine enjeksiyonu.....	8
Şekil 2. 3	<i>H. pylori</i> 'nin dünya genelindeki prevelans dağılım haritası.....	9
Şekil 2.4	<i>H. pylori</i> ve enfeksiyon sonrası gelişebilecek hastalıkların şemasal gösterimi	12
Şekil 2. 5	<i>H. pylori</i> ile infekte ve infekte olmayan epitel hücrelerinin morfolojik değişimi ve CD44 markırının ekspresyon düzeylerindeki değişiminin floresans mikroskop görüntüleri.....	16
Şekil 2. 6	<i>H. pylori</i> enfeksiyonunda kullanılan alternative tedaviler.....	23
Şekil 2.7	Metronidazolün kimyasal yapısı. Metronidazol, reaktif bir radikal oluşumuna yol açan nitro grubunun indirgenmesi ile aktive edilir.....	27
Şekil 2. 8	<i>H. pylori</i> 'nin spiral ve kokoid formunun SEM görüntüsü, <i>H. pylori</i> spiral ve kokoid formunun gram boyama ile ışık mikroskopu altındaki görüntüsü.....	36
Şekil 2. 9	<i>H. pylori</i> kokoid formlarının farklı morfolojik yapıları	37
Şekil 2. 10	<i>H. pylori</i> 'nin spiral formdan kokoid formuna dönüşümünün TEM görüntüsü.....	38
Şekil 2. 11	ATCC 43504 <i>H. pylori</i> suşunun farklı koşullarda zamana bağlı kokoid forma dönüşüm grafiği	39
Şekil 2. 12	<i>Micrococcus luteus</i> bakterisinin SEM görüntüsü	43
Şekil 2. 13	RPF enziminin 3 boyutlu yapısı.....	45
Şekil 3. 1	<i>M. luteus</i> bakterilerinin inkübasyon görüntüsü.....	61
Şekil 3. 2	Amicon Ultra-15,10K santrifüj tüpü görüntüsü.....	62
Şekil 3. 3	BSA Standart grafiği oluşturulurken elde edilen solüsyonların görüntüsü.....	63
Şekil 3. 4	SDS-PAGE analizi malzemeleri ve cihazı.....	64
Şekil 4. 1	<i>H. pylori</i> 'nin %10 at kanı içeren Brucella Agar besiyerindeki oluşturduğu kolonilerin görünümü	67
Şekil 4. 2	<i>H. pylori</i> 'nin 48.saatteki gram boyama görüntüsü.....	68
Şekil 4. 3	Üreaz testi görüntüsü.....	69

Şekil 4. 4	Beş farklı koşulda inkübe edilen <i>H. pylori</i> bakterilerinin zamana bağlı total bakteri sayısındaki değişim grafiği.....	70
Şekil 4. 5	%10 FBS, vankomisin, sefsulodin ve trimetoprim içeren <i>H. pylori</i> kültüründen 48.saatte alınan örneklerin SEM görüntüleri	72
Şekil 4. 6	PBS ile 37°C'de 48 saat ve 192 saat inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> kültürlerinin SEM görüntüleri	73
Şekil 4. 7	+4 °C 'de inkübe edilmiş <i>H.pylori</i> kültürünün 48.saat ve 192.saat inkübasyon sonucunda alınan örneklerin SEM analizi görüntüleri.....	74
Şekil 4. 8	+22 °C'de inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> kültürünün 48. Saat ve 192. saat inkübasyon sonundaki alınan örneklerin SEM analizi görüntüleri.....	74
Şekil 4. 9	Kanamisin ile muamele edilmiş <i>H. pylori</i> kültürünün 48.saat ve 192.saatlik inkübasyon sonrası alınan örneklerin SEM analizi görüntüleri.....	75
Şekil 4. 10	Herhangi bir strese maruz bırakılmamış <i>H. pylori</i> kültürünün 24 saatte bir yapılan Flow-sitometrik analiz sonuçları.....	76
Şekil 4. 11	Zamana bağlı <i>H. pylori</i> spiral ve kokoid dönüşüm yüzde grafiği.....	78
Şekil 4. 12	+4 °C'de inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> kültürünün Flow-sitometrik analiz sonuçları.....	78
Şekil 4. 13	+4°C'de inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> bakterilerinin zamana bağlı spiral ve kokoid dönüşüm grafiği.....	79
Şekil 4. 14	+22 °C'de inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> bakterilerinin spiral ve kokoid formlarının zamana bağlı Flow-sitometre analizleri, ...	80
Şekil 4. 15	+22°C'de inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> bakterilerinin spiral ve kokoid formlarının zamana bağlı yüzde dönüşümlü.....	81
Şekil 4. 16	PBS ile inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> bakterilerinin Flow-sitometre analiz sonuçları, ...	82
Şekil 4. 17	PBS ile inkübe edilen <i>H. pylori</i> 'nin zamana bağlı spiral ve kokoid dönüşüm yüzde grafiği	83
Şekil 4. 18	Kanamisin ile inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> bakterilerinin zamana bağlı Flow-sitometre sonuçları,.....	84
Şekil 4. 19	Kanamisin ile inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> 'nin zamana bağlı spiral ve kokoid dönüşüm yüzde grafiği	85
Şekil 4. 20	Farklı koşullarda inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> 'nin spiral ve kokoid dönüşüm yüzde grafiği	86
Şekil 4. 21	<i>M. lutes</i> bakterisinin TSA besiyerinde oluşturduğu kolonilerin görüntüsü.....	87

Şekil 4. 22	<i>M. luteus</i> bakterisinin TSA besiyerinde oluşturduğu kolonilerden elde edilen gram boyama görüntüsü	88
Şekil 4. 23	<i>M. luteus</i> bakterisinin büyüme eğrisi grafiği	88
Şekil 4. 24	<i>M. luteus</i> 'dan elde edilen metabolitlerin SDS-PAGE jel görüntüsü, ...	89
Şekil 4. 25	Bradford Protein Tayini için yapılan BSA standart grafiği	90
Şekil 4. 26	PBS ile inkübe edilmiş kokoidlerin inkübasyon sonrası 24. saatteki flask görüntüleri	91
Şekil 4. 27	PBS ile indükleniş <i>H. pylori</i> kokoid formlarının RPF içeren metabolitlerle inkübasyona öncesi ve sonrası absorbansa bağlı değişim grafiği	92
Şekil 4. 28	RPF enzimi içeren metabolitlerle inkübe edilmiş kokkoidler	93
Şekil 4. 29	Kanamisin ile indüklenmiş kokoid formlarının RPF içeren metabolitlerle inkübasyon öncesi ve sonrası absorbansa bağlı değişim grafiği	94
Şekil 4. 30	Kanamisine maruz bırakılan <i>H. pylori</i> kokkoidlerin RPF enzimi içeren metabolitlerle inkübasyonu sonrası kültürlerden alınan örneklerin üreaz test sonuçları	94
Şekil 4. 31	Kanamisin ile indüklenmiş <i>H. pylori</i> bakterisinin RPF içeren metabolitlerle inkübasyonu	95
Şekil 4. 32	100µg/mL RPF içeren metabolit ile muamele edilen <i>H. pylori</i> kültürünün 24 saatlik inkübasyona sonrası SEM analizi görüntüleri.	96
Şekil 4. 33	Kanamisin ile indüklenen <i>H. pylori</i> kokodilerinin ve 100µg/mL RPF içeren metabolitlerle inkübe edilen <i>H. pylori</i> kokoidlerinin resusitasyon sonrası gram boyama görüntüleri	96

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	<i>H. pylori</i> Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	20
Tablo 2.2	<i>H. pylori</i> güncel tedavi kombinasyonları	22
Tablo 2.3	Farklı Antibiyotiklerin Duyarlı ve Dirençli <i>H. pylori</i> Suşlarındaki MİK Değerleri ve Ana Direnç Mekanizmaları	33
Tablo 2.4	VBNC sınıfına dahil olan bakteriler listesi.....	35
Tablo 3.1	BSA standart grafiği hazırlama tablosu.....	62
Tablo 3.2	Kanamisin ve PBS ile indüklenen <i>H. pylori</i> kokoidlerinin farklı ortam koşullarında inkübasyonuna ait tablo.	65
Tablo 4.1	Herhangi bir strese maruz bırakılmamış <i>H. pylori</i> kültürünün Flow-sitometrik analizi sayısal sonuçları	77
Tablo 4.2	+4°C'de inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> kültürünün Flow-sitometrik analizinin sayısal sonuçları.....	79
Tablo 4.3	+22°C'de inkübe edilmiş <i>H. pylori</i> kültürünün Flow-sitometrik analizi sayısal sonuçları.	81
Tablo 4.4	PBS ile inkübe edilen <i>H. pylori</i> kültürünün Flow-sitometrik analizi sayısal verileri	83
Tablo 4.5	Kanamisin ile kültüre edilen <i>H. pylori</i> 'nin Flow-sitometrik analizi sayısal verileri	85

***Micrococcus luteus* Metabolitlerinin, *Helicobacter pylori*'nin Kokoid Formu Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi**

Didem AKTAŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melahat BAĞIROVA

Dünya nüfusunun %55'inden fazlasını etkileyen *Helicobacter pylori*, gram-negatif, mikroaerofilik, bir bakteri türüdür ve ciddi hastalıklarla ilişkilendirilmiş olup Dünya Sağlık Örgütü *H. pylori*'yi 1.sınıf karsinojen olarak belirlemiştir. *H. pylori* normal koşullarda spiral şekilli olup, ayrıca açlık ve stres gibi olumsuz koşullarda kendini korumak için metabolik aktivitesini azaltıp antibiyotiklere, dezenfektanlara karşı daha dirençli halde bulunduğu kokoid şekilli olmak üzere çeşitli formlarda bulunmaktadır. *H. pylori* ile enfekte bireylerde, kronik aktif gastrit, peptik ülser, mide karsinomu ve MALT lenfoma (Mucosal Associated Lenfoid Tissue) gibi ciddi hastalıklara sebep olmaktadır. Günümüzde *H. pylori* enfeksiyonunun eradikasyonu klasik antibiyotik tedavisi olan, bir proton pompa inhibitörü içeren üçlü ve dörtlü tedavidir. Fakat bu tedavi yöntemleri ile %100 eradikasyon sağlanması oldukça zordur. Ayrıca tedavi sonrası enfeksiyon tekrarlanabilmektedir. Eradikasyonların başarısızlığı ve nüks eden enfeksiyonların başlıca temel sebeplerinden biri *H. pylori*'nin kokoid formlarına dönüşmesi gösterilmekte ve bu form tedavinin etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır. *H. pylori*'ye karşı tedavide başarı şansı *H. pylori*'nin kokoid formlarının spiral forma

dönüşümü ile arttırılabileceği düşünülmektedir. Literatürde konuyla ilgili çalışmalar bulunsada oldukça az sayıda olup yetersizdir. Bu nedenle *H. pylori*'nin kokoid formlarının spiral forma dönüştürülmesine yönelik yeni yaklaşımların geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Literatürde yapılan çalışmalarda *Micrococcus luteus* bakterisinden elde edilen metabolitlerde resusitasyon promatör faktörlerin (RPF) varlığı tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda RPF'lerin "Canlı Fakat Kültüre Edilemeyen Bakteri Sınıfı" (VBNC)'na dahil olan bakteriler üzerindeki resusitasyon etkisi incelenmiş olup olumlu sonuçlar elde edilmiştir. *H. pylori*' de VBNC sınıfa dahil olan bir bakteri olmasına rağmen literatürde *M. luteus*'dan elde edilen RPF içeren metabolitlerin *H. pylori*'nin kokoid formu üzerindeki resusitasyon etkisinin incelenmesine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasının amacı *M. luteus* bakteri kültüründen RPF içeren metabolitlerin elde edilmesi ve bu metabolitlerin farklı koşullarda oluşturulan *H. pylori*'nin kokoid formlarının aktif/spiral formlara dönüşümü üzerindeki in vitro etkisinin incelenmesi olmuştur.

Çalışmada; Açlık, antibiyotik (kanamisin) ile muamele, farklı sıcaklıklarda inkübasyon (+4, +22°C) ve uzun süreli kültür gibi beş farklı ortam koşullarında *H. pylori*'nin kokoid formları oluşturuldu. Bu morfolojik dönüşümler mikroskopik gözlem, gram boyama Flow-sitometrik analiz ve SEM analizi gibi çeşitli yöntemlerle incelendi. *M. luteus* bakterisinden geç logaritmik fazda elde edilen süpernetant filtrelenerek protein varlığı ve miktarı SDS-PAGE ve Bradford Protein Tayin yöntemleriyle belirlendi. En yüksek düzeyde kokoidleşmenin gözlemlendiği kanamisin ile muamele edilen ve PBS (açlık) ortamında inkübasyona bırakılan *H. pylori* bakterileri 1, 10, 100 µg/mL RPF içeren metabolitler ile 24 saat inkübe edildi. Bakteri kültüründeki RPF içeren metabolitlerin resusitasyon etkisi mikroskopik, gram boyama, Flow-sitometrik ve SEM analizi ile incelendi. Elde edilen sonuçlara göre beş farklı ortam koşullarına maruz bırakılan bakterilerdeki 192 saat inkübasyona sonundaki kokoidleşme yüzdeleri PBS, +4°C'de inkübasyon, +22°C'de inkübasyon, kanamisin ile muamele ve uzun süreli kültür koşulları için sırasıyla %96, %94, %90, %99,5 ve %70 olduğu Flow-sitometre ile belirlenmiştir. Elde edilen SEM görüntüleride en yüksek kokoidleşmenin kanamisin ile muamele

ve PBS ile inkübasyon sonrası oluştuğunu göstermiştir. *M. luteus* kültüründen 60, 65, ve 72.saatlerde elde edilen RPF içeren metabolitlerin SDS-PAGE analizinde RPF enzimine özgü 17 kDa'luk bant oluşumu gözlemlendi. Aynı zamanda Bradford yöntemi ile örneklerdeki protein konsantrasyonları sırasıyla 392, 376 ve 300,8 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. RPF içeren metabolitlerin 1, 10 ve 100µg/mL konsantrasyonları PBS ve kanamisin ile indüklenen kokoidler üzerinde incelendiğinde kanamisin ile muamele edilen bakterilerin tüm incelenen konsantrasyonlarında %90 üzerinde spiral forma dönüştükleri flow-sitometre, gram boyama ve SEM analizi ile gösterilmiştir.

Sonuç olarak dünyada ve ülkemizde ilk kez olarak *M. luteus* bakterisinden elde edilen RPF içeren metabolitlerin *H. pylori*'nin kokoid formları üzerinde resusitasyon etkisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar RPF içeren metabolitlerin kullanımı ile *H. pylori*'nin tedavisinde başarısızlığın en önemli etkenlerinden biri olan kokoid formlarının spiral hale dönüştürülmesiyle tedavinin kolaylaştırılmasında önemli rol oynayacaktır. Böylece bu tez kapsamında *H. pylori*'nin tedavisinde kokoid formlarının aktif-spiral forma dönüşümünü tetikleyen, *M. luteus* RPF içeren metabolitlerinin gelecekte kullanılması ile enfeksiyonun eradikasyon başarısını arttırabilmesine yönelik yeni bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir.

Bu yüksek lisans tez çalışması Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TYL-2018-3326 numaralı projesi kapsamında desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler : *Helicobacter pylori*, Kokoid *Micrococcus luteus*, resusitasyon promotör faktör, resusitasyon, RPF.

Investigation of the Effect of *Micrococcus luteus* Metabolites on *Helicobacter pylori* Cocoid Form

Didem AKTAŞ

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Advisor: Asist. Prof. Dr. Melahat BAĞIROVA

Helicobacter pylori is a gram-negative, microaerophilic, bacterial specie, which affects more than 55% of the world's population and has been associated with serious diseases and the World Health Organization has identified *H. pylori* as first-class carcinogen. *H. pylori* is spiral-shaped under normal conditions and is also available in a variety of forms, including cocoid-shaped, in which it is more resistant to antibiotics and disinfectants, reducing metabolic activity to protect itself under adverse conditions such as hunger and stress. It causes serious diseases such as chronic active gastritis, peptic ulcer, gastric carcinoma and MALT lymphoma in individuals infected with *H. pylori*. Today, eradication of *H. pylori* infection is a classic antibiotic therapy, including a proton pump inhibitor, triple and quadruple therapy. However, it is very difficult to achieve 100% eradication with these treatment methods. In addition, infection may recur after treatment. One of the main causes of eradication failure and recurrent infections is the transformation of *H. pylori* into cocoid forms, which leads to a decrease in the effectiveness of treatment. The chance of success in the treatment of *H. pylori* is thought to be possible by the transformation of *H. pylori* into the spiral form.

Although there are studies on the subject in the literature, it is very few and inadequate. Therefore, it is very important to develop new approaches for the transformation of *H. pylori* coccoids into spiral forms.

In the studies in the literature, the presence of resuscitation promoter factors (RPF) was found in the metabolites obtained from *Micrococcus luteus* bacteria. In some studies, the effect of RPFs on the bacteria that belong to the class of "Viable But Non-Culturable Bacteria" was examined and positive results were obtained. Although *H. pylori* is a bacterium included in the VBNC class, no studies have been found in the literature to investigate the effect of RPF-containing metabolites obtained from *M. luteus* on coccoid form of *H. pylori*. Therefore, the aim of this thesis was to obtain RPF-containing metabolites from *M. luteus* bacterial culture and to investigate the in-vitro effect of these metabolites on the transformation of *H. pylori* coccoids into active/spiral forms.

Study; Five different conditions such as starvation, antibiotic (kanamycin) treatment, incubation at different temperatures (+4, + 22°C) and prolonged culture were established coccoids of *H. pylori*. These morphological transformations were examined by various methods such as microscopic observation, gram staining, Flow-cytometric analysis and SEM analysis. Supernatant obtained in late logarithmic phase from *M. luteus* bacteria was filtered and determined by SDS-PAGE and Bradford Protein Determination methods. *H. pylori* bacteria, which were treated with kanamycin and incubated in PBS (starvation), where the highest coccidation was observed, were incubated with metabolites containing 1, 10, 100 µg/mL with RPF-containing metabolites for 24 hours. Resuscitation effects of RPF-containing metabolites in bacterial culture were examined by microscopic, gram staining, Flow-cytometric and SEM analysis. According to the results obtained, the percentages of coccoids at the end of 192 h incubation in bacteria exposed to five different ambient conditions were PBS, incubation at +4°C, incubation at +22°C, treatment with kanamycin and prolonged culture conditions, respectively 96%, 94%, 90%, 99.5% and 70% were determined by Flow-cytometer. The SEM images showed that the highest coccidization occurred after treatment with kanamycin and incubation with PBS. SDS-PAGE analysis of RPF-containing metabolites

obtained from *M. luteus* culture at 60, 65, and 72h showed a 17 kDa band formation specific to RPF enzyme. At the same time, protein concentrations in the samples were determined as 392, 376 and 300.8 µg/mL by Bradford method. The concentrations of 1, 10 and 100µg/mL of RPF-containing metabolites were examined on PBS and kanamycin-induced cocoids and were demonstrated by flow-cytometry, gram staining and SEM analysis in which all the kanamycin-treated bacteria were transformed into spiral forms over 90% at all examined concentrations.

As a result, it was found that RPF containing metabolites obtained from *M. luteus* bacteria had the resuscitation effect on the cocoid forms of *H. pylori* for the first time in the world and in our country. The results obtained will play an important role in facilitating the treatment by transforming cocoids, one of the most important factors of failure in the treatment of *H. pylori*, with the use of metabolites containing RPF. Thus, in the context of this thesis, it is thought that there may be a new approach to increase the eradication success of infection by using future metabolites containing *M. luteus* RPF which triggers the conversion of cocoid forms to active-spiral form in the treatment of *H. pylori*.

This master thesis was supported by the Scientific Research Projects Department of Yıldız Technical University within the scope of TYL-2018-3326 project.

Keywords : *Helicobacter pylori*, Cocoid, *Micrococcus luteus*, resuscitation promotor factor, resuscitation, RPF.

1.1 Literatür Özeti

İnsanlarla 100.000 yıldır ilişki içerisinde olan *Helicobacter pylori*, gram negatif ve mikraerofilik bir bakteridir [1]. *Helicobacter pylori* 0.6 µm genişliğinde, 2–5 µm uzunluğunda, spiral ve flagellaları sayesinde oldukça hareketli bir bakteri türüdür [1-3]. Bakterinin; spiral, kıvrımlı-basil ve stres koşullarında kokoid olmak üzere çeşitli morfolojileri bulunmaktadır [2]. *H. pylori*, üreaz, katalaz ve oksidaz pozitif bir bakteridir [4]. Üreaz enzimi sayesinde, *H. pylori*, asidik mide ortamında üreyi amonyağa çevirerek oluşturduğu mikro bazik ortamda hayatta kalır [5-7]. Ayrıca mide mukus tabakasında serbest halde bulunabilirken [8] aynı zamanda da endotel (epitel) hücrelerine tutunup yapışabilme [8-10] ve hatta hücrelere enjeksiyon yolu ile nüfus edebilme yeteneğine sahiptir [10, 11].

Tüm bu özellikler sayesinde mide ortamında hayatta kalır ve uzun yıllar boyunca bağışıklık hücrelerinden kaçarak konakçıda uzun süre asemptomatik olarak yaşamına devam eder. Yapılan çalışmalar kronik aktif gastrit, peptik ülser, mide karsinomu ve MALT lenfoma (Mucosal Associated Lymphoid Tissue) ile *H. pylori*'nin ilişkisini ortaya koymuştur [12]. *H. pylori* ile enfekte kişilerin %0.1-3'ünde kanser görülmektedir [13] fakat kanserleşme mekanizması anlaşılmaya çalışılmaktadır. Dünyanın %50'sinden fazlası ve gelişmekte olan ülkelerin %70'inden fazlası *H. pylori* ile enfectedir [14]. Dünya sağlık örgütü (WHO) *H. pylori*'yi 1.grup karsinogen olarak belirlemiştir [13]. *H. pylori* enfeksiyonunun klasik tedavi yöntemi, amoksisilin (AMX), klaritromisin (CLA), metronidazol (MNZ) [15] ve tetrasiklin (TET) gibi iki antibiyotik kombinasyonunu ve bir proton pompa inhibitörünü içeren üçlü ya da üç antibiyotik kombinasyonunu ve bir proton pompa inhibitörünü içeren dördü tedavidir [16]. Son yıllarda antibiyotiklere karşı artan direnç ile birlikte *H. pylori* tedavi başarısı %60-%75'lere düşmüştür [17]. Bu dirençli suşların gelişiminde kokoid formlarının da etkili olduğu yapılan

alışmalarla gösterilmiştir [18]. Klasik antibiyotik tedavilerinin başarısızlığı ve tedavi sonrasında tekrar eden enfeksiyonların nedenlerinden biri olan *H. pylori* kokoid formları yapılan çalışmalar da amoksislin antibiyotiğine karşı spiral/aktif formuna nazaran 10 kat daha dirençli olduğu bildirilmiştir[19]. Ayrıca kokoid formu çevrede ölmeden kalabildiği ve oral yolla bulaştıktan sonra mideye yerleşerek ve çoğalarak enfeksiyonu başlatabildiği gösterilmiştir [20]. Oksijen, antibiyotik ve dezenfekt varlığı, ekstrem sıcaklıklar yada besin yokluğu gibi stres koşullarında uyku (dormancy) formuna geçen *H. pylori* kokoid formu sayesinde aşırı strese karşı hayatta kalma potansiyelini arttırmaktadır [21, 22].

Canlı fakat kültüre edilemeyen VBNC (viable but nonculturable) bakteri sınıfı ilk kez 1985 yılında Rita Colwell tarafından tanımlanan ve çeşitli koşullarda kültürde üreyebilme yeteneklerini zamanla kaybettikleri halde metabolik aktivitelerine devam eden ve uygun koşulları bulduklarında tekrar üreyebilen bakteriler için kullanılmış bir bakteri sınıfıdır [23, 24]. Bu bakteriler; açlık, ozmotik basınç ve oksijen artışı, antibiyotik varlığı gibi çeşitli çevresel baskılardan korunabilmek için metabolik ve morfolojik özelliklerini değiştirir ve VBNC formuna geçerler. VBNC sınıfına dahil bakterilerin metabolik aktivitelerini azalttığı ve ayrıca respirasyon, besin transportları, makromolekül sentezlerinde de azalmalar meydana geldiği gösterilmiştir [25, 26]. VBNC bakterilerinin metabolik aktivitelerin azalmasına karşın patojenitesini kaybetmediği ve uygun koşulları bulduklarında tekrar aktif forma geçebildikleri yani resusitasyona uğradıkları diğer yapılan çalışmalar arasındadır [25]. VBNC sınıfı 60'dan fazla bakteriyi içermektedir ve Oliver J.D'ye göre *H. pylori* de bu sınıfa dahil olan bakteriler arasındadır [25]. *H. pylori*, açlık, oksijen ve antibiyotik varlığı, sıcaklık gibi çeşitli stres koşullarında spiral formundan kültürlenemeyen kokoid formuna dönüşerek kendini bu çevresel baskılardan korumaktadır [27]. *Helicobacter pylori* morfolojik olarak iki şekilde bulunur. Spiral, s-şekilli basil formu yaygın olarak bulunan, metabolik aktivitesi yüksek, oldukça hareketli ve kültürlenebilen bir formudur. İkinci formu ise kokoid olarak adlandırılan, açlık, ekstrem pH, oksijen veya antibiyotik varlığın da kendini korumak üzere metabolik aktivitesini düşürdüğü hareket yeteneğini kaybettiği ve kültüre edilemeyen daha dirençli formudur [20, 28-32].

Spiral formda olduğu gibi, kokoid formu da *ureA*, *ureB*, *hpaA*, *vacA* ve *cagA*, *cagE* ve *BabA* gibi büyük virulans genlerini ifade eder. Bu genlerin ifade edilmesi kronik şiddetli mide rahatsızlıklarında önemli bir rol oynamaktadır [33]. Kokoid formunun antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı direnç göstermesinin en önemli nedenlerinden biri membran yapısının değişime uğramasıyla antibiyotiğin işlevsiz kalmasıdır. Kokoid formunun membran yapısı spiral formundan oldukça farklıdır. Spiral formdan kokoid formuna dönüşümünde anhidro-muropeptid ve Glyterminli muropeptidlerin oranlarının arttığı ve dipeptid monomerlerinin oluşarak kok şeklinin oluşumunda etkili olduğu gözlemlenmiştir [34]. Spiral formdan kokoid formuna geçişte bakterinin sahip olduğu flagellalar hücre duvarının etrafını sararak kokoidi meydana getirdiği bilinsede *Helicobacter pylori*'nin hangi mekanizmalarla kokoide dönüştüğü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Başka bir çalışma da ise spiral form ile kokoid formu karşılaştırıldığında hücre bölünmesi, transkripsiyon ve translasyon proteinlerinin de dahil olduğu 30 fonksiyonel proteinin kokoid formunda düşük regüle edildiği gösterilmiş ve gastrik epitel hücrelerinde IL-8 uyarıcı aktiviteye sahip olmayan *Helicobacter pylori* kokoid formlarının bağışıklık sisteminden kaçmasına olanak sağladığı gösterilmiştir [35].

Literatürde yapılan çalışmalarda *Micrococcus luteus* bakterisinden elde edilen resusitasyon promatör faktör (RPF)'ler VBNC (viable but nonculturable) sınıfına dahil olan bakteriler üzerinde incelenmiş ve resusitasyonu sağlanmasında olumlu sonuçlar elde edilmiştir [36]. *H. pylori*'de aynı sınıfa dahil olmasına rağmen konuyla ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır [25]. *Micrococcus luteus*, insan derisinden, toprağa ve sudan izole edilebilen ve DNA içeriğinin yüksek G + C oranına sahip gram pozitif bakterilerin bir üyesidir. Laboratuvar koşullarında, yaşayan *M. luteus* bakterileri, 'kültürlenemez' bakterilerin resüsitasyonunu teşvik ettiği bildirilmiştir [37-39]. Aktivite, canlı bakteriler tarafından üretilen ve aktif olarak büyüyen kültürlerin süpernetantında bulunan küçük bir protein olan, resüsitasyon promotör faktör (RPF)'dür. 'Kültürlenemez' hücrelerin resüsitasyonundaki fonksiyonuna ek olarak, resusitasyon promatör faktörler, bakteri büyüme faktörü veya sitokin olarak da genel bir rolü vardır. RPF pikomolar konsantrasyonlarda bile aktiviteye sahip olduğu gösterilmiş, 17 kDa'luk bir proteindir. Belirli tanımlanmış koşullar altında RPF dormant bakterilerin

büyümelerine ve tekrar kültürlenebilmelerini sağlayan spesifik enzimatik aktiviteye sahiptir ve bakteri büyüme faktörü olarak görülmesi önerilmektedir. RPF'nin spesifik bir enzim olduğu muralitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. RPF'nin bakterileri nasıl resusitasyona uğrattığı ile ilgili kesin mekanizma bilinmese de öngörülen hipotez bakteri duvarının yıkımına neden olarak bakteriyi hücre duvarını yeniden modellenmesi için uyarması şeklindedir [37-39].

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı, günümüzde dünya popülasyonunun %55'inden ve gelişmekte olan ülkelerin %75'inden fazlasını etkileyen *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisine ve eradikasyonuna katkı sağlamak amacıyla *Micrococcus luteus*'dan elde edilen resusitasyon promatör faktörleri içeren metabolitlerin üretilmesi ve karakterizasyonu, farklı kültür ortamlarında *H. pylori*'nin kokoid forma dönüşümünün indüklenmesi ve elde edilen RPF içeren metabolitlerin *H. pylori*'nin kokoid formlarının aktif-spiral forma dönüşümüne etkisinin incelenmesidir.

1.3 Hipotez

Literatürde yapılan çalışmalarda *Micrococcus luteus* bakterisinden elde edilen resusitasyon promatör faktör (RPF)'ler VBNC (viable but nonculturable) sınıfına dahil olan bazı bakteriler üzerindeki etkisi incelenmiş ve resusitasyonun sağlanmasında olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

RPF'nin etki mekanizması tam olarak bilinmesede da önerilen hipotez bakteri duvarı ile etkileşime giren RPF'nin lizozim benzeri aktivitesi ile duvarın yıkımına neden olarak bakteriyi hücre duvarını yeniden modellemesi için uyardığı ve bakterileri dormant halden çıkmalarına neden olacak bir takım değişiklikleri meydana getirmektedir. RPF'nin NMR analizi lizozim benzeri bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir.

H. pylori VBNC sınıfına dahil olmasına rağmen konuyla ilgili literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buna nedenle *M. luteus*'dan elde edilecek RPF enzimini içeren metabolitlerin ilk kez *H. pylori*'nin kokoid formlarının aktif formlarına dönüşümüne etkisinin incelenmesi ve *H. pylori*'ye karşı tedavide ve eradikasyonda yeni bir yaklaşımın oluşturulması hedeflenmiştir. Dünyanın ve

Ülkemizin ciddi halk sağlığı problemlerinden biri olan *H. pylori* enfeksiyonunun tedavi ve eradikasyonu için resisitasyon promatör faktörleri içeren metabolitlerin üretilmesi ve *H. pylori*'nin kokoid formları üzerindeki etkisinin incelenmesi yeni bir yaklaşım geliştirilmiş olacaktır. Geliştirilen bu yeni yaklaşım dünyanın %55'ini etkileyen ve *H. pylori*'nin tedavisinde problemlere yol açan kokoid formunun spiral/aktif ve daha duyarlı hale dönüştürmekle *H. pylori*'nin tedavisi ve eradikasyonu için yapılan alışmara hız kazandıracaktır.

Bu doğrultuda tezin amaç ve hedeflerine ulaşabilmek için aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

- *M. luteus* kültürü yapılması.
- *M. luteus* kültürü sonunda resisitasyon promatör faktörlerini içeren metabolitlerin elde edilmesi ve karakterizasyonu.
- *H. pylori* kültürünün yapılması.
- *H. pylori* bakteri kültürünün mikroaerofilik ortamda +4°C ve mikroaerofilik ortamda +22°C sıcaklıklarında, antibiyotik varlığında (kanamisin), uzun süreli kültür ve PBS(açlık) koşulları olmak üzere beş farklı koşulda inkübe edilmesi ile kokoid formlarının oluşturulması ve görüntülenmesi.
- *M. luteus*'dan elde edilen resisitasyon faktörlerini içeren metabolitlerin oluşturulan kokoidler üzerinde etkisinin incelenmesi ve bakterinin spiral forma dönüşmesi için en uygun konsantrasyonun belirlenmesidir.

2.1 *Helicobacter pylori*

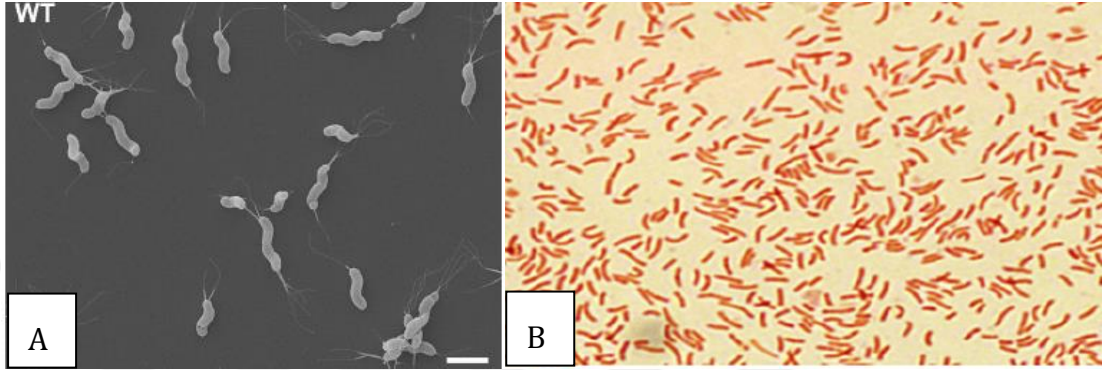
2.1.1 *Helicobacter pylori* ve Kısa Tarihçesi

İnsanlarla 100.000 yıldır ilişki içerisinde olan *Helicobacter pylori* [1], ilk kez Warren tarafından mide hastalıkları ile ilişkilendirerek, aseptik kabul edilen midede bakteri varlığını göstermiştir. Bu çalışmalarından dolayı Warren ve Marshall 2005 yılında dolayı Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülüne layık görülmüştür[40]. Daha önceki bilim adamları tarafından yapılan çalışmalarda kedi ve köpeklerin midelerinde spiral/helikol bakterilere rastlamış fakat mide hastalıkları ile ilişki ilk kez Warren tarafından kurulmuştur. Warren ve Marshall duodenum ülseri olan hastaları incelediklerinde, her hastada bu bakteriye rastlamışlardır. Ayrıca bakterinin gastrit ve peptik ülserlede ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir. Marshall izole ettikleri bakterilerden kendine uygulayarak dispeptik semptomlar ve gastrit geliştirmiştir. Daha sonra organizmayı bizmut ve antibiyotik kullanarak yok etmişlerdir ve böylece bakterinin mide rahatsızlıkları ile nedensel ilişkisi ortaya çıkarılmıştır. *H. pylori* ilk olarak *Campylobacter-benzeri-organizma* (CLO) olarak anılmıştır. Daha sonra *Campylobacter pyloridis* ve *Campylobacter pylori* olarak adlandırıldıktan sonra *Campylobacter* türünden bazı farklılıklarından dolayı *Helicobacter pylori* ismini almıştır [41-43].

2.1.2 *Helicobacter pylori* Morfolojik ve Karakteristik Özellikleri

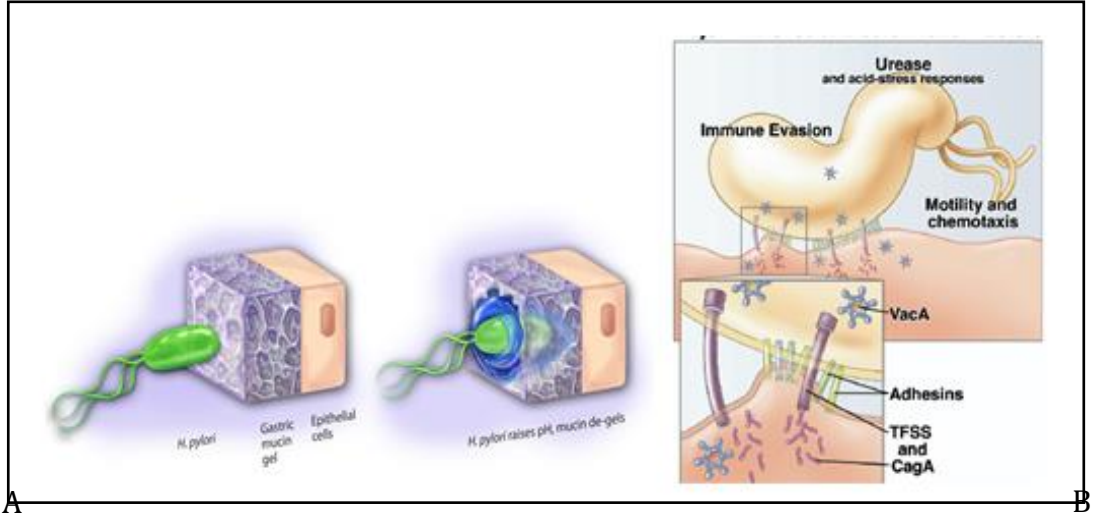
H. pylori gram negatif ve mikroaerofilik bir bakteridir.. *H. pylori*, 0.6 µm genişliğinde, 2-5 µm uzunluğunda olup, doğal ortamında Şekil 2.1 A ve B'deki gibi sarmallı spiral şeklindedir. Fakat *H. pylori*'nin spiral, kıvrımlı-basil ve stres koşullarında kokoid olmak üzere çeşitli morfolojileri de bulunmaktadır [2]. Bir *H. pylori* yapısında 5-7 arasında polar kılıflı filagella bulundurur [44]. Flagellaları sayesinde oldukça hareketli bir bakteri türüdür [1-3]. *H. pylori* Şekil 2.2 A'da

gösterildiği gibi sıvı ortamda kendine has vida hareketi yapmaktadır ve bu hareket ona asidik mide ortamında, mukus tabakasından mide epitel hücrelerine doğru hızlıca nüfus etmesi kabiliyetini kazandırarak midede kolonize olabilmeyi, mide hastalıklarını indüklemesi ve hayatta kalmabilmesi ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bakterinin mide ve bağırsak mukusunda kolonizasyonu için spiral morfoloji ve flagellaların gerekli olduğu düşünülmektedir [45].



Şekil 2. 1 *H. pylori* spiral formunun SEM (A) ve gram boyama (B) görüntüleri [15, 46]

Üst gastrointestinal sistemde, gastrik mukozal bariyer patojenlere karşı ilk savunma hattını ifade eder. Çoğu bakteri bu tabakada sıkışıp kalarak daha sonra dışkı yolu ile atılırlar [47]. *H. pylori* mide antrumunda yerleşerek mukus içerisinde koloniler yapar ve yaşamını sürdürür [48]. *H. pylori*, üreaz, katalaz ve oksidaz pozitif bir bakteridir [4]. Üreaz enzimi sayesinde, *H. pylori*, asidik mide ortamında üreyi amonyağa çevirerek oluşturduğu mikro bazik ortamda hayatta kalır [5-7, 49]. Ayrıca mide mukus tabakasinda serbest halde bulunabilirken [8] aynı zamanda da endotel (mide epitel) hücrelerine tutunup yapışabilme [5, 8-10] ve Şekil 2.2 B’de gösterildiği gibi epitel hücrelere enjeksiyon yolu ile nüfus edebilme yeteneğine sahiptir [5, 10, 11]. Tüm bu özellikler sayesinde mide ortamında hayatta kalır ve uzun yıllar boyunca bağışıklık hücrelerinden kaçarak konakçıda asemptomatik şekilde yaşamına devam eder [5].



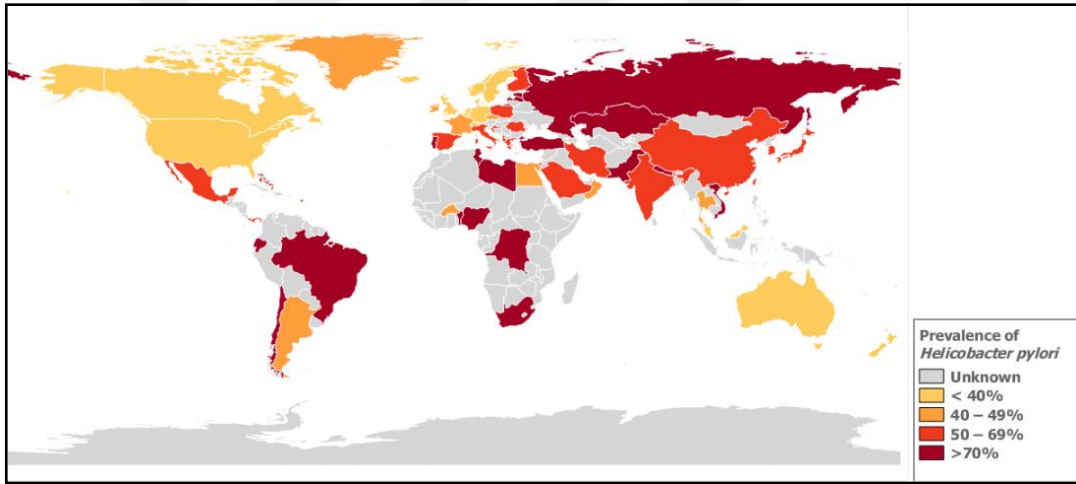
Şekil 2. 2 *H. pylori* 'nin kendine has vida hareketi (A)[50], *H. pylori* 'nin mide epitel hücrelerine injeksiyonu (B) [5]

H. pylori'nin mide epitel hücrelerine yapışmasında rol oynayan bazı adezin moleküller tanımlanmıştır. Bunlardan en önemli adezin BabA (Blood Group Antigen-Binding Adhesin)'dır. BabA, Lewis B kan grubu antijenlerine bağlanan bir adezindir. Ayrıca *H. pylori* ürettiği müsinaz enzimi sayesinde mukus tabakaya verdiği hasar ile epitel hücreleriyle yakın temasta olur [51]. *H. pylori* epitel hücrelerine yapıştıktan sonra epitel hücrelerin mikrovillusları kaybolduğu gözlemlenmiştir. Bakterinin salgıladığı sitotoksik faktörler (VacA, CagA, IceA vb.) epitel yıkımına yol açarak lamına propriada inflamatuvar yanıtların çıkmasına neden olur [52]. Epitel hasarına bakterinin asidik ortamdan kurtulmak için midedeki üreyi amonyağa çevirmesi ve oluşan amonyağın epitel hücre solunumunu ve enerji metabolizmasını bozmasında neden olmaktadır. Ayrıca inflamasyon bölgesinde nötrofiller tarafından myeloperoksidaz aktivitesinin artırılması ile açığa çıkan hipoklorik asit epitel için toksik etkileri olan monokloramin oluşumuna neden olmaktadır [53].

H. pylori zorunlu mikoaerofilik bir bakteridir bu nedenle kültür ortamında %5-10 CO₂ içeren ortamlara gereksinim duyar. En iyi üreyebildiği ortamlar %10 FBS ya da %5-7 oranında kan içeren Brucella, Colombia yada Skirrow agarlardır. 37°C'de %98 nemli ve %5-10 CO₂'li bir ortamda 4-7 gün kültürlen *H. pylori*, 1-15 mm çapında yuvarlak, dış bükey, şeffaf koloniler oluşturur [54].

2.1.3 *Helicobacter pylori*'nin Dünyadaki ve Türkiye'deki Prevelansı

H. pylori enfeksiyonu dünya çapında yaygın olan ve hem kadın hem de erkek nüfusunu etkileyen bir enfeksiyondur [55-57]. Dünya çapında enfeksiyon görülmesine karşın gelişmişlik düzeyiyle ilişkili olarak ülkeler arasında enfeksiyon prevelansında farklılıklar vardır [58]. *H. pylori* enfeksiyonu gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksektir [59]. Prevelanstaki bu farklılık enfeksiyonun çocukluk çağına kazanım oranına ile ilgilidir [60]. *H. pylori* enfeksiyonunun prevelansı 10 yaş altı çocuklarda gelişmekte olan ülkelere %13-60 arasında iken gelişmiş ülkelere bu oran %0-5'dir. 10 yaşından itibaren prevelans her yıl % 0,5 ila %2 artmaktadır [61, 62]. *H. pylori*'nin yaşla birlikte artan prevelansındaki bu fark gelişmiş ülkelere tıbbi bakım, kişisel temizlik ve bakım bilincinin gelişmesi ve yaşam koşullarının iyileşmesinden kaynaklanmaktadır [61-64].



Şekil 2.3 *H. pylori* 'nin dünya genelindeki prevelans dağılım haritası [14].

Dünya genelinde insan nüfusunun %55'den fazlası, 4.4 milyar insan *H. pylori* ile enfektidir. Gelişmekte olan ülkelerin nüfusunun %70'i ise *H. pylori* pozitifdir [14]. Türkiye'de bu oran tahmini olarak %70.2 olarak belirlenmiştir [14]. Dünya genelindeki *H. pylori* prevelansı Şekil 2.3'de gösterildiği üzere Güney Amerika'da %80'in üzerinde, ABD ve Afrika'da %30-70 arasında seyretmektedir. Kuzey Avrupa'da bu oran %30, Güney Avrupa'da ise %50'ler civarındadır. Günümüzde *H. pylori* pozitifliği en az rastlanan Avustralya %20 prevelansına sahiptir. Prevelanstaki farkların, gelecekte dünyadaki peptik ülser hastalığı ve mide kanseri

de dahil olmak üzere *H. pylori* ile ilişkili hastalıkların prevalansı üzerine önemli etkileri vardır. *H. pylori* prevalansındaki bu farklılıklar kentleşme, hijyen, temiz suya erişim ve çeşitli sosyoekonomik durum düzeyini yansıtmaktadır. Aynı ülke içinde bile *H. pylori* prevalansında önemli farklılıklar bulunmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki farklı ırk grupları farklı *H. pylori* prevalansına sahiptir. Beyazlarda prevalans % 18,4 ile % 26,2 arasında değiştiği gözlemlenirken beyaz olmayanlarda bu oran % 34,5 ile % 61,6 arasında değiştiği bildirilmiştir [14]. Prevalansı etkileyen diğer faktörler, bölgesel sosyo-ekonomik farklılıklara, sağlık sorunlarının çözümünde/iyileştirilmesinde yaşanan farklılıklara ve toplumdaki bilgilendirme ile algılamadaki farklılıklara dayanmaktadır [14, 65]. Ayrıca hem duodenal ülser hemde mide kanserinde risk arttırıcı bir faktör olarak bilinen CagA *H. pylori* proteininin pozitif olduğu suşların prevalansı gelişmişlik düzeyi ile ilişkili olarak ülkeden ülkeye farklılıklar göstermektedir. Gelişmemiş ülkelerde *H. pylori* suşları CagA+ iken gelişmiş ülkelerde CagA-’dir [52].

2.1.4 *Helicobacter pylori* Bulaşma Yolları

H. pylori edinimi çevresel kaynaklı gerçekleştiği özellikle *H. pylori* edinimi hayvanlardan, içme ve atık sularından kaynaklandığı belirtilmiştir. Bulaşma genellikle çocukluk çağında olduğu düşünülmektedir fakat bulaş yolu kesin olarak ortaya konmamıştır. Hijyenik koşulların kötü olduğu yerlerde yaşam, kontamine besinlerle temas, kalabalık yaşam koşullarında prevalansın yüksek olması fekal-oral yolla bulaştığını göstermektedir [66, 67].

Enfeksiyon Kaynağı Olarak; Hayvanlar

Yayınlanan iki çalışma ile *H. pylori*’nin ilk olarak zoonoz olarak düşünülmüştür. Çalışmalara göre mezbaha çalışanlarında, hayvan ve hayvansal ürünlerle ilgilenen deneklerde enfeksiyon prevalansı hayvan ve hayvansal ürünlerle ilgilenmeyen diğer deneklere nazaran daha yüksek çıkmıştır [68, 69]. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise bu bulgunun *Campylobacter jejuni* gibi diğer gastrointestinal organizmalara karşı antikorlar arasındaki çapraz reaktiviteden kaynaklandığını savunmuştur [70, 71]. Deneysel olarak germsiz ve patojen içermeyen domuzlarda *H. pylori* kolonileştirilmesine rağmen mezbaha domuzlarında *H. pylori*

saptanamamıştır [65, 72, 73]. Diğer bir çalışma koyun ve çoban köpeği arasında temas ilişkisine dayalı pozitif bir korrelasyon olduğunu bildirmişlerdir [74]. Bu çalışma ile *H. pylori* döngüsünün çevre, hayvanlar ve insan şeklinde geliştiği sonucuna varmışlardır [74]. Koyun sütünden *H. pylori* izole edimesi ile de *H. pylori* atalarının koyunlardan insanlara bulaştığı teorisi öne sürülmüştür [75]. Kedi ve köpeklerin midesinde spiral bakteriler uzunca bir süredir bilinmektedir fakat kedi ve köpeklere ait bakteri türleri ve prevelansları ile ilgili yeterince çalışma yoktur. Yapılan çalışmalarda kedilerde *Helicobacter heilmannii* tarafından sıklıkla enfekte olduğu fakat *H. pylori* ile arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır [76].

Enfeksiyon Kaynağı Olarak : Çevre

Helicobacter pylori'nin spiral ve kokoid formlarının konakçı dışında da varlıklarını sürdürebilmeleri literatürde bulunan çalışmalarda yer almaktadır. Peru, Lima'da yapılan bir çalışmada 241 içme suyu örneğinin 49'unda *H. pylori* ile enfekte olduğu belirlenmiş ve düşük sıcaklıklarda *H. pylori*'ye daha az rastlanırken pH'nın yüksek olduğu sulara ise daha fazla *H. pylori* saptanmıştır [77]. Diğer bir çalışma ise *H. pylori*'nin tatlı su kaynaklarında 1 yıla kadar yaşayabildikleri de göstermiştir [78]. Literatürde bir çok çalışma *H. pylori*'nin içme ve atık sularında kokoid formları tespit edilmiş ve su ile indüklenen *H. pylori* kokoid formlarının virülans özellikleri azalsada üreaz aktivitesine devam ettiği ve epitelyal hücrelere yapışma yeteneğinin aynı kaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca su ile indüklenen kokoid formları farelerde mide mukozasında kolonileşme ve gastrit oluşmasına neden olduğunda bildirilmiştir [79]. *H. pylori* 30-37°C' sıcaklıklarında yaşayabilmektedir. Fakat bazı çalışmalar göstermiştir ki 30°C' altındaki sıcaklıklarda taze meyve ve sebze, taze et ve bazı süt [80] ürünlerinde hayatta kalabilir. *H. pylori* daha düşük sıcaklıklarda hayatta kalabilmektedir [80, 81]. Tüm bu çalışmalar *H. pylori* enfeksiyonu çevresel etmenlerle yayıldığını açıkça göstermektedir.

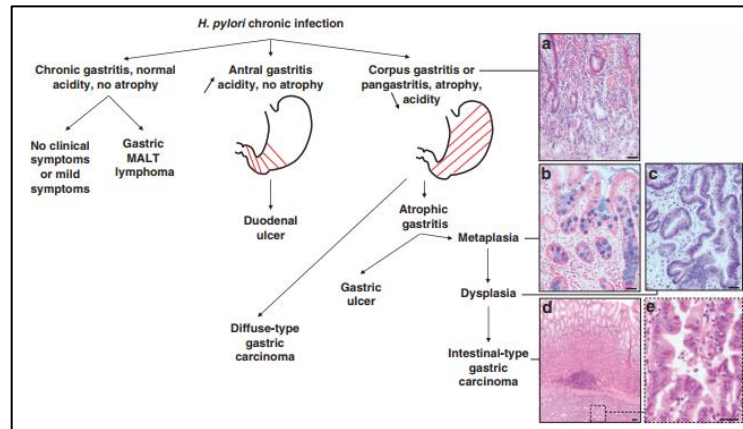
Enfeksiyon Kaynağı Olarak : İnsan

Günümüzde *H. pylori*'nin ana konağının insan olduğu bilinmektedir ve *H. pylori*'nin bulaşmasında en muhtemel yollar dışkı-ağız ve ağız-ağız yolları olduğu düşünülmektedir. *H. pylori*'nin dışkıdan, diş plağı ve tükürükten izole edilmesi bu yollarla bulaştığı görüşünü kanıtlar niteliktedir. Dental plaklarda *H. pylori*'ye

rastlanması oral-oral bulaşı olasılığını arttırmaktadır [66, 67, 82]. Enfeksiyonun görülme sıklığının gastroenterologlarda, endoskopi hemşireleri ve diş hekimlerinde yüksek olması bulaşmanın gastro-oral yol ile olabileceğini göstermektedir [83]. Ayrıca *H. pylori*'nin içme yada atık sulardan ve feçesten izolasyonu fekal-oral bulaşı yolunu doğrulamaktadır [84]. Aile içi yakın temasla *H. pylori* enfeksiyonunun bulaşma olasılığı bulunmaktadır. Enfekte kişilerin birlikte yaşadığı diğer aile fertlerinde *H. pylori* enfeksiyon oranının yüksek çıkması insandan insana bulaşmanın mümkün olduğunu göstermektedir[85]. Fakat cinsel yolla bulaşan herhengi bir *H. pylori* enfeksiyon vakası bildirilmemiştir. Ayrıca, endoskopi işlemi sırasında *H. pylori* ile enfeksiyon bulaşma ihtimali olabilir. Bu durum tedavi sonrasında endoskopi ile kontrol edilen hastalarda enfeksiyonun yeniden oluşmasına sebep olabilmektedir[85].

2.1.5 *Helicobacter pylori* ve Neden Olduğu Hastalıklar

Yapılan çalışmalar kronik aktif gastrit, peptik ülser, mide karsinomu ve MALT lenfoma (Mucosal Associated Lenfoid Tissue) ile *H. pylori*'nin ilişkisini ortaya koymuştur [12]. *H. pylori* ile enfekte bireylerin Şekil 2.4'de gösterildiği üzere %1-10'unda peptik ülser gelişirken, mide kanseri %0.1-3 ve gastrik mukoza ilişkili lenfoid ise %0.01'den daha azında görülür [13]. *H. pylori* ile enfekte bireylerde hastalık asemptomatik seyretsede hastaların bir kısmında dispeptik yakınmalar mevcuttur. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) Uluslar arası kanser araştırma ajansı *H. pylori*'yi 1.grup karsinojen olarak sınıflandırmıştır [13].



Şekil 2. 4 *H. pylori* ve enfeksiyon sonrası gelişebilecek hastalıkların şemasal gösterimi [86]

Peptik Ülser

Mide mukus tabakası mideyi asitten koruyan birincil bariyerdir. Bu bariyerin aşılması gastrit ve ülserle sebep olmaktadır. *H. pylori*'nin gastrit ve ülserle ilişkisinin açıklanmasından önce stres, acı ve baharatlı yeme alışkanlıkları gibi durumların gastrit ve ülserle sebep olduğu düşünülmekteydi. Günümüzde bir çok çalışma gastrit ve ülserin en büyük sebebi *H. pylori* bakterisinin olduğunu doğrulamıştır. Gastrit ve ülserle sebep olan diğer etmenler ise ağrı kesiciler, toksik maddeler, cerrahi girişimler, mide mukozasını bozan çeşitli hastalıklardır [87]. *H. pylori* gastriti, duodenal ülserli olguların %95-100'ünde bulunduğu bildirilmişken mide ülserli olguların ise %75-85'inde bulunduğu gösterilmiştir[83]. Peptik ülser kronik tekrarlayan bir hastalıktır. *H. pylori* tedavi sonrası peptik ülserin hızlı bir şekilde azalması peptik ülser ve *H. pylori* arasındaki ilişkinin en önemli kanıtıdır [88]. Mide aside azaltıcı ilaçların kullanımı peptik ülser yaralarının iyileştirilmesinde oldukça etkilidir [83].

Kronik Aktif Gastrit

Mide mukozal hasarının gastritten atrofiye doğru ilerlemesinin mekanizması net olmamakla birlikte mide kanseri genellikle atrofik gastritten gelişmekte ve mekanizma multifaktöriyeldir. Atrofik gastritli bireylerde mide kanser gelişme olasılığı sağlıklı bireylere göre 5-9 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. *H. pylori* ile enfekte kişilerde hemen hepsinde konik gastrit oluşmaktadır. *H. pylori*'nin neden olduğu tekrarlayan apoptosis sonucu atrofik gastritis indüklenmektedir. Fakat *H. pylori* ile enfekte tüm bireylerde kronik aktif gastrit gelişmesine rağmen, tüm enfekte bireylerde atrofik gastrit ve malignite gelişmemektedir [89].

MALT Lenfoma

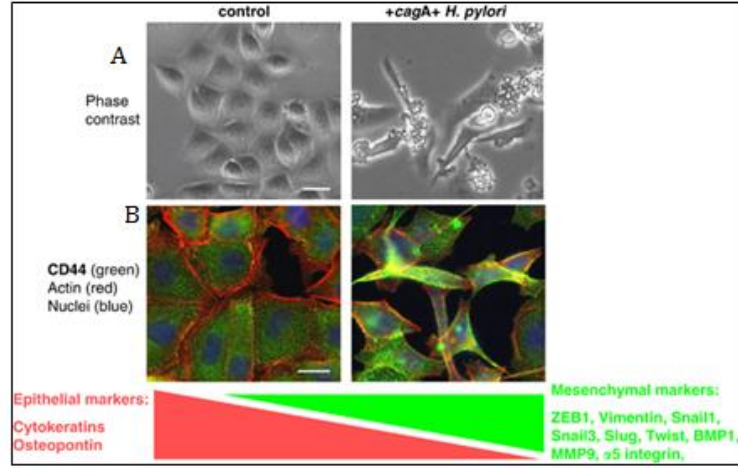
MALT lenfoma (mukozal ilişkili lenfoid dokusu) olarak bilinen mukozaya özgü lenfoid dokularda gelişen lenfoid türüdür. MALT lenfoma midenin tüm bölümlerinde gelişebilmektedir fakat en sık görüldüğü bölge midenin antrum bölgesidir. Genelde düz infiltrative lezyon şeklinde görünmektedir. *H. pylori* mide lenfomaları mide karsinomlarına benzemektedir ve aşırı kilo kaybı, anemi sık görülmektedir. MALT lenfoma endoskopide tümör, kitle lezyon şeklinde

görülmektedir [90]. Bazı *H. pylori* suşları CagA protein eksprese eder ve *H. pylori* CagA+ suşları diğer suşlara göre daha agresif, önemli derecede inflamasyona, atrofiye ve intestinal metaplaziye neden oldukları ve ülser, mide adenokarsinomları ile ilişkili oldukları belirlenmiştir. MALT lenfomalı hastların yüksek oranda *H. pylori* CagA+ suşu ile enfekte olduğu bildirilmiştir [91, 92]. MALT lenfoma tedavisi ise *H. pylori* eradikasyonu, kemoterapi, radyoterapi ve combine tedavilerdir [90].

Mide Kanseri (Adenokarsinom)

Mide kanseri (adenokarsinom) dünya çapında her yıl ortalama 700.000 kişinin hayatını kaybetmesine neden olan gelişmekte olan ülkelerde erkeklerde en sık kadınlarda ise en sık görülen 3. ölüm nedenidir. Erkeklerde görülme olasılığı kadınlara göre iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Gelişmiş ülkelerde son 10 yılda mide kanseri insidansında önemli bir azalma görülmüştür. Mide kanseri dünyadaki diğer kanser türleri arasında en sık görülen 4. Kanser türüdür [93]. Mide adenokarsinomu en yaygın malignlerden birisi olmasına rağmen kanserin etyolojisi tam olarak açıklanmamıştır. *H. pylori* mide tümörlerinin %3'ünü oluşturan mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoma gelişiminde onkojenik rol oynamaktadır. Ayrıca *H. pylori* ile enfekte kişilerde gastrik adenokarsinom ve MALT lenfoma riski enfekte olmayan bireylere göre 3-6 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır[94]. *H. pylori* enfeksiyonunun mide kanseri ile ilişkisi temelde malignitenin intestinal tip ve distal formlarını içermektedir. Farklı epidemiyolojik ve klinik özelliklere sahip proksimal (kardiyak) ve distal (kardiyak olmayan) iki ana gastrik adenokarsinom bölgesi bulunmaktadır [95]. Kardiyak olmayan mide kanseri vakalarında düşük sosyoekonomik durum, sigara kullanımı, tuzlu ve baharatlı yiyecek tüketimi, düşük meyve sebze tüketimi ve ailenin mide kanseri geçmişi gibi risk faktörleri etkili olurken, distal mide kanseri vakalarında bu faktörlerden etkilenmeksizin bir artış gözlemlenmiştir. *H. pylori* ile enfekte tüm bireylerde gastrit gelişirken, bakterilerin epitel hücrelerine yapışması enflamasyonu indükleyerek nötrofillerin bölgeye göçüne ve ardından B ve T lenfositlerinin, makrofaj ve plazma hücrelerinin enflamasyon bölgesinde artışına neden olur [95]. Epitel hücre hasarı karsinogenezde önemli bir rol oynayan reaktif

oksijen ve azot üretimine neden olmaktadır. *H. pylori* mukozal enflamasyonun indüklenmesinde ve karsinogenezde etkili olan CagA, PAI, VacA, OipA, Bab A ve Tip IV sekresyon sistemi bileşenleride dahil olmak üzere bir çok virülans proteinleri ve genleri tanımlanmıştır [96]. CagA, PAI tarafından kodlanan bakteriyel onkoproteindir. Mide kanseri epidemiyolojik çalışmalarda belirteç olarak kullanılmaktadır CagA-pozitif suşlar, cag-negatif suşlara göre atrofik gastrit ve gastrik adenokarsinom ile daha sık ilişkilidir [97]. CagA-pozitif *H. pylori* enfeksiyonu mide mukozasında ve kanserde siklo-oksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonunu arttırdığı ve bu enzimin hücre proliferasyonunu artırarak, apoptozu inhibe ettiği ve malign hücrelerin istilacılığını artırarak karsinogenez desteklediği bildirilmiştir [96]. Epitelial hücre zarına girdikten sonra, vakuol oluşumunu indükleyen VacA protein epitel hücrelerinde apoptoza neden olan mitokondriyal etkilere neden olmaktadır. OipA, gastrik mukozada artmış bir enflamatuvar yanıtla ilişkilidir. *H. pylori*'nin BabA ile gastrik mukozal hücrelere yapışması ve kolonizasyonu için gereklidir [95]. Son çalışmalar, kemik iliği kaynaklı hücrelerin (mide kök hücrelerinin) tümör ilerlemesindeki olası rolünü göstermektedir [94]. Nowell ve Vogelstein araştırmacıları tarafından öne sürülen klasik gastrik karsinogenez modelinde mide mukozasının kronik inflamasyonuna bağlı olarak kanser gelişiminden sorumlu olan genetik olay kaskadının *H. pylori* tarafından teşvik edilmesi ile atrofik gastrit, bağırsak metaplazisi ve displazi ile sonunda kanserin ortaya çıktığı geleneksel bir modeldir. Tümör ilerlemesi sırasında transforme hücreler daha fazla proliferatif, daha agresif fenotipli ve genetik olarak değişken klonların ortaya çıkmasına izin veren yeni mutasyonlar kazanmaya devam eder [97]. Şekil 2.5'de gösterildiği gibi in vitro deneylerde epitel hücreleri ile inkübe edilen *H. pylori*'nin epitel hücrelerinde kanser kök hücre markırları olan CD44'ü aşırı eksprese etmesine neden olduğu, kanser kök hücre göç etme ve istila özelliklerini sergileyen bir dönüşümü indüklediği gösterilmiştir [86].



Şekil 2. 5 *H. pylori* ile infekte ve infekte olmayan epitel hücrelerinin morfolojik değişimi (A) ve CD44 markırının ekspresyon düzeylerindeki değişiminin floresans mikroskop görüntüleri (B) [86]

2.1.6 *Helicobacter pylori* Tanı Yöntemleri

H. pylori enfeksiyonunun tanılanmasında invaziv (cerrahi işlem gerektiren) ve invaziv olmayan (cerrahi işlem gerektirmeyen) yöntemler mevcuttur. İnvaziv yöntemler; mide biyopsi örneğinin direct tetkiti, kültür, histolojik inceleme ve hızlı üreaz testi gibi yöntemlerdir. İnvaziv olmayan yöntemler ise; üre nefes testi, serolojik yöntemler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi testlerden oluşmaktadır [84, 98].

İnvaziv Yöntemler

1. Direkt Tetkit, Kültür ve Histolojik İnceleme

Direkt Tetkit : Biyopsi örnekleri lam üzerinde ezilerek yayma hazırlanmaktadır. Bu yaymalar Gram boyama ile boyanır ve bu inceleme diğer histolojik incelemelere göre fiksasyon işlemi gerektirmediğinden dolayı daha hızlı sonuç vermektedir. Hazırlanan yayma preparatlarında *H. pylori* direct olarak görülebilmektedir[98].

Kültür : *H. pylori* tanılanmasında bakterinin karakteristik özelliklerinden yararlanılmaktadır. *H. pylori* oksijene ve sıcaklığa duyarlı olup canlılığını çabuk kaybetmektedir. Örneklerin kültürü uygun taşıma ortamına hızlıca alınmalı ve kültürü yapılmalıdır. Gliserol içeren besiyeri ortamlarının mide biyopsi örneklerinin hem taşınmasında hem de saklanması kullanılmaktadır. Örneklerin taşınması için genellikle FBS ilave edilmiş Brain Heart Infusion (BHI),

Stuart taşıma besiyeri (Stuart Transport Medium), %20 gliserol içeren Brucella Broth veya %20 gliserol içeren Cysteine-Albimi Broth besiyerleri kullanılmaktadır [99, 100]. Endoskopi sırasında alınan örnekler daha sonra uygun sıcaklık ve miroaerofilik ortamlarda kültüre edilir. At kanı, at serumu yada koyun kanı içeren Skirrow agar, BHI agar, çikolata agar, Brucella agar veya Colombia agar gibi besiyerlerinde ekimi yapılan örnekler %5-10 CO₂ içeren ortamlarda 37 °C'de 5-7 gün süre ile kültürü yapılır. Üreme olan örneklerde ise üreaz, katalaz ve oksidaz enzim testleri uygulanarak bakterinin tanımlanması yapılır [84, 98, 101-103]. Son yıllarda diğer kültür yöntemlerine nazaran mikropapiller kültür yöntemi; klasik kültür, hızlı üreaz testi ve histopatolojik inceleme (HE) yöntemlerine göre çok daha duyarlı (%96) olduğu gösterilmiştir [54].

Histolojik İncelemeler : Histolojik incelemeler *H. pylori*'ye bağlı gastrik mukoza lezyonlarının tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında oldukça önemlidir. Histolojik incelemeler gastroduodenal patolojinin düzeyini ve premalign değişimlerin tespitinde kullanılmaktadır. Ayrıca kronik aktif gastrit ve peptik ülser şüphesi taşıyan hastalarda endoskopi ile alınan mide doku örneklerinde *H. pylori* tanımlanabilmektedir [84]. Genellikle biyopsi örnekleri midenin antrum ve korpus bölgelerinden alınır ve alınan örnekler formalin ile fiksasyon işlemine maruz bırakılmaktadır. Örnekler hemotoksilen-eosin (HE) boyaması, Giemsa boyama, Warthin-Stuart yada Modifiye Steiner gümüş boyama yapılmakta ve örnekler mikroskop altında incelenerek *H. pylori* enfeksiyonu belirlenmektedir [84, 98, 103].

2. Hızlı Üreaz Testi (CLOtest : Campylobacter Like Organism test)

Fenol red ve üre içeren CLO test ilk ticari üreaz testidir. %90'dan fazla duyarlılığa sahip bu test üreaz pozitif olan *H. pylori*'nin tanımlanması için kullanılmaktadır. Bu testte *H. pylori* tanımlanması gerçekleşen renk değişimi ile belirlenmektedir. Bu renk değişimi, mide biyopsi örneklerinde bulunan *H. pylori* bakterisinin sahip olduğu üreaz enziminin üreyi amonyağa parçalaması sonucunda artan pH'a bağlı gerçekleşmektedir. Bu test *H. pylori* için 1 saatte pozitif sonuç vermesi ile diğer bakterilerden ayrılmaktadır[84]. Ancak bu testte hastalara uygulanan antibiyotik tedavisi, bizmut içeren bileşiklerin ve PPI'lerin kullanılması bakteri miktarını

geçici olarak azaltacağından yalancı negatif sonuçların çıkması mümkün olmaktadır. Ayrıca *H. pylori* yoğunluğunun az olduğu enfeksiyonlarda çıkan negatif sonuçlar *H. pylori* enfeksiyonunun yokluğunu göstermemekte yada başarılı bir eradikasyonun yapıldığını belirtmemektedir. Ticari kitler ekonomik, yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olması açısından biyopsi örneklerinde *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu testlerle *H. pylori* enfeksiyonu kullanılan kite ve bakteri yoğunluğuna bağlı olarak 1-24 saatlik bir sürede yanıt alınabilmektedir [84, 103].

3. Moleküler Tanı Yöntemleri

Mide biyopsi örneklerinde *H. pylori*'nin 23S rRNA, vacA, cagA, üreA, üreB, üreC ve hpaA gibi farklı hedef genlerine yönelik yapılan PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizleri yüksek özgüllüğe sahiptir. Ancak bu testler ekonomik olmaması, teknik zorluklar ve yalancı negatif sonuçların çıkabilmesinden dolayı yaygın olarak kullanılmamaktadır. PCR analizinin avantajlarından biri noninvaziv olarak tükürük, dışkı, gastrik sıvısı ve safra gibi bakteri sayısının az olduğu durumlarda bakteri DNA'sının saptanarak *H. pylori* tanısı yapılabilmesidir [84, 104]. Moleküler yöntemler dirençli suşlarda meydana gelen mutasyonların ve epidemiyolojik açıdan hastalığın yayılma yollarının belirlenmesinde, *H. pylori* suşları arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesi ve patojenitenin saptanmasında daha fazla kullanılmaktadır. Antibiyotik tedavisinden sonra gastrik mukozadaki bakteri sayısı diğer tanı yöntemlerinde tespit edilemeyecek kadar az olabileceğinden PCR yöntemi bu durumda tercih edilebilecek yöntemlerden biridir. Testin doğruluğunu seçilen primerler, hedef DNA, örneğin hazırlanması ve bakteri yoğunluğu gibi parametreler etkilemektedir [84, 103, 104].

İnvaziv Olmayan Yöntemler

1. Üre Nefes Testi (ÜNT)

Bu test endoskopik müdahalelere gerek kalmadan hem *H. pylori* enfeksiyonun tanılanmasını hemde tedavi sonrası tedavi başarısının belirlenmesini mümkün kılan duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir testtir. Bu testte Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanan iki tip radyoaktif C₁₃ ve C₁₄ karbon

atomları kullanılmaktadır. Radyoaktif C₁₃ ve C₁₄ karbon atomları ile işaretlenmiş ürenin ağızdan alınması ve işaretli ürenin *H. pylori* tarafından CO₂'de parçalanarak solunum sırasında nefes yolu ile dışarı verilmesi sırasında saptanmasına dayanmaktadır. İşaretli ürenin mideye ulaşmasından itibaren 30 dakika sonra solunum ile verilen hava toplanarak kitle spektrometresi ile ölçüm yapılır. Üre nefes testinin radyoaktif içeriği nedeni ile çocuklarda ve hamilelerde kullanımı önerilmemektedir. Diğer yöntemlerde *H. pylori* incelemesi örneğin alındığı bölgeye bağlı iken Üre Nefes Testinde *H. pylori* açısından genel bir değerlendirme yapılabilmektedir. Fakat bu test için uygun yoğunlukta bakteri sayısının bulunması test için gereklidir. Tedavi sonrasında azalan bakteri sayısı yalancı negatif sonuçların çıkmasına neden olabilmektedir [84, 103].

2. Serolojik Testler

H. pylori enfeksiyonunda gastrik mukozada lokal immün yanıtın yanı sıra sistemik bir IgG ve IgA yanıtı da meydana gelmektedir. Ayrıca enfeksiyon mide salgısında IgM ve IgA düzeylerinde artışlara neden olur. Enfeksiyonun tanılanmasında bu antikorlar kullanılmaktadır. Kanda anti *H. pylori* IgG, IgM ve IgA antikorlarının incelenmesi ucuz ve hızlı testlerdir. Serolojik yöntemler daha çok epidemiyolojik çalışmalarda ve tedavinin izlenmesinde sıkça kullanılmaktadır. Tedavinin başarılı olması azalan bir IgG yanıtı oluştururken, tekrar eden enfeksiyonlarda bu yanıt artmaktadır. Serolojik testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü diğer testlere nazaran daha yüksektir. ELISA testlerinin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %95 gibi yüksek oranlara sahiptir. Serolojik yöntemler ve bu yöntemlerde bakılan parametreler olan CagA (sitotoksin ilişkili gen A), VacA (vakuol yapıcı sitotoksin A), Lewis antijeni gibi proteinlerin varlığının saptanması ve bu proteinleri kodlayan genlerin PCR yöntemi ile belirlenmesi ile gerçekleştirilmektedir [84, 103, 105, 106].

3. *H. pylori* Gaita Antijen Testi

H. pylori enfeksiyonunun tanılanmasında diğer bir test ise dışkı örneklerinde bulunan *H. pylori* antijenlerinin bu antijene spesifik monoklonal antikorlarla kaplı koloidal lateks partikülleri ile tepkimeye girmesi ve oluşan kompleksin reaksiyon bölgesinde renkli bir bant oluşturması temeline dayanmaktadır [84].

4. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR yöntemi *H. pylori* tanılanmasında kullanılan oldukça duyarlı ve özgül testlerden biridir. Bu testte *H. pylori*'nin 16S rRNA'sının PCR yöntemi ile çoğaltılması yöntemine dayanır. PCR yöntemi ile tükürük ve nongastrik sıvılarda bile *H. pylori* tanısı yapılabilir. Fakat bu yöntemde yalancı pozitif ve yalancı negative sonuçların çıkabildiği bilinmektedir [84, 103].

Tablo 2. 1 *H. pylori* Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması [84]

Metod	Örnek	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Pozitif Prediktif Değer(%)	Negatif Prediktif Değer (%)
Hızlı serolojik	Serum	95	85	91	98
Laboratuarda yapılan serolojik testler (ELISA)	Serum Mide sıvısı Dışkı	95 95 95	95 100 95	96.8	100
Üre nefes testi	Nefes	95-98	95-98	100	100
Biyopside üreaz testi (CLOtest)	Mide	90-95	98	100	87.5
Histoloji (Giemsa, HE)	Mide mukozası	98	98	99.2	94.5
Kültür (biyopsi)	Mide mukozası	90-95	100	100	97.7
Kültür (dışkı)	Dışkı	30-50	100	100	96
PCR	Dışkı, Tükürük, Mide suyu Diş plak ve taşları	95	95	100	97.7
HpSA (H.pylori stool antigen)	Dışkı	97	99	100	96

Tablo 2.1 'de *H. pylori* enfeksiyonunun tanısına yönelik farklı yöntemler duyarlılık, özgüllük, süre, maliyet ve zaman gibi parametreler ile kıyaslanmıştır. Hızlı serolojik testlerde kandan elde edilen serum sıvısı test edilmektedir ve sonuç var ya da yok şeklinde alınmaktadır. 10 dakika gibi bir sürede sonuç alınabilmektedir fakat laboratuvarlarda yapılan daha ayrıntılı serolojik testlerde (ELISA) antikor konsantrasyonları saptanabilmektedir. Üre nefes testi hızlı, ucuz ve basittir fakat radyoaktif C_{13} ve C_{14} karbon atomlarının kullanımı nedeniyle çocuklar ve hamilelerde önerilmemektedir. Biyopsi örneklerinde üreaz testi (CLO) 20 dakikada sonuç alınabilmektedir fakat biyopsi yapılması gerekliliği bu yöntemin

dezavantajlarından biridir. Histolojik testler kesin sonuç veren basit testlerdir. Biyopsi örneklerinin kültürünün yapılması uzun ve zahmetli bir yöntem olacağından histolojik tanı yöntemleri kültür yöntemine göre daha hızlı ve basittir. PCR yöntemi tükürük, mide sıvısı ve safra sıvıları gibi biyopsi gerektirmeyen örneklerde düşük sayıda bakteri varlığında bile enfeksiyonun tanısının koyulmasında oldukça avantajlıdır fakat bu yöntem diğer yöntemlere göre pahalı bir yöntemdir. *H. pylori* kültür yöntemi özgüllüğü yüksek olmasına karşın duyarlılığı %90-95 arasında değişmekte, dışkı örneklerinden yapılan kültürlerde ise bu oran %30-50'lere düşmektedir. Seçilecek yöntem enfeksiyonun tanılanmasını, tedavi sonrası takibi, ekonomiklik, zaman ve kolaylık gibi parametreler göz önünde bulundurularak seçilmelidir [84].

2.1.7 *Helicobacter pylori* Tedavi Yöntemleri

Klasik Tedavi: *H. pylori* penisilin, ampisilin (AMP), amoksisilin (AMX), eritromisin, gentamisin, sefalosporinler, tetrasiklin (TET), florokinonlar, imipenem ve metronidazol (MET) gibi antibiyotiklere duyarlı bir bakteridir. Ayrıca kolloidal bizmut substrat ve bizmut subsalisilat bileşiklerinde bakteri üstünde etkisinin olduğu bilinmektedir. *H. pylori* enfeksiyonunda eradikasyon olasılığı tekli antibiyotiklerde %50-70 iken ikili antibiyotik kullanımında bu oran %90'lara kadar çıkmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonu tanılanan hastaları tedavi etmek için uluslararası kurallar gereği, birinci basamak tedavi uygulanmaktadır. Birinci basamak tedavi olan üçlü tedavi bir proton pompa inhibitörü (PPI), klaritromisin (CLA) ve amoksisilinin (AMX) 7-14 gün boyunca uygulanmasından oluşmaktadır [107]. Fakat biri basamak tedavinin başarı oranı artan klaritromisin direncine bağlı olarak %80'den daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle ikinci basamak tedaviler önerilmiştir. İkinci basamak tedavi iki yada üç farklı antibiyotik (AMX, CLA, MTZ, TET) kombinasyonunun ve bir PPI'nin kullanıldığı tedavidir [16, 108]. Bu klasik tedavinin başarı şansı %85-95 iken zamanla bu oran azalmıştır. Klaritromisin direncinin %20 ve üstü olduğu bölgelerde Bizmut salisilat, tetrasiklin, metranidazol kombinasyonu kullanılmış fakat istenilen eradikasyon oranına ulaşamamıştır. Bu nedenle günümüzde 3'lü tedavinin yeterli

olmadığı bölgelerde 4'lü tedavi (PPI+Bizmut+iki antibiyotik ya da PPI + üç antibiyotik) uygulanmaktadır [108, 109].

Günümüzde kullanılan tedavi kombinasyonları şu şekildedir;

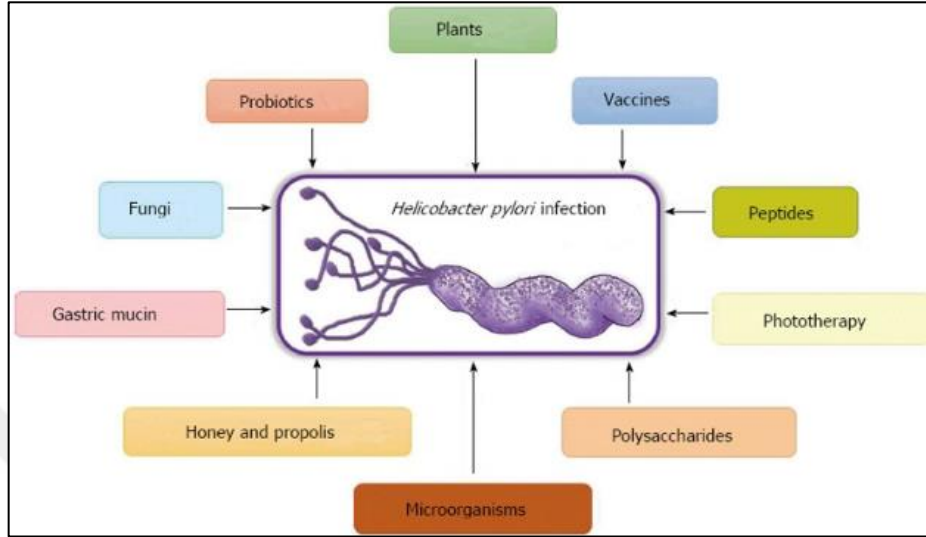
1. Klasik bizmut üçlü tedavisi
2. *H. pylori* üçlü tedavi
3. Ranitidin-bizmut sitrat (RBC) tedavisi
4. Bizmut dördütlü tedavi [84].

Tablo 2. 2 *H. pylori* güncel tedavi kombinasyonları [84]

Kombinasyonlar	Süre		Eradikasyon (%)
1	RBC 4x1 tab. AMX 4x500 mg + MET 4x250 mg	2 hafta	80
2	RBC 4x1 tab. TET 4x500 mg + MET 4x250 mg	2 hafta	80+
3	Omep 2x20 mg.+ AMX 4x500 mg	2 hafta	70
4	Omep 2x20 mg. AMX 4x500 mg + MET 4x250 mg	2 hafta	80+
5	Omep 2x20 mg. CLA 4x250 mg + MET 4x250 mg	1 hafta	90
6	Omep 2x20 mg. CLA 4x250 mg + AMX 4x500 mg	2 hafta	90
7	AMX 4x500 mg.+ MET 4x250 mg+H2SA 2x150mg	2 hafta	70
8	CLA 4x250 mg + AMX 4x500 mg	2 hafta	80+

Alternatif Tedaviler : *H. pylori* ile enfekte bireyler yaşamları boyunca bu patojenle enfekte olurlar. Bakterinin neden olduğu enfeksiyonun önlenmesi veya ortadan kaldırılması için bir çok antibiyotiğe ihtiyaç vardır. Fakat antibiyotik tedavilerinin maliyeti, yan etkileri ya da bakterinin geliştirdiği direnç ve enfeksiyonun tekrar nüks etmesi gibi birçok problem günümüzde hala çözülmemiş değildir [108]. Enfeksiyonun önlenmesi ya da yok edilmesi ile bu problemler yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Son yıllarda Şekil 2.6'da da gösterildiği gibi bazı bitkiler, probiyotikler, nutrasötikler gibi doğal kaynakların *H. pylori*'ye karşı koruyuculuğu ve enfeksiyonun yok etme özellikleri araştırılmaktadır. Ek olarak bazı mikroorganizmalar, peptidler, polisakkaritler ve nanopartiküllerin de etkileri araştırılmaktadır. Alternatif

tedavilerin bakterileri yok etmede etkili olmadığı, ancak düşük bakteri seviyelerini koruduğu gösterilmiştir. Fakat bazı antibiyotiklerin yan etkilerinin önlenmesinde ve immün yanıtın modellenmesinde yada gastroproteksiyonda ve genel sağlığın teşviki için faydalı oldukları savunulmuştur [108].



Şekil 2. 6 *H. pylori* enfeksiyonunda kullanılan alternative tedaviler [108]

H. pylori ile alternative tedavide bitkiler üzerinde oldukça fazla araştırma yapılmaktadır. *H. pylori*'ye karşı daha aktif moleküller elde etmek için biyolojik bileşiklerin izolasyonu ve saf bileşiklerin tanımlanmasına odaklanılmıştır. Bu fitokimyasal çalışmalardan, elde edilen anti-*H. pylori* aktiviteye sahip moleküller kateşinler, epiglo-katechin gallat, terpen plaunotol, flavonoid kaempferol, alkaloid triptonthrin, sülfotan, 4-vinil-2,6-dimetoksifenol, kanolol, ve β -artesiklopropilmetr gibi bileşiklerdir. Ayrıca bitki ekstraktlarının *H. pylori* üzerindeki etki mekanizmasını açıklamaya çalışan araştırmalar mevcuttur. Bazı çalışmalar bitki ekstraktlarının *H. pylori*'nin üreaz, yapışma, motilite, vakuolizasyon veya metabolik enzimler gibi bakteri virülans faktörleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Sarımsak, brokoli, yeşil çay, kırmızı şarap, bal, propolis, probiyotikler, bazı mantar türleri, peptidler ve polisakkaritlerin *H. pylori* enfeksiyonuna etkisi incelenmiş ve enfeksiyonun yok edilmesinde yeterli olmasada umut vaad ettiği düşünülmektedir. Alternatif tedavi arayışında Nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte son yıllarda nanopartiküllerin *H. pylori* üzerine etkileri ve enfeksiyonunun giderilmesi için yapılan araştırmalar artış göstermektedir [108].

2.1.8 Antibiyotik Tedavisi Başarısızlığının Nedenleri, Antibiyotik Etki ve Direnç Mekanizmaları

Peptik ülser hastalığının bulaşıcı bir ajandan kaynaklandığının keşfedilmesi ile günümüze kadar en uygun tedavi arayışı sürmüş ve birçok antibiyotik önerilmiştir. Marshall ve Warren'ın ilk çalışmalarından itibaren başlıca tinidazol ve metronidazol olan ve anaerobic bakteriler için kullanılan 5-nitroimidazollerini kullanmışlardır. Takip eden yıllarda ise bir makrolid bileşiği olan klaritromisin ve bir β -laktam bileşiği olan amoksisilin başarı ile kullanılmıştır [110]. Fakat mide asidinde aktif olarak çalışabilen sınırlı sayıda antibiyotik bulunduğundan enfeksiyonun tedavisinde zorluklarla karşılaşmaktadır.

1. Tedavide karşılaşılan en büyük sorunlardan biri dirençli bakterilerin gelişimidir. Son yıllarda artan antibiyotik direnci tedavilerin başarı oranlarını düşürmektedir. Antibiyotik direncinin artması, antibiyotik tedavisinin başarısızlığına, *H. pylori* enfeksiyonunun tekrar nüksetmesine neden olmakta ve enfeksiyonun tedavisinde farklı yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.
2. İlaçların zamanında kullanılmaması, tedavi süresinin uygun olmaması yada tedaviyi düzenleyen hekimin bu konuda yeterince bilgisinin olmaması. Hasta tarafından tedaviye uyumsuzluk, en az üç ilacı içeren tedavinin karmaşıklığı, hastanın tedaviye tedav etmemesi ve antibiyotiklerin yüksek maliyeti gibi sorunlar [108].
3. Düşük pH'larda aktive olan PPI'lar asit sekresyonunu azaltarak enfeksiyonun yarattığı mukozal hasarların giderilmesi ve antibiyotiklerin çalışabileceği uygun pH ortamını yaratmaktadır. Fakat PPI'ların yarılanma ömrünün düşük olması (1-1,5 saat) ya da bazı PPI'ların mide pH'ını 5.5'in üzerine çıkaramaması pH:5.5 'in üzerinde çalışan amoksisilin gibi antibiyotiklerin etkisiz kalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle tedavi başarı oranları düşebilmektedir.

4. Son yıllarda tekrar eden enfeksiyonların ve tedavideki başarısızlığın en önemli nedenlerinden biri olarak *H. pylori*'nin kokoid formuna dönüşmesi olarak düşünülmektedir [111-113].

2006-2009 yılları arasında yayınlanan primer *H. pylori* antibiyotik direnci ile ilgili çalışmaların sistematik bir incelemesinde veriler coğrafi bölge, yaş, cinsiyet ve gastroduodenal patolojiye göre analiz edilmiş ve toplam *H. pylori* antibiyotik direnci, klaritromisin için %17.2, metronidazole için %26.7, amoksisilin için %11.2 olarak belirlenmiştir. Levofloksasin için bu oran %16.2 iken tetrasiklin için %5.9 olarak belirlenmiştir. Avrupa, Asya, Amerika ve Afrika'da klaritromisin, metronidazol ve levofloksasin direncinin prevalansı önemli ölçüde arttığı belirlenmiş, tetrasiklin direnci tüm ülkelerde düşük çıkmıştır (<%3) [114]. Türkiye de ise *H. pylori*'ye karşı gelişen direnç oranları, amoksisilin %0,971, klaritromisin %24,864, metronidazol %33,747, tetrasiklin %3,511 ve levofloksasin %23,769 olarak belirlenmiştir [115].

MACH-1 [116] ve MACH-2 [117] çalışmaları, bir proton pompası inhibitörünün klaritromisin ve metronidazol veya klaritromisin ve amoksisilin ile kombinasyonunun, *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun tedavisi için en etkili ilaç kombinasyonlarından biri olduğu gösterilmiştir. *H. pylori*'nin birincil basamak üçlü tedaviler için kullanılan klaritromisin ve imidazollere duyarlılığı belirgin bir azalma geçirmiştir ve bu antibiyotikleri içeren tedavi rejimlerini izleyen eradikasyon oranı giderek azalmaktadır [118]. Benzer şekilde, ikinci basamak tedavi için kullanılan kinolonlara karşı düşük olan direnç oranları son on yılda artmış, fakat hem amoksisilin hem de tetrasiklin direnç oranları düşük kalmıştır [119]. Furazolidon, bizmut tuzları ve rifabutin gibi alternatif moleküller dünya çapında pek yaygın olmayan ve belirli yan etkileri bilinmeyen moleküllerdir. Bu nedenle direnç mekanizmalarının anlaşılması, tedavi enfeksiyonun tedavi başarısını arttırmak amacıyla daha etkili antibiyotik kombinasyonlarının geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır [120].

Klaritromisin

Minimum inhibitor konsantrasyonları (MİK) diğer moleküller arasında en düşük olan klaritromisin antibiyotiği *H. pylori* tedavisindeki diğer moleküllere kıyasla en

güçlü antibiyotiktir. MİK değerleri; 0,016-0,5 mg/L arasında değişmektedir. Antibiyotik direnci MİK değeri ise ≥ 1.0 mg/L (2-256mg/L aralığında) kabul edilmektedir [121, 122]. Klaritromisin bakterisidal etkisi 50S bakteriyel ribosomal alt üniteye bağlanarak protein sentezini önlemesi ile gerçekleşmektedir [120].

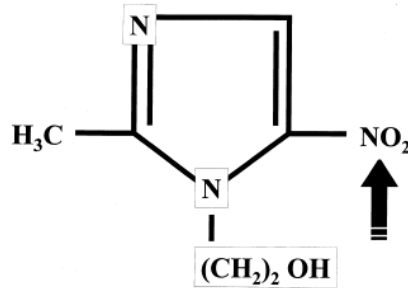
PCR-tabanlı yapılan kapsamlı çalışmalarda klaritromisin direncinin gelişmesinde 23S rRNA'nın V bölgesinde kodlanan peptidiltransferaz bölgesinde gerçekleşen nokta mutasyonların sebep olduğu gösterilmiştir [123]. Bu nokta mutasyonları, klaritromisin ve antibiyotiğin bağlanacağı ilgili protein sentezine ait ribozomal alt ünite arasındaki bağı inhibe etmektedir [123, 124]. Klaritromisin direncinin gelişmesinden sorumlu mutasyonlar sıklıkla 2143 ve 2142 rRNA pozisyonlarında adeninin sitozine geçişi olup gelişmiş ülkelerdeki klaritromisin direncinin %90'ından sorumlu olduğu anlaşılmıştır [125].

Diğer bir direnç mekanizması ise aktif dışa atım (efflux) sistemi olan kazanılmış antibiyotik direncinin önemli nedenlerinden biridir. Ökaryotik ve prokaryotik tüm hücre tiplerinde bulunan ve hücre membranına yerleşmiş pompa proteinleri olan dışa atım sistemleri beş super aileden oluşmaktadır. Bakteri türleri ile ilişkili olarak bu dışa atım pompa proteinleri; ATP Bağlayıcı kaset (ATP Binding Cassette (ABC)), Ana Kolaylaştırıcı (Major Facilitator (MFS)), Çoklu İlaç ve Toksik Bileşikler Ekstrüzyon proteinleri (Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE)), Direnç-Nodülasyon-Bölünüm (Resistance-Nodulation-Division (RND)) ve Küçük Çoklu İlaç Direnci (Small Multidrug Resistance (SMR))'dir. Direnç-Nodülasyon-Hücre Bölümü (RND ailesi), birkaç Gram-negatif bakteride makrolid iç dirençten sorumlu olduğu bilinmekte ve yakın zamanda *H. pylori* için de önerilmiştir [120]. *H. pylori* direncinin geliştirilmesinde dışa atım sistemindeki 4 RND gen kümesinin (HP0605-HP0607, HP0971-HP069, HP1327-HP1329, HP1489-HP1487), rol oynadığı görülmüştür [126]. Bu dışa atılım sistemleri, Phe-Arg- β -naftilamid (PA β N) gibi spesifik Efflux Pompa İnhibitörlerinin (EPI) uygulanmasıyla inhibe edilebilmektedir. EPI uygulanması ile, antibiyotiğin ilgili hücre içinde tutulması sağlanarak MİK değerlerinde önemli bir düşüş görülmektedir [126]. Bu bulgulara göre, PA β N (veya PA β N benzeri moleküller) molekülleri, hücre içi moleküllerin

tutumunu artırarak klaritromisin bazlı tedavilerin eradikasyon etkinliğini artırabileceğini göstermektedir [127]. Yapısal olarak benzerliklerinden dolayı RND dışa atım pompa sistemleri ile proton pompo inhibitörleri arasındaki etkileşimde oldukça önemlidir. Mide asidi inhibisyonunun yanı sıra PPI'ler EPI ilaçlarına benzer şekilde dışa atım pompa sistemlerinin aktivitesini inhibe etmektedir. PPI kullanımı ile birlikte, *H. pylori* multi-dirençli suşlarında klaritromisin ve ayrıca metronidazol, amoksisilin ve furazolidonun MİK değerleri 3-4 kat azaldığı gösterilmiştir [128].

Metronidazol

H. pylori metronidazole MİK değerleri 0,5-2mg/L olarak bildiriliş olup antibiyotik direnci ise $\geq 8\text{mg/L}$ (16-128mg/L aralığında) olarak tanımlanmıştır [121]. Metronidazolün bakterisidal aktivitesi, DNA-helikoidal yapıya zarar verebilen anyonik radikallerde, nitroso-türevlerde ve hidroksilaminlerde nitro gruplarının indirgenmesine bağlıdır. Metronidazolün bakterisit aktivitesi, Şekil 2.7'de gösterildiği gibi nitro gruplarının, DNA-helikoidal yapıya zarar verebilen hidroksilaminlere ve nitroso-türevlerine indirgenmesidir.



Şekil 2. 7 Metronidazolün kimyasal yapısı. Metronidazol, reaktif bir radikal oluşumuna yol açan nitro grubunun indirgenmesi ile aktive edilir [129]

Bu indirgeme reaksiyonları, negatif olması gereken elektron taşıma zincirinin bileşenlerinin hücre içi redoks potansiyeline bağlıdır. Metronidazol çifti için orta nokta redoks potansiyeli 415 mV'dir [129]. Anaeroblar metronidazole moleküllerini aktive etmek için indirgeyici kapasiteye sahipken aerobik bakteri ve memeli hücreleri bu indirgeme kapasitesine sahip değildir. Yapılan bir çalışmada ise duyarlı izolatlarda metronidazolün hücre içi indirgenmesi ve dirençli izolatlarda bu indirgenmenin azalması doğrudan kanıt sağlamıştır [130].

Elektronlar; Pyruvat Oksido Reductase kompleksi (POR) tarafından üretilir ve ferronoksin veya flavodoksin iletilir ve hücre içi redoks potansiyeli metronidazole moleküllerin indirgenmesine ve toksik serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olur [121]. Bu durum özellikle metronidazole duyarlı olan anaerob türlerinde aktiftir. Antibiyotik direncinin kazanılması, elektron taşıyıcılarının aktivitesinin azaltılmasına veya ortadan kaldırılmasına bağlıdır. Aerob bakterilerin çok yüksek hücre içi redoks potansiyeli metronidazolün indirgenme aktivasyonunu önler ve bu da iç direncin oluşmasından sorumludur [129].

Diğer bir mekanizma ise oksijensiz radikallerin oluşmasıdır. Bu durumda oksijen indirgenmiş metronidazolden elektronların son alıcısı konumundadır ve metronidazolün indirgenmemiş aktif olmayan haline dönüşmesini uyarır ve bu da DNA için toksik olan oksijensiz radikallerin oluşmasına neden olur [131]. Dirençli suşlarda katalaz-süperoksit dismutaz sistemi ile oluşan son ürünün su olması ile sistem nötrleştirilir. Fakat katalaz-süperoksit dismutaza sahip olmayan *H. pylori*'de oksijen tutucu olarak görev yapan NADH oksidaz metronidazolü indirgenmiş formda tutar. Dirençli *H. pylori* suşlarında inaktif mutant NADH oksidaz bulunduğu gösterilmiştir [132].

Metronidazol dirençli suşlarda, oksijene duyarsız bir NADPH nitro redüktazı kodlayan rdxA genini içeren farklı mutasyonlar tanımlanmıştır. *H. pylori* 'de Metronidazol direnci gelişmesinde bu mutasyonlar ana mekanizma olarak tanımlanmıştır. Duyarlı suşlarda, NADPH nitro-redüktaz, metronidazole ve benzeri molekülleri elektron transferiyle indirger ve DNA için toksik nitro-türevlerine dönüştürür [133]. FrxA (NADPH flavin oksidoredüktaz için) ve frxB (ferredoksin benzeri enzimler için) olarak kodlanan iki gen bölgelerinde gerçekleştirilen susturmanın etkisi araştırılmış ve bu nokta mutasyonlarının sadece rdxA gen mutasyonları varlığında bakteri direncini artırabildiğine dair kanıtlar elde edilmiştir. Gerçekten de, rdxA mutasyonlarının yokluğunda metronidazol dirençli suşlar nadir görülmüştür [134].

H. pylori suşlarında metronidazolden sorumlu kompleks bir dışa atım sisteminin rolü son zamanlarda bildirilmiştir. *H. pylori*'de birkaç hücre içi translokaz ile

etkileşime giren ve farklı antibiyotiklerin dışa atılımını düzenleyen Outer membran Efflux Proteinlerin (OEP) varlığı bulunmuştur. İki Efflux proteinleri kodlayan genlerde (HP0605 ve HP0971) yapılan susturma metronidazol direncinde bu akış pompa sistemi için önemli bir rolü olduğu gösterilmiş ve metronidazole karşı duyarlılığı önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir [126, 133, 135].

Levofloksasin

Levofloksasin, *H. pylori* tedavisinin başarısız olduğu durumlarda kullanımı dünya çapında gittikçe artmaktan florokinon sınıfı bir antibiyotiktir. Levofloksasin MİK değerleri 0.25–0.5 mg/L'dir. Antibiyotik direnç MİK değerleri 1 mg/L (4–32 mg/L aralığında) olarak rapor edilmiştir [136, 137].

Florokinonlar DNA helikoidal yapısının korunması için gerekli bir enzim olan DNA topoizomera II alt A ünitesine bağlanarak doza bağımlı bakterisidal etki gösterir. Yüksek dozlarda DNA'yı ve çok daha yüksek dozlarda ise RNA sentezini durdurur.

Kinonlara karşı geliştirilen direnç nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Bu nokta mutasyonları gyrA gen bölgesinde Kinon Direnç Belirleme Bölgesi (QRDR) olarak adlandırılan bölgede gerçekleşerek antibiyotik ve enzimin bağlanmasını önler. Bu nokta mutasyonları[138]

1. 91 pozisyonunda bulunan aspargin amino asidinin yerine geçen Gly, Asn, Ala veya Try amino asitleri,
2. 87 pozisyonunda bulunan Asn amino asidinin yerine geçen Lys amino asidi,
3. 88 pozisyonunda bulunan Ala amino asidinin yerine geçen Val amino asidi neden olmaktadır [138, 139].

Hem 91 hem de 87 pozisyonunda gerçekleşen mutasyonlar levofloksasine dirençli tüm suşlarda gözlemlenmiştir [136]. Diğer nadir mutasyonlar gyrB genlerinde görülsede levofloksasin direncine neden olan gyrA geninde gerçekleşen mutasyonlar %83.8 oranında neden olurken gyrA geninde gerçekleşen mutasyonlar direnç üstünde %4.4 oranında etkili olduğu belirlenmiştir [140].

Diğer levofloksasin direncine neden olan faktörler ise gyrA genindeki kodon 87'de gerçekleşen polimorfizm olduğu gösterilmiştir. *H. pylori* 26695 ve J99 suşlarında

yapılan tam genom dizilemesi kodon 87 de korunan treonin kalıntısının J99 suşunda ve asparjin kalıntısının varlığı ise 26695 suşunda daha fazla levofloksasin duyarlılığına sahip oldukları belirlenmiştir [136, 141].

Amoksisilin

Amoksisilin, *H. pylori* tedavisi için mevcut tüm tedavi rejimlerinde kullanılan bir β -laktam antibiyotiktir [142]. Amoksisilin duyarlı suşların MİK değerleri 0.06-0.25 mg/L'dir. Antibiyotik direnci MİK değerleri ise 1mg/L (1-8 mg/L aralığında) olarak bildirilmiştir [143].

Amoksisilin, özellikle penisilin bağlanma proteinleri (PBP) adlı taşıyıcıları bloke eder ve peptidoglikan sentezine müdahale ederek bakterisidal etki gösterir [121]. Literatürde 8mg/L MİK değerine sahip stabil suşların varlığı bildirilmiştir. Aynı zamanda bazı *H. pylori* suşlarında instabil amoksisilin direnci belirlenmiştir. Bu direnç 'amoksisilin toleransı' olarak adlandırılan ve suşun -80 °C'de dondurulup tekrar kültüre edilmesinden sonra ortadan kaybolması olarak açıklanmıştır [144].

Stabil amoksisilin direncinde farklı mekanizmalar rol almaktadır. Penisilin Bağlama Proteinleri (PBP'ler) bakteri duvarının peptidoglikan tabakasının sentezinde rol oynayan bir glikosil transferaz-asil transpeptidaz enzimlerdir [145]. Bu enzimatik aktivite, PBP'lerin C-terminal bölgesinde 3 farklı motif (SKN₃₆₈₋₃₇₁, SNN₄₃₃₋₄₃₅, KTG₅₅₅₋₅₅₇) barındırdığı belirlenmiştir,. PBP'lerin motiflerine bağlanan β -laktam, peptidoglikan katmanının parçalanması ve ozmotik bakteriyel şoka neden olarak bakterisidal etkiye neden olur. Penisilin direncinin ana mekanizması olan β -laktamaz enzimine bazı bakteriler sahipken bu mekanizma *H. pylori*'de inaktif olduğu gösterilmiştir [145, 146]. Bir çok çalışma PBP1 geninde gerçekleşen nokta mutasyonların PBP-transpeptidaz arasında afinite kaybına yol açarak asıl amoksisilin direnci mekanizması oluşturduğunu göstermiştir. PBP1'deki Ser414 amino asidinin Arg amino asidine mutasyonu önemli ölçüde MİK değerini (> 0.5–1 mg/L) arttırmış olduğu gözlemlenmiştir [146]. Ayrıca PBP1 geninde gerçekleşen diğer bir nokta mutasyonu Asn562 amino asidinde Tyr artığının varlığı tespit edilmiştir. Bu nokta mutasyonu tüm suşlarda in vitro olarak yüksek direnç sağladığı belirlenmiş ve diğer bir rana mutasyon kaynağı olarak kabul edilmiştir. Literatürde bulunan diğer çalışmalar PBP2, PBP3 ve PBP4 genlerinde bulunan

mutasyonlarında benzer şekilde MİK değerlerini arttırdığı belirlenmiştir [147, 148].

Diğer bir mekanizma ise bakterinin sahip olduğu ve antibiyotikler için ilk engel olan dış zardır. Lipopolisakkarid tabakanın değişken akışkanlığı, çeşitli lipofilik bileşiklerin varlığı antibiyotiklerin difüzyonunu sınırlandırabildiği bilinmektedir. *H. pylori*'nin sahip olduğu hopB ve HopC genleri tarafından kodlanan porinlerin çözünen molekül penetrasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir. HopB geninde gerçekleşen nokta mutasyonları ve HopC geninde gerçekleşen delesyon MİK değerlerinde hopB için ; 250 mg/L, hopC için; 125 mg/L gibi yükselmelere eden olduğu bildirilmiştir. HopB ve hopC genlerindeki nokta mutasyonları ve PBP1 genindeki mutasyonlarla birlikte ilişkilendirildiğinde antibiyotik direnci MİK değeri 400 mg/L olduğu belirlenmiştir [143, 149].

Amoksisilin direncinin gelişmesinde diğer bir mekanizma ise bakterinin dışa atım (efflux) mekanizmasıdır. Antibiyotik moleküllerinin çevresel birikiminden kaynaklanan toksik etkiden koruyucu bir işlem olan eflux mekanizması bakterilerde sıkça rastlanan bir özelliktir. Fakat bu mekanizma amoksisilin direncinin sürdürülme olasılığı düşük olarak görülmektedir [150].

Tetrasiklin

Tetrasiklin *H. pylori* tedavisinde kullanılan dörtlü tedavilerdeki temel antibiyotiklerden biridir. MİK değerleri 0.25–2 mg/L olarak bildirilmiştir. Antibiyotik direnci MİK değeri ise ≥ 4 mg/L olarak tanımlanmıştır [151].

Tetrasiklin için bakteriyel dirence az karşılaşılsa da gün geçtikçe direnç oranları artmaktadır. Tetrasiklin gram pozitif ve negatif bakterilerde 30S ribosomal RNA alt birim seviyesinde kodon-antikodon bağlanmasını inhibe eder ve aminoasil-tRNA'nın alıcı bölgesine bağlanmasını bloke ederek bakterisidal etki gösterir. Dirençli suşlarda farklı MİK değerleri bildirilmiştir (2–256 mg/L) [152].

Yapılan çalışmalarda antibiyotik-ribozom etkileşi için 2 ila 6 farklı bölge tanımlanmıştır. Düşük afinitede ise birçok bölge belirlenmiştir. Tetrasiklin direncinin ana mekanizması ise ribozomun sarmal 31 ilmeğinde gerçekleşen 965 ile 967 pozisyonlarında gerçekleşen eş zamanlı üçlü nokta mutasyonu olarak kabul

edilmiştir. Üçlü nokta mutasyonunun AGA kodonundan TTC üçlüsüne mutasyonu afinitenin %24-52'lik bir azalmasına neden olduğu gösterilmiştir [153]. Direnç seviyeleri, AGA kodonundaki amino asit değişiklik sayısı ile orantılıdır [152]. Tek ve çift noktalı mutasyonlar düşük ve orta MİK değerleri ile ilişkilendirilirken üçlü bir mutasyon varlığında daha yüksek direnç seviyeleri gözlenmektedir [153]. Ayrıca 31 sarmalında bulunan purin bakımından zengin diziler duyarlı suşlarda daha sık gözlenirken pirimidin bakımından zengin diziler ise dirençli suşlarda bulunmuştur. 31 sarmalındaki pirimidin bakımından zengin dizilerin, tetrasiklin konformasyonu ile uyumlu olmamasından dolayı, azalan bir afiniteye yol açtığı düşünülmektedir. Yapılan diğer bir çalışmada tüm dirençli suşlarda G942'nin silindiği bulunmuştur. Bu nedenle, G942 silmesinden kaynaklanan afinite kaybı, bakteriyel direncin artırılmasında önemli bir role sahip olduğu varsayılmaktadır [154, 155].

Bir başka tetrasiklin direnci mekanizması ise, kimyasal modifikasyona uğrayan oksidoredüktaz NADP'nin antibiyotik ve ribozomal bölge arasındaki bağlanmaya engel olabileceği öngörülmüştür. Ayrıca hücre içi ilaç konsantrasyonlarını ayarlayan tetrasikline spesifik bir eflux akış pompa proteinlerinin varlığı dirençli suşlarda bu pompaları inhibe edici siyanid m-klorofenilhidrazon (CCCP) gibi kimyasallarla önceden maruz bırakılması ile MİK değerlerinde düşüslere yol açtığı gözlemlenmiştir [156].

Tablo 2.3'de antibiyotiklerin dirençli ve duyarlı suşlarındaki MİK değerleri ve ana direnç mekanizmaları birlikte verilmiştir.

Tablo 2. 3 Farklı Antibiyotiklerin Duyarlı ve Dirençli *H. pylori* Suşlarındaki MİK Değerleri ve Ana Direnç Mekanizmaları [120]

Antibiyotik	Duyarlı suşlarda MİK Değerleri	Dirençli Suşlarda MİK Değerleri	Ana Direnç Mekanizması
Klaritromisin	0.016–0.50 mg/L	≥ 1 mg/L (2-256 mg/L)	→ rRNA'da nokta mutasyonu
Metronidazol	0.5–2 mg/L	≥ 8 mg/L (16-128 mg/L)	→ Efflux pompa sistemi (RND ailesi) → NADPH redüktaz enziminin mutasyonu
Levofloksasin	0.06-0.25 mg/L	≥ 1.0 mg/L (1-8 mg/L)	→ PBP geninde nokta mutasyonu → HopB ve HopC genlerinde nokta mutasyonları → Omp25 ve Omp32 porin genlerinde nokta mutasyonları
Tetrasiklin	0.25-2 mg/L	≥ 4 mg/L (2-256 mg/L)	→ Tet-P ana bağlanma bölgesinde nokta mutasyonu → Tet-4 ikincil bağlanma bölgesinde nokta mutasyonları → Oksidoredüktaz enziminin mutasyonu

2.1.9 *Helicobacter pylori* Kokoid Formu ve Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişki

Stres koşullarında uyku (dormant) haline geçen bakterilerin aşırı strese karşı artan direnci ve hayatta kalım potansiyellerini arttırma kabiliyetleri ile karakterizedir [21]. Antibiyotiklere karşı başarısızlığın sebeplerinden biri *H. pylori*'nin kokoid formları olduğu düşünülmektedir. *H. pylori*'nin antibiyotik varlığında kokoid formuna dönüştüğü birçok çalışmada gösterilmiştir.[20, 27, 29-32, 34, 157-159] Ayrıca antibiyotik varlığında kokoid formlarının oluşması [107] ve antibiyotik stresi ortadan kalktığında relaps hale geçen bakterilerin yeniden enfeksiyonu başlatabilmesi [160] antibiyotik tedavisinin başarı şansını azaltmaktadır [107]. Bu

sonuçlar *H. pylori*'nin daha dirençli kokoid formlarına dönüşmesini desteklemektedir [22, 107]. Yapılan çalışmalarda kokoid formlarının amoksisilin antibiyotikğine karşı 10 kat daha fazla MİK değerine sahip olduğu bildirilmiştir.

2.1.10 *Helicobacter pylori* ve Canlı Fakat Kültürde Üretilmeyen Bakteri Sınıfı

VBNC (viable but non culturable) bakteri sınıfı ilk kez 1985 yılında Rita Colwell tarafından tanımlanan ve çeşitli koşullarda kültürde üreyebilme yeteneklerini zamanla kaybettikleri halde metabolik aktivitelerine devam eden ve uygun koşulları bulduklarında tekrar üreyebilen bakteriler için kullanılmış bir bakteri sınıfıdır [23, 24]. Bu bakteriler; açlık, ozmotik basınç ve oksijen artışı, antibiyotik varlığı gibi çeşitli çevresel baskılardan korunabilmek için metabolik ve morfolojik özelliklerini değiştirir ve VBNC formuna geçerler. VBNC sınıfına dahil bakterilerin metabolik aktivitelerini azalttığı ve ayrıca respirasyon, besin transportları, makromolekül sentezlerinde de azalmalar meydana geldiği gösterilmiştir [25, 26]. Bazı VBNC bakterilerinin metabolik aktivitelerin azalmasına karşın patojenitesini kaybetmediği ve konakçıda tekrar aktif forma geçebildikleri gösterilmiştir [161]. Ayrıca ölü yada ölmek üzere olan bakterilerde azalan ATP düzeyleri VBNC sınıfındaki bakterilerde yüksek düzeyde kalmakta fakat otolitik aktiviteleri çoğalan bakterilere göre daha yüksektir[25].

VBNC formuna geçen bakterilerin tekrar canlı hale geçerek kültürde üreme yeteneklerini geri kazanması (resusitasyon) stres koşullarının ortadan kaldırılması ile her zaman mümkün olmamaktadır. Literatürde resusitasyonda etkili 3 faktör mevcuttur.

- Çevresel streslerin ortadan kaldırılması (uygun sıcaklık, besin varlığı vs.)
- Tekrar üremeyi uyaran regülatör ve sinyal moleküllerin varlığı
- Hasarın onarılması ve replikasyon mekanizmalarının düzeltilmesi[25].

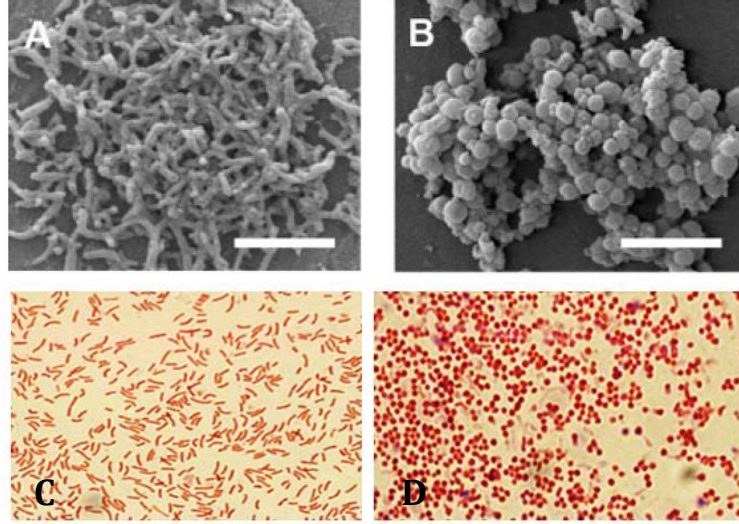
VBNC sınıfı 60'dan fazla bakteriyi içermektedir (Tablo 2.4) ve her geçen gün yenileri eklenmektedir. Oliver J.D'ye göre *H. pylori* de bu sınıfa dahil olan bakteriler arasındadır [25].

Tablo 2. 4 VBNC sınıfına dahil olan bakteriler listesi [25]

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Aquaspirillum</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>M. varians</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp.
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>C. lari</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pasteurella piscida</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. fischeri</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P. putida</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. natriegens</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. proteolytica</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>V. vulnificus</i> (tip 1&2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhi</i>	
<i>K. planticola</i>	<i>S. typhimurium</i>	

2.1.11 *Helicobacter pylori* Kokoid Formunun Genel Özellikleri

H. pylori, açlık, oksijen ve antibiyotik varlığı, ekstrem sıcaklıklar gibi çeşitli stres koşullarında spiral formundan (Şekil 2.8 A ve C) kültürlenemeyen kokoid formuna (Şekil 2.8 B ve D) dönüşerek kendini bu çevresel baskılardan korumaktadır [27].



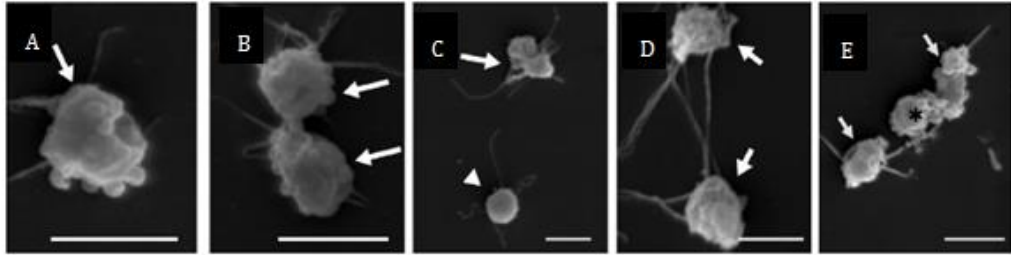
Şekil 2. 8 *H. pylori* 'nin spiral (A) ve kokoid (B) formunun SEM görüntüsü, *H. pylori* spiral (C) ve kokoid (D) formunun gram boyama ile ışık mikroskobu altındaki görüntüsü [15]

Uzun bir süre *H. pylori*'nin spiral ve kokoid olmak üzere iki farklı morfolojide bulunduğu düşünülmekteydi fakat son yıllarda yapılan çalışmalar *H. pylori*'nin 3 farklı morfolojide bulunabileceğini ortaya koymaktadır. Mai ve arkadaşları *H. pylori*'nin canlı-kültürlenebilen (spiral/viable), canlı fakat kültürlenemeyen (kokoid/nonviable) ve stres koşullarınca indüklenmiş cansız form (dejeneratif) olmak üzere üç farklı formda bulunduğunu savunmuşlardır [162]. N.Saito ve arkadaşları benzer şekilde *H. pylori*'yi 3 sınıfa ayırmıştır. Bunlar canlı-kültürlenebilen, canlı-kültürlenemeyen ve ölüm evresinde bulunan bakteriler şeklindedir [163]. J.G. Kusters ve arkadaşları *H. pylori* spiral formu; optimum koşullar altında kültürlenebilen, bölünebilen enfeksiyona sebep olabilen form ile kokoid formuna göre daha az uyumlu form şeklinde ikiye ayırmıştır [27]. Elektron mikroskobu ile yapılan bir çok çalışmada *H. pylori*'nin canlı-spiral formu, canlı-kokoid formu ve cansız degeneratif formu olmak üzere üç farklı formda bulunduğu gösterilmiştir [163-166]. Costa ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, VBNC sınıfındaki

H. pylori kokoid formunun, endosporlarda olduğu gibi hücre duvarındaki önemli bir değişiklik nedeniyle, spiral formuna kıyasla daha dirençli olduğu belirtilmiştir [34].

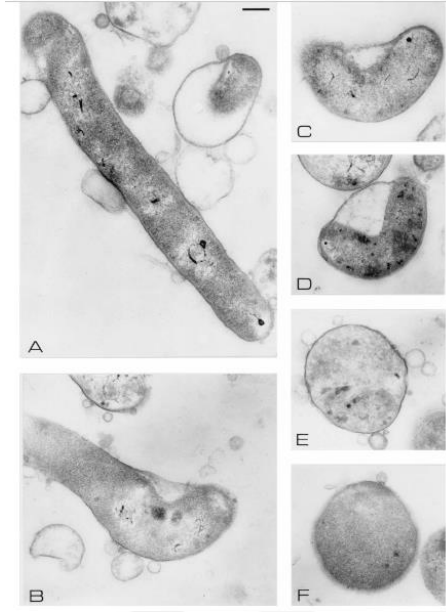
2.1.12 *Helicobacter pylori* Spiral Formdan Kokoid Forma Dönüşümü sırasında Meydana Gelen Değişiklikler

Diğer gram negatif bakterilerin hücre duvarlarından farklı olarak *H. pylori* murein çapraz bağlanmanın (DD)-D-Ala-DAP dimerleri şeklinde [34] ve A1 γ kemotipindedir [167]. Spiral formdan kokoid forma geçiş sırasında murein analizlerinde mupeptid oranlarında büyük farklılıklar meydana geldiği gösterilmiştir. Göze çarpan en büyük değişiklik dipeptid monomerlerin ancak kokoidlerin oluşumundan sonra kritik artışı, tri- ve tetrapeptid monomerlerin ise azalması olmuştur. Bu değişikliğin (γ)-glutamil-diaminopimelat endopeptidaz aktivasyonunun tri- ve tetrapeptidlerin, dipeptid monomerlerine dönüşümüne neden olduğu göstermekte ve dirençli formların oluşmasının nedenlerinden biri olarak görülmektedir [34].



Şekil 2. 9 *H. pylori* kokoid formlarının farklı morfolojik yapıları [168]

Literatürde bulunan bir çalışmada *H. pylori*'nin hem morfolojik karakteristiği hem de spiral formdan kokoid formuna dönüşümünde iki farklı tip kokoid oluşturduğu bildirilmiştir. Tiplerden biri pürüzlü bir yüzeye sahip birbirlerine yapışan intrasitoplazmik yapıya sahip A tipi (Şekil 2.9 A), diğeri gövdesi ve etrafını flagellaları ile sarıp pürüzsüz kokoid oluşturan B tipi (Şekil 2.9 C) kokoid formu olarak adlandırılmıştır[163].



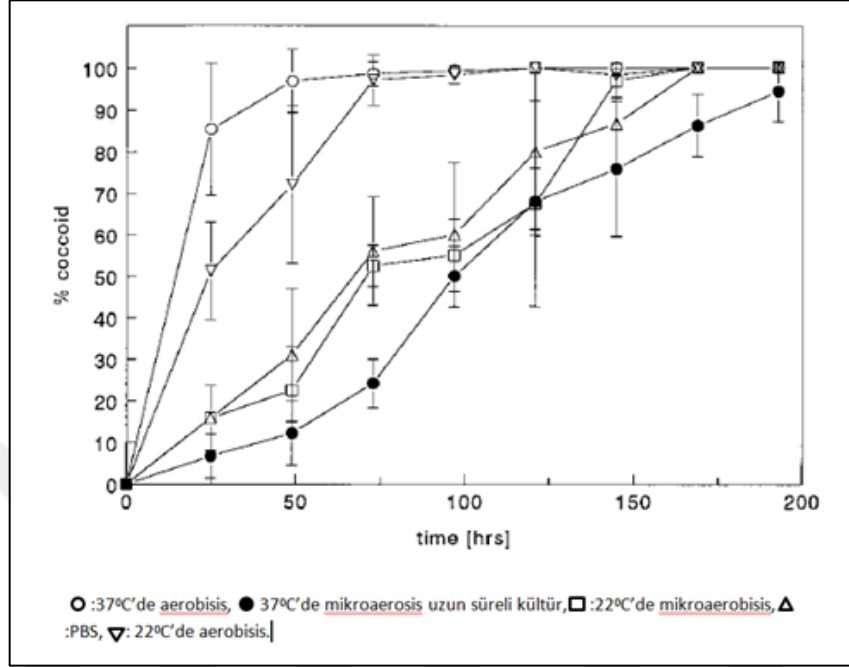
Şekil 2. 10 *H. pylori* 'nin spiral formdan kokoid formuna dönüşümünün TEM görüntüsü [27]

Spiral formdan kokoid formuna geçişte bakterinin sahip olduğu flagellalar Şekil 2.10'da gösterildiği gibi hücre duvarının etrafını sarak kokoidleri meydana getirdiği bilinsede *Helicobacter pylori*'nin hangi mekanizmalarla kokoide dönüştüğü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Başka bir çalışma da ise spiral form ile kokoid formu karşılaştırıldığında hücre bölünmesi, transkripsiyon ve translasyon proteinlerinin de dahil olduğu 30 fonksiyonel proteinin kokoid formunda düşük regüle edildiği gösterilmiş ve gastrik epitel hücrelerinde IL-8 uyarıcı aktiviteye sahip olmayan *Helicobacter pylori* kokoid formlarının bağışıklık sisteminden kaçmasına olanak sağladığı gösterilmiştir[35]. Diğer bir çalışmada ise *H. pylori*'nin kokoid formlarının hücre çeperinde bulunan peptidoglikanın önemli bir modifikasyonundan dolayı gastrik epitelde bulunan immün sistem hücrelerinden salgılanan IL-8 aktivitesini engelleyerek bağışıklık sisteminin yanıt oluşturmalarını engellediği gösterilmiştir [169].

2.1.13 *Helicobacter pylori* Kokoid Formu Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Spiral ve canlı formdan kokoid forma dönüşümünün nedenleri tam olarak bilinmesede, literatürde yapılan çalışmalar *H. pylori*'nin çeşitli stres koşullarında metabolik aktivitesini azaltarak kokoid morfolojisine dönüştüğü bilinmektedir ve

bu koşullar; oksijen ve antibiyotik varlığı, ekstrem sıcaklıklar, uzun süre kültüre edilme (kültürün yaşlanması) ve açlık gibi stres koşulları (Şekil 2.11) *H. pylori*'nin kokoide dönüşmesini uyaran koşullarıdır [27]. Fakat doğal habitatı olarak kabul edilen midede de kokoid varlığı saptanmıştır [31, 163, 170].



Şekil 2. 11 ATCC 43504 *H. pylori* suşunun farklı koşullarda zamana bağlı kokoid forma dönüşüm grafiği [27]

Spiral formdan kokoid forma dönüşümün sebepleri tartışmalı olsada literatüre iki görüş hakimdir;

- Kokoid formu çevresel streslerden korunma amaçlı bir dönüşüm olduğu görüşü [12, 107, 157]
- Kokoide dönüşümün bakterinin ölümünden önceki son evre olduğu görüşü [171].

Bu iki görüşüde destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Çevresel streslere maruz kalan ve kokoidlere dönüşen *H. pylori*'nin kokoid formları aktif spiral formlarına göre çevresel streslere daha dirençli olduğu bilinmektedir[19]. Aerob ortam, alkali ve asidik pH, yüksek/düşük sıcaklık, uzun süreli inkübasyon, proton pompa inhibitörü varlığı ve antibiyotik muamelesi gibi çeşitli koşullarda kokoidlerin metabolik aktivitelerini koruyabildiğini yapılan in vitro ve in vivo deneyler ile ortaya koyulmuştur [158]. Ayrıca *H. pylori* kokoid formları üreaz aktivitesini

koruduğu ve spiral formların sentezlediği protein seviyesinden az da olsa protein sentezlerini devam ettirirdiği bilinmektedir [161, 172]. Yapılan alışmalarda *H. pylori*'nin +4°C sıcaklığında fizyolojik tuzlu çözelti içerisinde 3 ay tutulması durumunda bile az miktarda da olsa DNA ürettiği belirtilmiştir [165, 173]. Tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğuunda kokoid formlarının stres koşullarında kendini çevresel faktörlerden korumak için geliştirdiği bir strateji olduğu görüşü kabul görmektedir.

Diğer bir görüş ise, kokoid hücrelerinin doğal bir ölüm fazı olduğudur. Çeşitli çalışmalarda gösterilen fizyolojik parametreler, üreyebilme yeteneğinin kaybedilmesi gibi etkenlerin ölüm evresi görüşünü desteklemektedir[27].

Antibiyotik

Amoksisilin, klaritromisin, metronidazol ve eritromisinin farklı konsantrasyonlarının kokoid formuna dönüşümü indükleyebildiği bilinmektedir. Antimikrobiyel ajanlar arasında, kokoid formuna dönüşümde en yüksek indükleme etkisine amoksisilinin sahip olduğu da belirlenmiştir [158]. Literatürde bulunan bir çalışmada *H. pylori*'nin spiral ve kokoid formlarının üç farklı antibiyotiğe duyarlılığı test edilmiştir. Spiral formları üzerinde bakterisidal etkiğe sahip olduğu bilinen bu antibiyotiklerden metranidazol ve klaritromisinin *H. pylori*'nin kokoid formları üzerinde de bakterisidal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, amoksisilinin minimum inhibisyon konsantrasyonunun iki katında kokoidler üzerinde bakterisidal etkisi olmamıştır [107]. Bu çalışmaya benzer bir çalışmada ise amoksilisilin ile indüklenen *H. pylori*'nin kokoid formunun amoksisiline karşı 10 kat daha fazla bir MİK deperine sahip olduğu gösterilmiştir[19].

Çeşitli β -laktam antibiyotiklerin, hücre duvarında serbest membranöz veziküller veya boru şeklindeki yapıların oluşumunu ve dış hücre zarının kısmen veya tamamen ortadan kalkmasına neden olduğu ve küresel hücrelerin oluşumunu indüklediği gösterilmiştir [174]. Morfolojide gerçekleşen değişimler *H.pylori*'de bulunan penisilin bağlayıcı proteinlerin varlığı ile ilişkili olup peptidoglikan sentezinde yer alan enzimlerin inhibisyonuna yol çmaktadır. Yapılan bu çalışma ile tek-penisilin bağlayıcı proteinin sarmal/spiral morfoloji için gerekli olduğu düşünölmüştür [175]. Yapılan çalışmalarda metronidazol, ranitidin ve bizmut

varlığında yapısal değişikliklere rastlanmazken [174] bizmut sitrat ve ranitin sitratin hücre bütünlüğünde ciddi bozukluklar ve parçalanmalara neden olduğu hücre fragmentasyonunu ve lizisini indüklediği gösterilmiştir [176]. PPI lansoprazol ile muamele edilen *H. pylori* bakterilerinde boylarında uzama ve daralma gözlemlenirken hücre yüzeyinde değişikliklere neden olmuştur [177].

Aerobiosis, Uzun Süreli İnkübasyon, Besin Yokluğu

İn vitro çalışmalarda, aerobiosis, uzun inkübasyon süresi ve besin yokluğu (açlık) *H. pylori*'nin spiralden kokoid formuna dönüştüğünü göstermiştir [178]. Fakat hangi mekanizmalar ile dönüşümün gerçekleştiği hakkında herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Kokoid Oluşumuna Neden Olan Diğer Etmenler

Duodenumdaki kokoid yüzdesinin midedekine nazaran daha fazla olduğu, hatta zaman zaman duodenomda sadece kokoidlerin görüldüğü yapılan biyopsi çalışmalarında bildirilmiştir [4, 48]. Bu durum bazı araştırmacılar tarafından *H. pylori*'nin duodenumdaki biyolojik koşullara uyum sağlayamadığı veya duodenumdaki ortamın bakterinin VBNC durumu için ideal olması şeklinde yorumlanmaktadır [158].

2.1.14 *Helicobacter pylori* Kokoid Formunun İnfektivitesi

H. pylori'nin spiral formu için virülans faktörleri ve bu bakterinin gastrointestinal hastalıkların oluşumunda rol oynadığı mekanizmalar yapılan çok sayıda çalışmalar ile belirlenmiş ve tanımlanmıştır. Fakat, kokoid formunun virülans ve patojenitesi hakkında yapılan çalışmalar yetersiz olmasına rağmen spiral formda olduğu gibi, kokoid form da UreA, UreB, HpaA, VacA, CagA, CagE ve BabA gibi ana virülans genlerini ifade ettiği bilinmektedir [159, 179]. Kokoid formundaki Bu genlerin ifadesi kronik ciddi mide rahatsızlıklarında muhtemelen önemli bir rol oynamaktadır [33]. Ayrıca araştırmacıların bir kısmı, *H. pylori*'nin kokoid formunun, spiral formu tarafından ifade edilmeyen yüksek moleküler ağırlıklı antijenleri ifade ettiği görüşüne inanmaktadır [180]. Ling tarafından yapılan proteom haritalarının analiz çalışmalarında kokoid forma morfolojik dönüşüm sırasında proteinlerin %45 oranında azaldığını gösterilmiştir[181]. Ayrıca ifade

profillerinin küme analizi ile geç log-durağan faz geçişi sırasında *H. pylori*'nin gen ekspresyonlarında önemli değişiklik olduğu da yapılan diğer çalışmalar ile belirlenmiştir[181, 182]. Bunlara ek olarak, Poursina ve ark. tarafından yapılan çalışmada, potansiyel küresel transkripsiyonel regülatör gen SpoT'nin spiral forma göre kokoid formunda daha yüksek oranlarda ifade edildiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, SpoT geninin ekspresyonu, *H. pylori*'nin spiral formlarında önemli ölçüde aşağı doğru düzenlenirken, gen ekspresyonu aşırı regüle edilmiş ve bakteri kokoid formlarında +30.3 kat değişiklikler görüldüğü belirlenmiştir [183].

H. pylori'nin stres koşullarında metabolik aktivitesini azaltarak kok morfolojisine dönüştüğü bilinmekte fakat infektivite yeteneklerini kaybetmediği ve yapılan fare çalışmalarında kokoidlerin farelerin midelerinde kolonize olma yeteneklerini sürdürdüğü bu nedenle fareleri infekte ettiği gösterilmiştir [30, 160, 161]. Ayrıca atık sularda [184], içme sularında [77] ve çeşitli su kaynaklarında tespit edilen *H. pylori* kokoid formlarının [185-188] uygun konakçıya yerleştikten sonra tekrar enfektif forma geçebildiği, üreaz aktivitesini ve adherant özelliğini kaybetmediği bildirilmiştir. Ek olarak antibiyotik varlığının kokoid oluşumuna neden olduğu bilinmekte ve yapılan çalışmalarda antibiyotik tedavisi sonrası midede kokoidlere rastlandığı gösterilmiştir [27]. Bu nedenle tekrar eden enfeksiyonların kokoidlerin antibiyotik stresi ortadan kalktığında tekrar relaps hale geçmesi ve enfeksiyonların tekrarlanması kokoid formlarının neden olduğu düşünülmektedir [161]. Bununla birlikte su ile indüklenen *H. pylori* kokoid formları önemli derecede üreaz aktivitesi göstermekte ve epitel hücrelerine yapışma kabiliyeti sergilemektedir. Ayrıca, bakteri hareketinden ve enfeksiyonundan sorumlu önemli bir bileşen olan flagella, elektron mikroskopu altında kokoid *H. pylori*'nin hücresel bir yapısı olarak hala gözlenmiştir. Bu da, suyla indüklenen kokoid *H. pylori*'nin in vivo enfeksiyon potansiyelini arttırmaktadır [160].

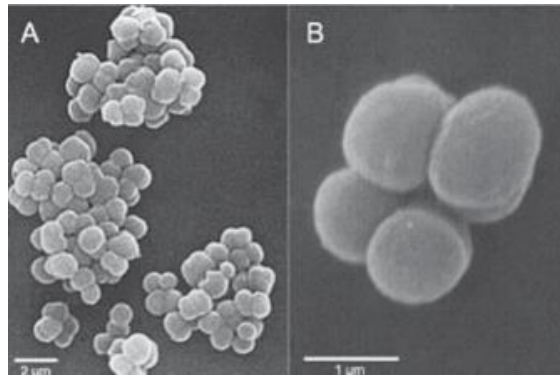
Bazı çalışmaların aksine kokoid formunun dejenere olduğu ve büyüme yeteneğine sahip olmadığını göstermiştir. Örneğin hücre yaşı arttıkça DNA, RNA ve mRNA ekspresyon seviyelerinin düştüğünü ve membran potansiyelini kaybettiği gösterilmiştir [27, 189]. Ayrıca kokoid formlarının canlı spiral formlarına göre protein profilleri değişmiş ve bu değişim devova protein sentezi yerine

proteinlerin işlenmesi ve bozunması süreçleri ile ilişkilendirilmiştir [27]. Buna karşın 3 aylık kültürlerde metabolizmanın hala korunduğu bildirilmiştir. CagA ve ÜreC gibi proteinlerin zamanla azaldığı fakat kokoidlere özgü antijenlerin ise eksprese edildiği gösterilmiştir [165]. Kokoid formlarının fareleri enfekte ettiği verilere karşın gnotobiyotik domuz yavrularını enfekte edemediği [30, 161, 190] gösterilsede kokoid formlarının patogenez ve enfeksiyon geçirimindeki rolü, kokoid formlarının indüklemeye yöntemleri, kokoid bakteri yoğunlukları, resüsitasyonların belirlenmesi ve bakterilerin kokoidleri indüklemek için kullanılan yöntemlere maruz kalma süreleri standartlaştırılması gerekmektedir.

2.2 *Micrococcus luteus*

2.2.1 *Micrococcus luteus* Hakkında Genel Bilgiler

Micrococcus luteus, ilk olarak Fleming tarafından bakteriolitik aktivitesinden (lizozim enzimi) dolayı *Micrococcus lysodeikticus* olarak adlandırılan ve 1972 yılından itibaren günümüzdeki ismini alan [191] bu bakteri insan derisinden, toprağa veya sudan izole edilebilen ve DNA'sının %73'ü [192] yüksek guanin-sitozin (G + C) içeriğine sahip gram pozitif bir bakteridir [193]. 0.5 µm ile 2 µm boyutlarında, Şekil 2.12'de gösterildiği gibi çiftler, tetratlar yada düzensiz kümeler halinde bulunan hareketsiz ve sarı pigmentli, dairesel, pürüzsüz, dışbükey kolonilere sahip mezofilik aerob bir bakteridir [194]. *M. luteus*'un üreyebildiği sıcaklık 15-40°C aralığında olsada en uygun sıcaklık 30°C'dir. *M. luteus* kopiotrof bir organizma olmasına rağmen oligotrofik ortamlarda da hayatta kalma özelliğine sahiptir [195].



Şekil 2. 12 *Micrococcus luteus* bakterisinin SEM görüntüsü [196]

M. luteus endospor oluşturmeyen dormant bir yapıda bulunma özelliği sayesinde açlık durumunda ya da susuz, ekstrem sıcaklıklar gibi zorlu çevre koşullarında hayatta kalır [195]. *M. luteus* saf ya da karma kültürlerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip oksidaz ve katalaz pozitif bir bakteridir. Her ne kadar *Micrococcus* türleri spor oluşturmaya da, büyüme için olumsuz şartlarda ya da uzun süreli kültür sonrası morfolojik olarak farklılaşmış nonspor ve uyuyan yapıları oluşturan, düşük metabolik aktiviteye sahip, çevresel olarak uzun süre hayatta kalmasına olanak sağlayan bir yapıya dönüşürler. Bakterinin besin içermeyen ve aşırı ortamlarda hayatta kalabilirliğine en önemli kanıt 120 milyon yıllık bir amber numunesinden bir *M. luteus* suşunun izolasyonu olmuştur [196].

En iyi üreyebildiği ortamlar Nutrient Agar/Broth, TSA/TSB ve BHI besiyerleridir. Ayrıca 0.5% w/v L-laktat ve 0.05% maya ekstraktı içeren Nutrient Agar besi yerinde oldukça iyi üreme gösterirler [195]. *Micrococcus* suşları zararsız, nontoksik organizmalar olsada bazı türleri kapak endokardit, folikülit, bakteriyemi, menenjit, zatürre gibi hastalıklarla neden olabilmekte [197, 198] hatta hastane patojeni olarak dirençli türleri bulunabilmektedir [199]. İngiltere Tehlikeli Patojenler Danışma Komitesi, Sağlık ve Güvenlik Yöneticisi tarafından 2004 Biyolojik maddeler listesinde 1.sınıf risk sınıfına alınmıştır [199].

2.2.2 *Micrococcus luteus* ve Resüsitasyon Promatör Faktör

M. luteus tarafından salgılanan ve resüsitasyon promatör faktör (RPF) olarak bilinen bu ekstraselüler enzim, VBNC sınıfı bakterilerinin resüsitasyonunu ve büyümesini teşvik ettiği bilinen hücre dışı bir proteindir [200-202]. Aktivite, canlı bakteriler tarafından üretilen ve aktif olarak büyüyen kültürlerin süpernetantında bulunan küçük bir protein olan, resüsitasyon promotör faktör (RPF)'dür. Bu özellikler sekresyonun ardından RPF'nin bakteriyel hücre duvarının bir bileşeniyle etkileşerek ekstra sitoplazmik bir konumda işlev gördüğü ileri sürülmüştür. 'Kültürlenemez' hücrelerin resüsitasyonundaki fonksiyonuna ek olarak, resüsitasyon promatör faktörler, bakteri büyüme faktörü veya sitokin olarak da genel bir rolü vardır[39]. RPF homologları, aktinobakterilerde yaygındır ve *M. tuberculosis* ve yakın akrabalarında da bulunmaktadır. RPF pikomolar

konsantrasyonlarda bile aktiviteye sahip olduğu gösterilmiş 17kDa'luk bir proteindir. Şekil 2.13'de RPF enziminin 3 boyutlu yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2. 13 RPF enziminin 3 boyutlu yapısı [38]

Belirli tanımlanmış koşullar altında RPF dormant bakterilerin büyümelerine ve tekrar kültürlenebilmelerini sağlayan spesifik enzimatik aktiviteye sahiptir ve bakteri büyüme faktörü olarak görülmesi önerilmektedir. RPF'nin spesifik bir enzim olduğu muralitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. RPF'nin bakterileri dormant halden nasıl çıkardığı ile ilgili kesin mekanizma bilinmese de genel görüş bakteri duvarının yıkımına neden olarak bakteriyi hücre duvarını yeniden modellenmesi için uyarması şeklindedir [38]. Ayrıca rekombinant üretilen RPF proteinini *M. luteus* kültür süpernetantından saflaştırılmış doğal RPF proteinine nazaran daha düşük aktivite gösterdiği ayrıca bir haftalık +4°C'de depolama sonucu aktivitesini kaybetmeye yatkın oldukları bildirilmiştir [38].

2.2.3 Resusitasyon Promatör Faktör ve Lokalizasyonu

RPF (Resusitasyon teşvik edici faktörler) protein ailesi dormant bakterilerin normal şekilde çoğalmalarına izin vermelerinden sorumlu oldukları tespit edilen protein ailesine aittir. Literatür verileri, *Streptomyces coelicolor*, *Corynebacterium glutamicum*, *Mycobacterium leprae*, *M.tuberculosis* ve *Mycobacterium bovis* dahil olmak üzere çeşitli GC bakımından zengin bakterilerde *M. luteus* RPF'yi kodlayan benzer genleri ortaya koymaktadır. *M. tuberculosis*'teki bu protein ailesi RpfA, RpfB, RpfC, RpfD ve RpfE adlı beş homologtan oluşur. RPF'lerin transglikosilaz

benzeri bir alan içerdği, hücre duvarının mekanik özelliklerini değiştiren ve hücre bölünmesini ve/veya dormant hale geçmeyi önleyici faktörlerin salınmasını destekleyen peptidoglikan hidrolazları olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür [203]. Tüm RPF'ler bir 70 amino asit katalitik domeni paylaşır ve proteinler hücre dışı bir yere translokasyonunu gösteren N-terminali sinyal dizileri sunmaktadır [204].

2.3 Resusitasyon

2.3.1 *Helicobacter pylori* ve Kokoid Formunun Resusitasyon Çalışmaları

Literatürde bu konuda fazla çalışma bulunmasada Cellini ve arkadaşları 45 gün boyunca farklı sıcaklıklara maruz bıraktıkları kültürlenemeyen kokoid formlarını ısı, pH şoku, sonikasyon ve glass beads shock uygulamış ve katı agar üzerinde inkübasyona bırakmışlardır. Fakat katı agar üzerinde herhangi bir büyüme yada resusitasyon gözlemleyememişlerdir [190]. Diğer bir çalışma ise Kurukawa ve arkadaşları kültürden önce amonyum sülfat ve ısı şoku ile muamele ettikleri *H. pylori* kokoid formlarını sodyum pruvat, insan eritrositi ve serum içeren Brucella besiyerinde inkübe ettiklerinde *H. pylori*'nin spiral-rod şekilli formlarını elde ettiklerini ve bu formların orijinal suşları gibi kan agar ya da Skirrow agarda üretilbileceğini göstermişlerdir [205].

2.3.2 Resusitasyon Promatör Faktör ile Gerçekleştirilen Resusitasyon Çalışmaları

RPF enzimi ile ilgili yapılan resusitasyon çalışmalarında *M. tuberculosis*'in beş RPF-benzeri proteinin her biri rekombinant olarak üretilmiş ve *M. bovis* kültüründe pikomolar konsantrasyonlarda bile stasyonere fazda büyümeyi uyardığı gözlemlenmiştir. Ayrıca yaptıkları çalışmada ortama eklenen poliklonal anti-RPF antikolları *M. tuberculosis Academia* suşunu ve *M. bovis* ile aşılansmış kültürlerin büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir [204]. Literatürde bulunan diğer bir çalışmada ise *Salmonella Typhimurium* LT2'den resusitasyon promatör faktörü kodlayan gen klonlanmış ve *E. coli* BL21 bakterilerinde eksprese edilmiştir. Elde edilen rekombinant RPF, *Salmonella enterica serovar Oranienburg* bakterisinin %7 NaCl varlığında canlı fakat kültüre edilemeyen faza sokulmasının ardından

resusitasyon etkisi incelenmişlerdir. Elde ettikleri sonuca göre rekombinant RPF'nin sadece proliferasyonu teşvik etmekle kalmadığı, aynı zamanda kültürlenemez (nonviable) durumdaki bakterilerin doza bağımlı bir şekilde kültürlenebilir duruma resüsitasyonunu sağladığı bildirilmiştir [36]. Ayrıca başka bir çalışmada RPF enzimini ürettiği rapor edilen *Tomitella biformata*'dan elde ettikleri recombinant RPF enzimlerinin *T. biformata*'nın büyümesini stimüle ettiği ve aynı zamanda izolasyonu sırasında koloni oluşumunu arttırdığı rapor edilmiştir [206, 207]. Ayrıca literatüde atık sudan, topraktan ve çeşitli örneklerden izolasyon yapılamayan veya izolasyonunun zor olduğu özellikle VBNC sınıfına dahil bazı bakteri türleri için RPF enzimi izolasyon medyumuna eklenerek bakterilerin izole edilmesine çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre RPF enziminin eklendiği medium ortamlarının bakterilerin izoölasyonu için avantaj sağladığı gösterilmiştir [208-210].

Tez kapsamında, tüm deneysel çalışmalar Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümünde yer alan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarında, Dr. Öğretim Üyesi Melahat BAĞIROVA ve Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'in önderliğinde deneysel ve metodolojik olarak gerçekleştirilmiştir.

3.1 Materyal

3.1.1 Ekipman

- Streil hücre kültür odası
- Hava akımlı kabinler (Laminor flow – Thermo Scientific Hera safe, Faster BHEN 2006)
- Karbondioksitli incübatör (New Brunswick scientific CO-150 37°C, Friocell 111 25°C)
- İnverted mikroskop (Olympus CKX41)
- Işık mikroskopları (Olympus ve Soff / BX51 ve BA2303)
- SDS-PAGE ekipmanları (Clever Scientific Ltd./VS20 DGGE)
- Flow Sitometre (Merck/ Guava)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3000)
- pH-metre (HANNA instruments)
- Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- Buz makinesi (Scotsman AF100)
- Vortex (LMS (laboratuvarı medical supplies) VTX-3000L)

- Su banyoları (GFL (gesellschaft für labortechnik) mbH, Kerman)
- Isıtıcı karıştırıcı (Heidolph instruments)
- Dondurucular (Beko (+4, -20°C), Arçelik (+4, -20°C), GFL (-40°C))
- -197 °C azot tankı ve azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)
- UV-spektrofotometre (Jasco V-530)
- Saf su ve ultra saf su sistemleri (GFL2104)
- 10, 100 ve 1000 µl'lik mikropipetler (Thermo, Pippetman)
- 1-10, 20-200, 100-1000 µl'lik tek kullanımlık pipet uçları (AxyGen)
- Santrifüj tüpleri 15 ve 50 ml. (Eppendorf, IsoLAB)
- Hücre kültür flaskları 25 cm², 75 cm² (TPP, Corning)
- Petri 90mm (Isolab)
- Serolojik pipet tabancası (Thermo)
- Serolojik pipetler 1, 5, 10,25 ml (Blau Brand Germany)
- Steril pastör pipeti 3 ml (LP ITALIANA SPA)
- Kriyotüpler (TPP)
- 50-1000ml'lik otoklavlanabilir cam şişeler (ISOLAB, SCHOTT)
- Hemositometre/Thoma lamı (Menzel superior)
- 1, 5, 10 ve 50 cc'lik enjektör (Ayset)
- 0,22 µm ve 0,45 µm'lik şırınga filtreleri (MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- Steril Nitril eldiven (Broche)
- Liyafilizatör (Telstar)
- Sonikatör (Bandelin Sonopuls)
- 10K Cut-off Santrifüj tüpleri (Amicon Ultra-15 10K Centrifugal Filtre)

- 250 ml'lik erlen
- Antibakteriyel Direnç Diskleri (Oxoid)

3.1.2 Kimyasallar

- 2-merkaptotanol (Sigma)
- Akrilamid (Sigma-Aldrich)
- Amonyum sülfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck)
- APS (Merck)
- Asetik asit (Sciencell)
- Bacto agar (BD)
- BHI (Brain Heart Infusion) (Merck)
- Biotin (Sigma-Aldrich)
- Bromofenol Blue (Amresco)
- Brucella Broth (Biolife)
- BSA (Bovine Serum Albumin) standart solüsyonu (Sigma)
- Coomassie brilliant blue G-250 (Santacruz)
- Coomassie brilliant blue R-250 (Santacruz)
- DMSO (Santacruz Bio)
- Etanol (Merck)
- FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco)
- Ficoll- Paque (GE Healthcare)
- Fosforik asit (Merck)
- Füksin (Merck)
- Gliserol (Sigma-Aldrich)

- Glisin (Sigma-Aldrich)
- HCl (Merck)
- İnozin (Sigma-Aldrich)
- Kanamisin (Sigma-Aldrich)
- KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich)
- Kristal viyole (Merck)
- Lityum L-laktat (Sigma-Aldrich)
- L-metiyonin (Sigma-Aldrich)
- Lugol çözeltisi (ADR)
- Metanol (Tekkim)
- Metilen bisakrilamid (Sigma-Aldrich)
- MgSO_4 (Bioshop)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)
- NaCl (Sigma-Aldrich)
- NH_4Cl (Bioshop)
- Potasyum hidroksit, KOH (Merck)
- SDS (Sigma-Aldrich)
- Sefsulodin (Sigma-Aldrich)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma)
- TEMED (Sigma-Aldrich)
- Tiamin B1 (Sigma-Aldrich)
- Trace mix A5 (Sigma-Aldrich)
- Trimetoprim (Sigma-Aldrich)
- Tris Base (Sigma)

- TSA (Tyriptic Soy Agar) (Sigma-Aldrich)
- Üre (MP)
- Vankomisin (Sigma-Aldrich)
- Fenol Red (Sigma-Aldrich)

3.1.3 Deneylerde Kullanılan Tampon, Besiyerleri, Antibiyotikler ve Kimyasalların Hazırlanışı

3.1.3.1 Tamponlar

PBS

8 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0,24 g KH_2PO_4 hassas terazide tartıldı. 900 ml distile su ile çözdürülerek pH 7.4'e ayarlandı ve son hacim 1 L olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Hazırlanan tampon otoklav ile steril edildi [211].

3.1.3.2 Besiyerleri

Brucella Broth Sıvı Besiyeri

1 L besiyeri için 28.1g Brucella Broth tartıldı, distile suda çözüldü. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 1.5 atm'de otoklavlandı ve daha sonraki kültür çalışmaları için +4°C'de saklandı. Deneylerde kullanılmadan önce %10 FBS ve 10 mg/L vankomisin, 10 mg/L sefsulodin ve 5 mg/L trimetoprim antibiyotikleri eklendi [54].

Brucella Broth Katı Besiyeri

1 L için 28.1 g Brucella Broth ve 15 g Bacto Agar tartıldı, distile suda çözüldü. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 1.5 atm'da otoklavlandı ve 45°C'ye kadar soğuması beklendi. 1L için 10 mg vankomisin ve 5 mg trimetoprim antibiyotikleri eklendi. Ardından %10 steril at kanı ile karıştırılarak besiyeri petrilere döküldü ve donması için beklendikten sonra sonraki kültür çalışmaları için +4°C'de saklandı [54].

Triptikaz Soya Agar

1 litre için 40g TSA besiyeri tartıldı ve 1 litre distile suda çözüldü. 121 °C’de 1.5 atm’da otoklavlandı ve 45°C’ye kadar soğuması beklendi. Besiyeri petrilere döküldü ve donması için beklendikten sonra sonraki kültür çalışmaları için +4°C’de saklandı.

LMM (Lactate minimal medium) Besiyeri

1 litre için; 4.0 g NH₄Cl, 1.4 g KH₂PO₄, 0.005 g Biotin, 0.02 g L-Methionine, 0.04 g Thiamine B1, 1.0 g Inosine, 0.03 g MgSO₄, 10.0 g Lithium L-lactate hassas terazide tartıldı ve 1.0 mL eser element çözeltisi (per liter: 0.375 g CuSO₄ · 5H₂O, 0.785 g MnCl₂ · 4H₂O, 0.183 g FeSO₄ · 7H₂O, 0.029 g Na₂MoO₄ · 2H₂O, ve 0.089 g ZnSO₄ · 7H₂O) ilave edildi. Çözelti 0.22µm’lik filtre ile steril edildi. Daha sonraki kültür çalışmaları için +4°C’de saklandı [201, 202].

BHI (Brain Heart Infusion)

1 litre için 37g BHI tartıldı ve distile suda çözdürüldü. 121 °C’de 1.5 atm’da otoklavlandı ve sonraki kültür çalışmaları için +4°C’de saklandı.

Kriyoprezervasyon İşlemi İçin Dondurma Besiyerleri

Önceden hazırlanan Brucella Broth ve BHI sıvı besiyerlerine %30 steril gliserol eklenerek dondurma solüsyonları elde edildi [212].

3.1.3.3 Antibiyotikler

Vankomisin

H. pylori kültür ortamında 10mg/L vankomisin eklendi. 10 mg/mL stok çözeltisi distile su ile hazırlandı ve her 1mL besi yeri için 1µL stok vankomisin çözeltisi eklendi.

Trimetoprim

H. pylori kültür ortamında 40mg/L trimetoprim eklendi. 40 mg/mL stok çözeltisi distile suya %10 DMSO eklenerek hazırlandı. Her 1mL besi yeri için 1µL stok trimetoprim çözeltisi eklendi.

Sefsulodin

H.pylori kültür ortamında 10 mg/L sefsulodin eklendi. 10 mg/mL stok distile su ile hazırlanarak her 1mL besi yeri için 1µL stok sefsulodin çözeltisi eklendi.

Kanamisin

100mg/L kanamisin için 100mg/mL kanamisin stoğu distile su ile hazırlandı.

3.1.3.4 Kimyasallar ve Solüsyonlar

3.1.3.4.1 Bradford Reaktifi

100 mg Coomassie Brilliant blue G-250 hassas terazide tartıldı ve 50 ml %95'lik etanol ile çözündürüldü. Hazırlanan karışımın üzerine 100 ml %85'lik fosforik asit eklenerek boyanın çözülmesi beklendi. Karışımın üzerine 850 ml distile su eklenerek 1 L'ye tamamlandı ve kullanımdan önce filtre edilerek diğer çalışmalar için +4'de saklandı [213].

3.1.3.4.2 SDS-PAGE Solüsyonları

Stok Akrilamid Jel Solüsyonu

30g akrilamid, 0,8g metilen bisakrilamid 100ml distile suda çözündürüldü.

Stok 4x Ayırıştırıcı Jel Tris Solüsyonu (1.5M Tris HCl pH:8.8, %0,4 SDS)

36,4g Tris Base 110ml distile suda çözündürüldü, 8ml %10 SDS eklendi ve pH.8,8'e 1N HCl ile ayarlandı. Son hacim distile su ile 200ml'ye tamamlandı.

Stok Toplayıcı Jel Tris Solüsyonu (0.5 M Tris HCl pH:6,8, %0,4 SDS)

12,12g Tris Base 110ml distile suya eklendi. Üzerine 8ml %10'luk SDS çözeltisi ilave edildi ve 1N HCl ile pH: 6,8'e ayarlanarak distile su ile son hacim 200ml'ye tamamlandı.

Stok 4X Tris-Glisin Kaset Tamponu - SDS

36g Tris base 172,8 g glisin 3L distile suda çözülerek hazırlandı.

1X Tris-Glisin Kaset Tamponu

750ml 4x Tris-Glisin rezervuar tamponuna 30ml %10'luk SDS eklenir ve distile su ile 3L'ye tamamlanır.

%10 Amonyumpersulfat (APS) Solüsyonu

0.1g APS 1ml distile suda çözdürüldü. SDS-PAGE deneyleri sırasında taze hazırlandı.

Stok 4X Örnek Yükleme Tamponu

4 ml gliserol ile 2ml 2-merkaptetanol karıştırıldı üzerine 1.2g SDS ve 5ml 4X toplayıcı jel tris solüsyonu eklendi. Solüsyona 0.03g bromofenol blue eklenerek karışım -20°C'de saklandı.

SDS-PAGE Jel Boyama Solüsyonu

500 ml metanol, 100 ml asetik asit 400 ml distile su ile karıştırıldı üzerine 0,25g Coomasie Brilliant Blue R250 eklenerek %50 metanol, %10 asetik asit, % 0.25 Coomasie Brilliant Blue R250 jel boyama çözeltisi hazırlandı.

SDS-PAGE Jel Fiksasyon Solüsyonu

10 ml asetik asit, 40 ml metanol 50 ml distile su ile karıştırılarak %10 asetik asit, %40'lık metanol çözeltisi hazırlandı.

SDS-PAGE Jel Boya Giderim Solüsyonu

5ml metanol, 7.5ml asetik asit ve 87.5ml distile su karıştırılarak %5 metanol, %7,5 asetik asit, çözeltisi hazırlandı.

SDS-PAGE Jel Saklama Solüsyonu

7ml asetik aside 93 ml distile su eklenerek %7 asetik asit çözeltisi hazırlandı.

3.1.3.4.3 SEM Analizi Fiksasyon Solüsyonu

SEM analizi için %5 paraformaldehit, %2 gluteraldehit içeren solüsyon hazırlandı. 20 ml distile su içine 5 g paraformaldehit eklendi. 60°C'ye kadar ısıtıldı. 1-2 damla 1M NaOH ilave edildi ve çözelti berraklaşana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve ardından çözelti soğutuldu. Üzerine %50'lik gluteraldehit çözeltisinden 4ml eklendi ve çözelti PBS ile 100ml'ye tamamlandı [168].

3.1.3.5 Deneylerde Kullanılan Bakteri Suşları

Helicobacter pylori

Deneysel çalışmalarda kullanılan standart ATCC 43504 *H. pylori* suşu (fenotipi: biyofilm oluşturma), İstanbul Üniversitesi, Çapa Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Betigül Öngen tarafından temin edilmiştir. Ayrıca *H. pylori* kültürünün optimizasyon çalışmalarında kullanılan hastalardan izole edilen klinik *H. pylori* suşları ve bu suşların kültürünün yapılmasında kullanılan steril at kanı, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Bekir S. Kocazeybek tarafından temin edilmiştir.

Micrococcus luteus

Deneysel çalışmalarda ticari olarak temin edilen ATCC 4698 (= Flaming strain NCTC 2665) *M. luteus* suşu kullanılmıştır. Laboratuvarımızda yeterli miktarda kriyobankı oluşturulmuştur.

3.2 Metod

3.2.1 *Helicobacter pylori* Deneysel Çalışmalar

3.2.1.1 *Helicobacter pylori* 'nin Kriyobanktan Çıkarılması ve Kriyoprezervasyonu

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda bulunan sıvı azot tankı içerisinde muhafaza edilen *H.pylori* bakterisi çıkarılarak oda sıcaklığında çözünmesi beklendi ve %10 at kanı içeren Brucella Broth katı besiyeri yerine aktarıldı. 37°C'de 72 saat mikraerofilik ortamda inkübe edilerek kolonilerin oluşumu beklendi. Çoğaltılan ve üreaz, katalaz,,oksidaz testleri yapılan *H. pylori* bakterileri sıvı azot tankında saklanmak üzere 15 dakika 8000 rpm'de santrifüjlenen bakterilerin süpernetantı uzaklaştırıldıktan sonra pellet 1ml %30 gliserol %10 FBS içeren Brucella Broth dondurma solüsyonu ile süspanse edildi ve kriyotüplere aktarıldı. 1 saat -40°C'de bekletilen *H. pylori* bakterileri sıvı azot tankına aktarıldı.

3.2.1.2 *Helicobacter pylori* Devamlı Kültürünün Yapılması

H. pylori %10 at kanı içeren Brucella katı besiyerine 72 saatte bir pasajlanarak kültür devam ettirildi. Sıvı Brucella Broth besi yerinde ise 48 saatte bir bakteri sayısı 10^7 cfu/mL olacak şekilde %10 FBS ve 10mg/L vankomisin içeren yeni Brucella Broth besiyeri ortamına aktarılarak kültür devam ettirildi.

3.2.1.3 *Helicobacter pylori* Karakteristik Özelliklerin Belirlenmesi

Üreaz, Katalaz ve Oksidaz Testleri

Üreaz : 100 ml Brucella Broth besiyerine %2 üre, 0,001g/L fenol red eklendi. Besiyerinin sarıdan pembeye dönmesi pozitif sonuç olarak Kabul edildi [214].

Katalaz Testi : Test edilecek petriden öze yardımı ile bir miktar bakteri alındı ve lamin üzerine konuldu. %3 H_2O_2 çözeltisi bakteri pelletine damlatıldı. Kabarcıkların ve baloncukların oluşumu katalaz testinin pozitif sonuç verdiği kabul edildi [214].

Oksidaz Testi : Bactident Oxidase (Merck 1.13300) test kiti kullanılarak oksidaz testi yapılmıştır. Petriden alınan yoğun koloniler test kitinin ucuna öze yardımı ile sürüldü 20-30 saniye renk değişimi beklendi. Mor-menekşe renk oluşumu pozitif kabul edildi [214].

Gram Boyama

Lamel üzerine 10 μ L PBS besiyeri damlatıldı. Petriden öze ile az miktarda bakteri alındı ve lamin üzerindeki besiyeri ile süspanse edildi. Lamel yardımı ile lam üzerinde ince bir yayma yapıldı. 3 kez ateş ile tespit işleminin ardından kristal viyole damlatıldı 2 dakika bekledir ve su ile yıkandı. Daha sonra lugol ile 2 dakika inkübe edilen lam önce suyla daha sonra alkol ile yıkandı ve lamin üzerine füksin damlatıldı 3 dakika beklenerek suyla yıkandı. Lamin kuruması beklendi ve görüntülenmek üzere lamlara imersiyon yağı damlatılarak 100x büyütme ile mikroskopta incelendi [215].

3.2.1.4 *Helicobacter pylori*'nin Kokoid Formlarının Oluşturulması ve Görüntülenmesi

Helicobacter pylori Kokoid Formlarının Oluşturulması

Katı besiyerinden alınan saf *H. pylori* kolonileri, 50 ml , %10 FBS, vankomisin, trimetoprim ve sefsulodin içeren beş farklı Brucella Broth besi yerinde 37°C'de mikroaerofilik ortamda 110 rpm çalkalamalı inkübatörde inoküle edildi. Optik Densite (OD) değeri 0.02'ye ulaşan kültür ortamları kokoid formu oluşturulmak üzere beş farklı koşula maruz bırakılarak kokoid oluşumları takip edildi.

- **Uzun süreli kültür:** OD değeri 0.02'ye ulaşmış kültür mikroaerobik koşulda 37°C'de 192 saat boyunca besiyeri değiştirilmeden inkübasyona devam ettirildi.
- **Sıcaklık:** OD değeri 0.02'ye ulaşmış iki kültür +4 ve +22 °C'lerde mikroaerobik koşullarda 192 saat boyunca inkübasyona devam ettirildi.
- **Antibiyotik:** OD değeri 0.02'ye ulaşmış kültüre 100 mg/L kanamisin ilave edildi ve mikroaerobik koşullarda 37 °C'de 192 saat boyunca inkübasyona devam edildi.
- **PSS (Açlık):** OD değeri 0.02'ye ulaşmış kültür besiyerinden uzaklaştırmak için 8000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernetant uzaklaştırıldı. Bakteri peleti steril PBS ile resuspanse edildi ve elde edilen yeni bakteri kültürü mikroaerofilik ortamda 37 °C'de 192 saat boyunca inokübasyona devam ettirildi.

Helicobacter pylori Kokoid Formlarının Görüntülenmesi

Kokoid oluşumunu gözlemek ve canlı bakteri miktarını kontrol etmek amacıyla;

- 24 saatte bir örnek alınarak OD₆₀₀'de total bakteri sayısı belirlenmiştir.
- 24 saatte bir alınan örneklerde Flow-cytometre analizi ile de spiral ve kokoidlerin dağılımı ve yüzdelik değerleri hesaplandı.

- 48. saatte ve 192 saatlik inkübasyona sonrası alınan örnekler gram boyama yapıldı ve SEM analizi ile morfolojileri görüntülendi.

UV- Spektrofotometre Ölçümleri : Total bakteri sayısının belirlenmesi için 0.an da dahil olmak üzere 24 saatte bir alınan 1mL örnekler quartz küvetlere aktarılarak 600 nm’de absorbansı ölçüldü. 1 OD değeri 10^9 cfu/mL kabul edilerek hesaplamalar yapıldı. Elde edilen veriler grafik haline getirildi.

Flow Sitometre Analizleri : 0. an da dahil olmak üzere 24 saatte bir alınan uzun süreli kültür, PBS(açlık), +4°C, +22°C ve kanamisin ilaveli beş farklı ortama maruz bırakılan kültürlerden 500 µL örnekler besiyerlerinden uzaklaştırılmak için 8000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernetant uzaklaştırılarak pellet 500 µL PBS ile süspanse edildi. Elde edilen Süspanse örnekler Flow-sitometre ile ölçümü gerçekleştirildi.

SEM Analizi ile Görüntüleme

Örneklerin Au-Pb ile kaplamaları ve SEM analizleri Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Quorum sc7620 kaplama cihazı ile Au-Pb ile kaplanan örnekler Zeisa Evo LS10 SEM cihazı ile morfolojik değişimler Öğretim Görevlisi Melih Beşir Arvas ve Uzman Erhan Akkaya eşliğinde görüntülemeleri yapılmıştır. Örnekler analizden önce fiksasyon işlemine maruz bırakılmıştır. Fiksasyon için 2.10^7 cfu/mL bakteri içeren örnekler 8000 rpm’de, 15 dakika santrifüjlendi. Süpernetantları uzaklaştırılan örnekler üzerine 1mL %5 paraformaldehit, %2 glutealdehit içeren fiksasyon sıvısı ilave edilerek süspanse edildi ve örnekler 90 dakika fikse edildi. Fiksasyon işleminin ardından 8000 rpm’de, 15 dakika santrifüjlenerek PBS ile 3 kez yıkama yapıldı. Yıkama işleminin ardından %30, %50, %70, %90 ve %96 etanol içeren çözeltilerde seri dehidrasyon işlemi uygulandı. %30, %50, %70, %90’lık etanol çözeltilerinde 10’ar dakika dehidre edilen örnekler her bir işlemten sonra 8000 rpm’de, 15 dakika santrifüjlendi ve sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %96’lık etanol çözeltilerinde dehidre edildi. %96’lık etanol çözeltisinde 2 kez 20dakika bekletilen örnekler 8000 rpm’de, 15 dakika santrifüjlendi ve pellet 50 µL %96’lık etanolla çözdürülerek SEM analiz gridlerinin üzerine damla damla konarak tüm gece kuruması beklendi [168].

3.2.2 *Micrococcus luteus* Deneysel Çalışmalar

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı'nda bulunan sıvı azot tankı içerisinde muhafaza edilen *M. luteus* bakterisi çıkarılarak oda sıcaklığında çözünmesi beklendi ve bakteri süspansiyonu TSA katı besi yerine aktarıldı. 30°C'de 48 saat aerofilik ortamda inkübe edilerek kolonilerin oluşumu beklendi.

3.2.2.1 *Micrococcus luteus* Devamlı Kültürünün Yapılması ve Kriyoprezervasyonu

M. luteus katı TSA besiyerinde 72 saatte bir öze yardımı ile pasajlanarak kültür devam ettirildi.

3.2.2.2 *Micrococcus luteus* Büyüme Eğrisinin Çıkarılması

TSA besiyerinde üretilmiş olan saf koloniler 1 ml'lik LMM besiyerine aktararak süspanse edildi. 600 nm'de absorbansı ölçülerek bakteri sayısı (cfu) belirlendi. 75 ml LMM içeren erlene 2.10^7 cfu/mL bakteri olacak şekilde süspanse kültürden bakteri ekimi 250 mL'lik erlene gerçekleştirildi. Erlen 160 rpm, 30°C'de 144 saat boyunca kültüre edildi ve 24 saatte bir alınan örnekler 600 nm'de UV-spektrofotometrik ölçümleri alındı ve elde edilen değerler garfiğe aktarıldı.

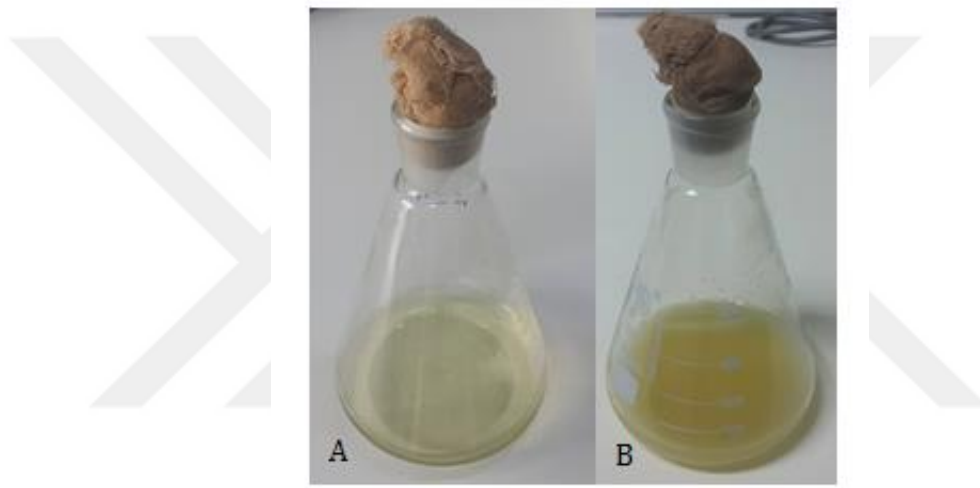
Gram Boyama

Lamel üzerine 10 µL PBS damlatılarak petriden öze ile az miktarda bakteri alındı ve lamın üzerindeki besiyeri ile süspanse edildi. Lamel yardımı ile lam üzerinde ince bir yayma yapıldı. 3 kez ateş ile tespit işleminin ardından kristal viyole damlatıldı 2 dakika beklendi ve su ile yıkandı. Daha sonra lugol ile 2 dakika inkübe edilen lam önce suyla daha sonra alkol ile yıkandı ve lamın üzerine füksin damlatıldı 3 dakika beklenerek suyla yıkandı. Lamın kuruması beklendi ve görüntülenmek üzere lamlara imersiyon yağı damlatılarak 100x büyütme ile mikroskopta incelendi [215].

3.2.2.3 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimini İçeren Metabolitlerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Resusitasyon Promatör Faktör Enzimi İçeren Metabolitlerin Üretimi

24 saat TSA besiyerinde inoküle edilmiş *M. luteus* saf kültürü LMM (laktat minimal medium) besi yeri içerisinde 30°C'de 160 rpm çalkalayıcıda 36 saat inoküle edildi. Elde edilen ön kültürden alınan bakteri süspansiyonu 250 ml flask içinde 80 ml LMM eklenmiş yeni bir flaskta aktarıldı. Aynı kültür koşullarında yeni ortama aktarılan ön kültür, bakteriler geç logaritmik faza ulaşıncaya kadar kültürlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1 *M. luteus* bakterilerinin 250 mL'lik erlenlerde 80 ml LMM besiyerinde 30°C, 160rpm'de inkübasyona görüntüsü. Inkübasyona öncesi (A), inkübasyonun 60. saati (B)

Elde edilen fermentasyon sıvısı 8000 rpm de 15 dakika santrifüj edilir ve elde edilen süpernetantlar Şekil 3.2'de gösterilen Amicon Ultra-15 10K ultrasantrifüj tüpleri ile 30dk, 5000g, +4°C'de konsantre edildi. Fitrenin üst tarafında elde edilen konsantre metabolit 0.22 µm filtreden geçirildi. Elde edilen RPF enzimini içeren metabolitler -20 °C'de diğer deneyler için saklandı [201, 202], [209].



Şekil 3. 2 Amicon Ultra-15,10K santrifüj tüpü görüntüsü

3.2.3 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimi İçeren Metabolitlerin Karakterizasyonu

3.2.3.1 Bradford Protein Tayin Yöntemi

Protein miktarının belirlenmesi için Bradford Protein Tayin yöntemi kullanılmıştır [201].

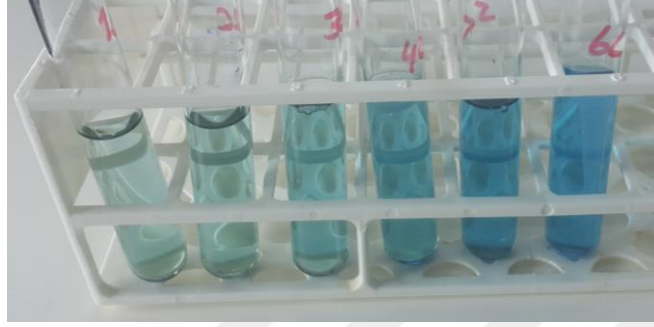
BSA Standart Grafiğinin Oluşturulması

1 mg/mL BSA, % 0,9 NaCl, distile su ve Bradford reaktifi cam tüplere Tablo 3.1'deki gibi eklendi.

Tablo 3. 1 BSA standart grafiği hazırlama tablosu

	Kör	0,01mg	0,05 mg	0,1 mg	0,25 mg	0,5 mg
1mg/ml BSA	0	1 µL	5 µL	10 µL	25µL	50µL
d.H ₂ O	100 µL	99 µL	95 µL	90 µL	75 µL	50 µL
%0,9 NaCl	5.9 ml	5.9 ml	5.9 ml	5.9 ml	5.9 ml	5.9 ml
Bradford Reaktifi	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Toplam	7 ml	7 ml	7 ml	7 ml	7 ml	7 ml

Önceden hazırlanan Bradford reaktifinden Şekil 3.3'deki gibi her tüpe 2 ml eklendi, cam tüpler vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika reaksiyon gerçekleştirildi. 595 nm'de UV spektrofotometrede ölçüm gerçekleştirilmek üzere quartz küvetlere 1 ml reaksiyon solüsyonu aktarıldı. Elde edilen sonuçlardan standart grafiği oluşturuldu [213].



Şekil 3. 3 BSA Standart grafiği oluşturulurken elde edilen solüsyonların görüntüsü
Protein Konsantrasyonu Bilinmeyen *M. luteus* Metabolitlerinin Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı bilinmeyen süpernetanttan alınan 10 µl, 25 µl, 50 µl, 100 µl, örnekler distile su, 5.9 ml %0,9 NaCl ve 2 ml Bradford reaktifi eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon solüsyonundan alınan 1 ml örnekler 595 nm'de UV spektrofotometrede absorbansları ölçüldü [213].

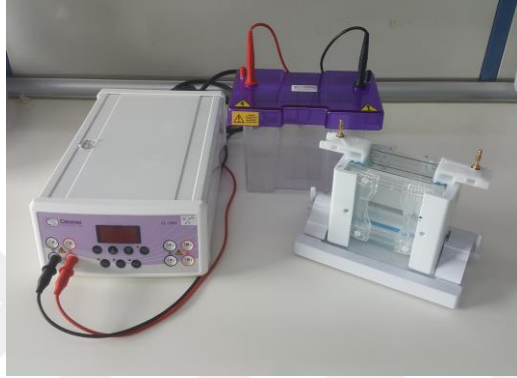
Elde Edilen Absorbanslardan Protein Miktarlarının Hesaplanması

Konsantrasyona karşı elde edilen absorbanslar Excel programı ile grafik haline getirildi. Bilgisayarda oluşturulan BSA standart grafiğinde elde edilen denklem uygulanarak örneklerin protein miktarları hesaplandı [213]. Konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin absorbans değerleri grafik denkleminde y değerine konularak x (Protein miktarı µg/mL) hesaplandı.

3.2.3.2 SDS-PAGE Analizi ile Boyut Analizi

12-30 kD aralığındaki proteinler için %15'lik akrilamid jel hazırlandı. Ayırıcı jel için; 3.75ml distile su, 7.5ml %30 akrilamid solüsyonu, 3.75ml 4X ayırıcı Tris solüsyonu ve 150µL %10 APS solüsyonu karıştırıldı son olarak 15 µL TEMED

eklenerek ayırıcı jel kasetlere dökülerek 30dk jelleşmesi beklendi. Toplayıcı jel için; 3ml distile su, 1ml %30 akrilamid solüsyonu, 1.6ml 4X toplayıcı jel tris solüsyonu ve 100µL %10 APS karıştırılarak 10 µL TEMED eklendi ve kasetlere döküm gerçekleştirildi. Jelin donması için 1 saat beklendi. Her bir kuyuya 1:4 oranında örnek yükleme tamponu ile seyreltilen ve 2dk kaynar suda bekletilen örneklerden 10µL örnek yüklendi ve Şekil 3.4'de gösterilen SDS-PAGE cihazı ile 150 V'da örnekler tek sıra hizaya gelinceye kadar yürütüldü. Örneklerin ayrıştırılması için yürütmeye 240V ile devam edildi.



Şekil 3. 4 SDS-PAGE analizi malzemeleri ve cihazı

Oluşan bantların görüntülenmesi amacıyla jel 30 dk fiksasyon çözeltisinde inkübe edildi ve 2 saat boyunca jel boyama tamponu ile boyandı. Boya giderim için belli aralıklarla değiştirilen boya giderici solüsyonda 1 gece inkübe edildi. Jeller jel saklama solüsyonunda saklandı.

3.2.4 Resusitasyon Promatör Faktörleri İçeren *Micrococcus luteus* Ekstrasellüler Metabolitlerinin *Helicobacter pylori* Kokoid Formlarının Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

Toplam protein miktarı belirlenen *M. luteus* metabolitlerinin doza bağımlı etkisini belirlemek için, %10 FBS, 10mg/L vancomisin içeren 10 ml Brucella Broth sıvı besiyerlerine, 1, 10 ve 100 µg/ml (33 µL, 333 µL ve 3 ml) konsantrasyonlarında RPF içeren metabolit solüsyonu ilave edildi [36]. Öceden elde edilen 5 farklı sıcaklık, antibiyotik ve açlık koşullarında oluşturulmuş *H.pylori* kokoid formları 8000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek toplandı ve pelletler RPF içeren metabolit eklenmiş yeni

besiyeri ortamlarına aktarılarak 37°C’de mikroaerofilik ortamda inoküle edildi. Negatif kontrol amacıyla;

1. *M.luteus* ‘dan elde edilen metabolit otoklavlanarak [209, 210] %10 FBS, 10mg/L vancomisin içeren 10 ml Brucella Broth sıvı besiyerlerine 3ml (100 µg/ml rpf içeren metabolit), 333µL (10 µg/ml rpf içeren metabolit) ve 33µL (1 µg/ml rpf içeren metabolit) aktarıldı. Santrifüj ile toplanan *H.pylori* kokoid formlarını içeren pellet her bir flaskta 2.10^7 cfu/mL olacak şekilde besiyerine ilave edildi ve kültür ortamı 37°C’de mikroaerofilik ortamda inoküle edildi.

2. 3ml LMM besiyeri %10 FBS, 10mg/L vancomisin içeren 10 ml Brucella Broth sıvı besiyerlerine aktarıldı. Santrifüj ile toplanan *H.pylori* kokoid formlarını içeren pellet 2.10^7 cfu/mL olacak şekilde besiyerine ilave edildi ve kültür ortamı 37°C’de mikroaerofilik ortamda inoküle edildi.

3. %10 FBS, 10mg/L vancomisin içeren 10ml Brucella Broth besiyerine santrifüj ile toplanan *H.pylori* kokoid formlarını içeren pellet 2.10^7 cfu/mL olacak şekilde besiyerine ilave edildi ve kültür ortamı 37°C’de mikroaerofilik ortamda inoküle edildi.

Tablo 3. 2 Kanamisin ve PBS ile indüklenen *H. pylori* kokoidlerinin farklı ortam koşullarında inkübasyonuna ait tablo.

Kanamisin ile indüklenen kokoid +	Brucella Broth + %10 FBS + 100 µg/mL RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + 10 µg/mL RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + 1 µg/mL RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + 100 µg/mL inaktif RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + 10 µg/mL inaktif RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + 1 µg/mL inaktif RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + LMM
	Brucella Broth + %10 FBS

PBS ile indüklenen kokoid +	Brucella Broth + %10 FBS + 100 µg/mL RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + 10 µg/mL RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + 10 µg/mL RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + 100 µg/mL inaktif RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + 10 µg/mL inaktif RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + 1 µg/mL inaktif RPF içeren metabolit.
	Brucella Broth + %10 FBS + LMM
	Brucella Broth + %10 FBS

Deney ve kontrol grupları Tablo 3.2’de birlikte gösterilmiştir.

3.2.4 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimini İçeren Metabolitin *Helicobacter pylori* Kokoid Formu Üzerindeki Resusitasyon Etkisinin Kontrolü

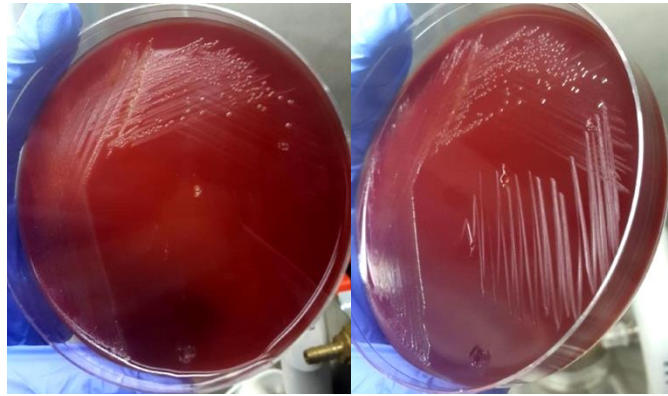
RPF içeren metabolit eklenmiş besiyerlerinde resusitasyonun kontrolü amacıyla;

- Işık mikroskobunda görüntüleme yapıldı
- Gram boyamalar gerçekleştirildi.
- Flow-sitometre analizleri gerçekleştirildi.
- UV spektrofotometre analizleri ile bakteri sayıları belirlendi.
- SEM ile morfolojik değişimler görüntülendi.

4.1 *Helicobacter pylori* ve Elde Edilen Deneysel Çalışma Sonuçları

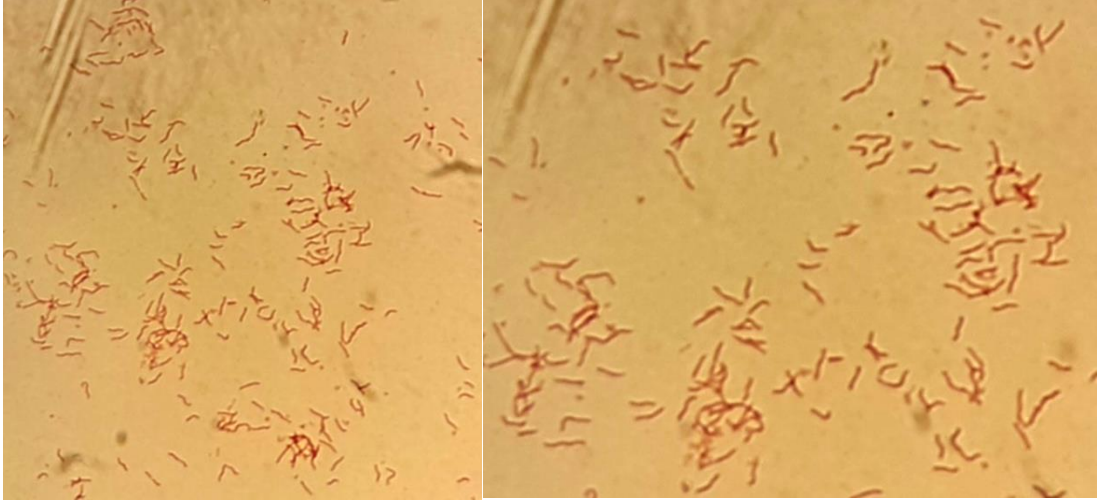
4.1.2 *Helicobacter pylori* Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi

H. pylori Brucella agar üzerinde şeffaf, renksiz ve pürüzsüz küçük koloniler oluşturmaktadır. Koloni oluşturma süresi diğer bakteri türlerine nazaran daha uzundur bu nedenle katı besiyerlerine ekimi gerçekleştirilen bakteriler 72 saat boyunca 37°C'de mikraerofilik ortamda inkübe edilmişlerdir. Kriyobanktan çıkarılan *H. pylori*, besiyerlerine adaptasyonun gerçekleştirilmesi adına vankomisin, trimetoprim ve sefsulodin içermeyen %10 at kanı içeren Brucella agar kullanılmıştır. Şekil 4.1'de *H. pylori*'nin 72 saatlik inkübasyona süresi bitiminde oluşturduğu koloniler gösterilmiştir.



Şekil 4. 1 *H. pylori*'nin %10 at kanı içeren Brucella Agar besiyerindeki oluşturduğu kolonilerin görünümü

Katı besiyerine adaptasyonu gerçekleşen bakterilerden 2-3 koloni seçilerek sıvı Brucella Broth besiyerine aktarılmış ve 100 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inoküle edilmiştir. 48 saat sonra kültür ortamından alınan örneklerle gram boyama yapılmıştır.

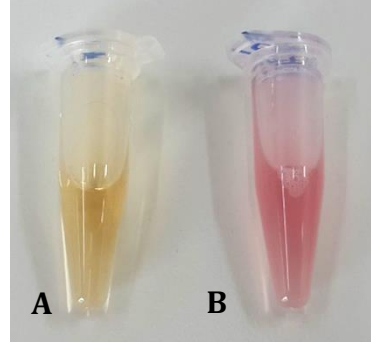


Şekil 4. 2 *H. pylori* 'nin 48.saatte sıvı Brucella Broth'dan alınan örneklerin gram boyama sonucunda ışık mikroskobu ile 100x büyütmedeki görüntüsü

Şekil 4.2 'de gösterildiği gibi *H. pylori* bakterileri pembe boyanarak tipik gram negatif bakteri özelliği sergilemiştir. 48. Saatte %100 spiral morfolojide olduğu gözlemlenmiş ortamda kokoidlere rastlanmamıştır. Gram boyamada *H. pylori*'ler kıvrımlı basil şeklinde gözlemlenmiştir.

Üreaz, Katalaz ve Oksidaz Testleri

H. pylori üreaz, katalaz ve oksidaz pozitif bir bakteridir. *H. pylori* 10 dakika gibi kısa sürede üreaz testine pozitif yanıt vererek diğer üreaz pozitif bakterilerden ayrılmaktadır. Bu nedenle üreaz testi *H. pylori*'nin katarakterize edlmesinde en belirleyici testlerden biridir. Tez çalışması kapsamında Brucella broth besiyerinde inkübe edilen bakterilerden 48.saatte alınan örnekler 8000 rpm'de 10dk santrifüjlenerek süpernetant uzaklaştırılmış ve pelletler üzerine üreaz test solüsyonu eklenmiştir. Bakteri yoğunluğuna bağlı olarak test süresi değiştiği gözlemlenmiş ve 10 dk gibi bir sürede test pozitif sonuçlanmıştır. Şekil 4.3 'de sarı besiyerinin pembeye dönüştüğü gözlemlenerek örnekte *H. pylori*'nin varlığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 3 Üreaz testi. A: negatif sonuç, B: pozitif sonuç

H. pylori'nin karakterizasyonunda aynı zamanda katalaz ve oksidaz testleri de uygulanmıştır. Katalaz testi için katı besiyerinden alınan saf *H. pylori* kolonileri lam üzerine öze yardımı ile yayıldı. Üzerine %3'lük H₂O₂ damlatılarak katalaz testi yapılmıştır. Solüsyonun damlatılmasıyla birkaç saniye içerisinde kabarcıkların olduğu gözlemlenmiştir. Oksidaz testi için katı besiyerinden alınan saf *H. pylori* kolonileri oksidaz test strip üzerine öze yardımı ile sürülmüştür. Strip ucu mor menekşe olduğu gözlemlenerek *H. pylori*'nin oksidaz pozitif olduğu belirlenmiştir.

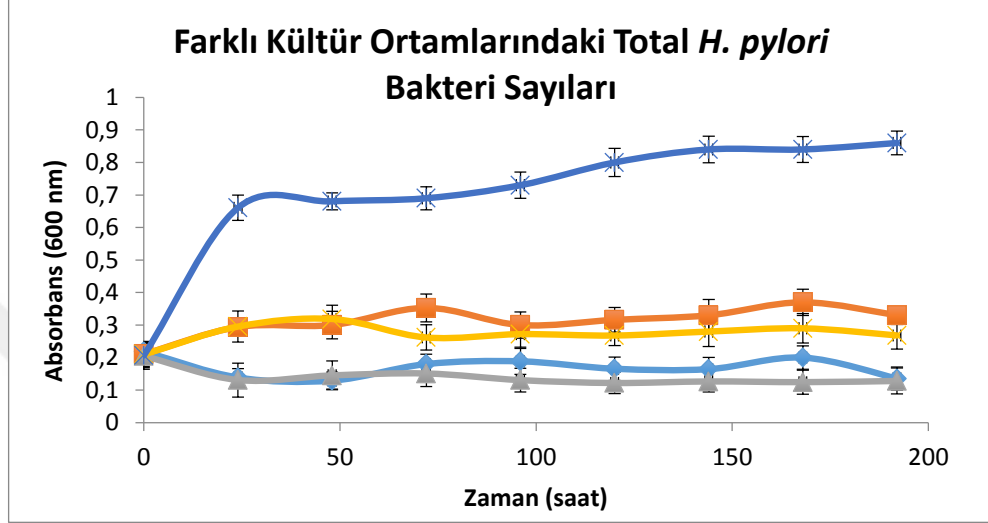
Sonuç olarak ATCC 43504 suşunun üreaz, katalaz ve oksidaz pozitif sonuç vermesiyle *H. pylori* bakterisinin varlığı kanıtlanmıştır ve tezin sonraki aşamalarında kokoid formlarının oluşturulması için bu suşun kullanımına karar verilmiştir.

4.1.2 *Helicobacter pylori*'nin Spiral Formlarının Kokoid Forma Dönüştürülmesi

Materyal Metot bölümünde bahsedildiği gibi, tez çalışmasının hedeflerine uygun olarak, *H. pylori*'nin spiral formlarının kokoid forma dönüştürülmesi amacıyla 5 farklı ortam koşulu kullanılmıştır. Bu koşullar sırasıyla; +4 ve +22 C'de inkübasyon, kanamisin ile muamele, besin içermeyen ortamda (PBS) inkübasyon, , uzun süreli kültüvasyondur. Her bir koşul altında 192 saatlik inkübasyon sırasında bakterilerin morfolojik değişimleri ve canlılık değerleri çeşitli yöntemlerle gün gün takip edilmiştir.

4.1.2.1 Beş Farklı Koşulda İnoküle Edilen *H. pylori* Bakterilerinin Zamana Bağlı Total Bakteri Sayıları

Şekil 4.4.'de farklı koşullar altında kültürü gerçekleştirilen *H. pylori* bakterilerinin toplam sayılarının UV Spektrofotometre'de 600 nm'de ölçümüne ait sonuçlar sunulmuştur.



Şekil 4. 4 Beş farklı koşulda inkübe edilen *H. pylori* bakterilerinin zamana bağlı total bakteri sayısındaki değişim, Sırasıyla aşağıdan yukarı; Uzun süreli kültür, +22 ve +4°C'de inkübasyon, PBS ve kanamisin ile inkübasyon

Sonuçlara göre 24 saatlik inkübasyon sonrasında kanamisin (100 µg/ml) ile muamele edilen bakterilerin sayısında başlangıç inkübasyon değerine göre bir miktar azalma tespit edilmiş olup, ilerleyen günlerden total sayıda herhangi bir artış gözlenmemiştir. Benzer şekilde +4°C'de kültürü gerçekleştirilen bakterilerin miktarında da inkübasyon süresi boyunca herhangi bir anlamlı artışa rastlanmamıştır. Diğer yandan normal koşullar altında sürdürülen ve herhangi bir strese maruz bırakılmayan uzun süreli kültür esnasında bakteri sayısında inokülasyonu takip eden 24 saatlik sürenin sonucunda başlangıç değerine göre yaklaşık 3 katlık bir artış belirlenmiştir. Devam eden günlerde ise bu oranın sabit kaldığı gözlenmiştir. Buna karşılık, besiyeri içermeyen ortam koşullarında ve 22°C'de inkübe edilen bakterilerin sayısında 24 saatlik inkübasyonun ardından bir artış görülse de, artışın kontrol grubundaki bakterilerin toplam sayısındaki artışa kıyasla çok daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu ortam koşullarında toplam bakteri sayısı 48. saatin sonunda sabit hale gelmiş ve ilerleyen günlerden herhangi bir değişiklik ortaya

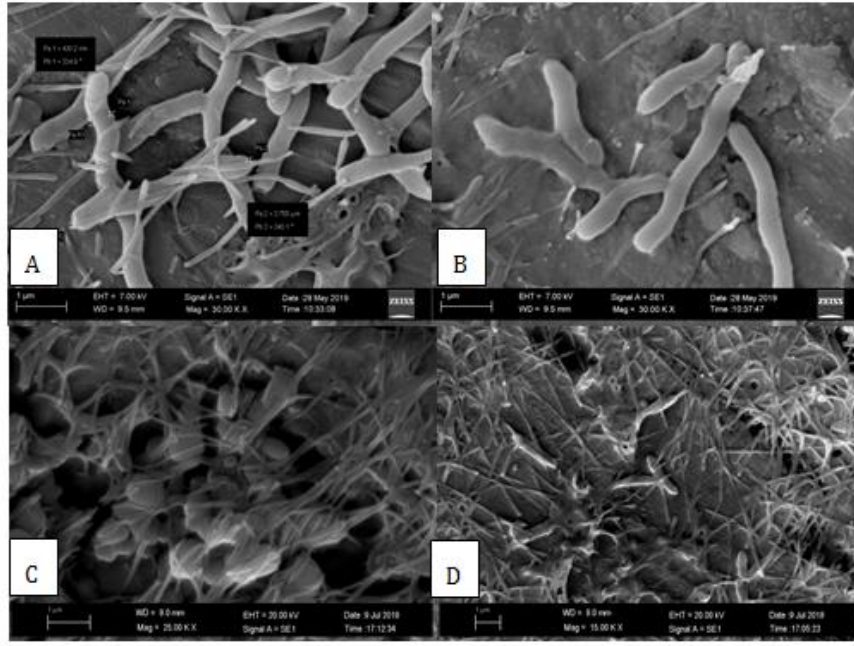
çıkamamıştır. Bu sonuçlar, *H. pylori*'nin spiral formdan kültürlenemez hale gelmesi için en uygun yöntemlerin kanamisin ile muamele veya PBS ile kültüvasyon olduğunu ortaya çıkarmıştır. Aynı zamanda grafikten elde edilen verilere göre zamanla sabitlenen OD değeri spiral bakterilerin kokoid forma dönerek zamanla canlılıklarını ve üreme yeteneklerini kaybettiğini göstermektedir.

4.1.3 Farklı Ortam Koşullarına Maruz Bırakılan *Helicobacter pylori* Bakterilerinin Morfolojilerinin SEM ile Görüntülenmesi

OD₆₀₀ 0,02'ye ulaşan *H. pylori* kültürleri kokoidlerin oluşturulması amacıyla 5 farklı ortama maruz bırakılmıştır. Kültürün 48. ve 192.saattinde farklı ortamlara maruz bırakılan *H. pylori* kültüründen örnekler alınarak SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Böylece bu iki saat dilimi arasında bakterilerdeki morfolojik değişim kıyaslı olarak incelenmiştir. Bunun için kültürden alınan ve 2.10⁷cfu/mL bakteri içeren örnekler 8000rpm 10 dakika santrifüjlenmiş süpernetantlar uzaklaştırılmış ve pelletler %5 paraformaldehit, %2 gluteraldehit solüsyonu ile fiksasyon işlemine maruz bırakılmıştır. Fiksasyonun ardından dehidrasyon işlemi uygulanmış ve örnekler SEM cihazı gridlerinin üzerine damlatılarak 1 gece kurutulmuştur.

1. Uzun Süreli Kültürün Kokoid Oluşumuna Etkisi

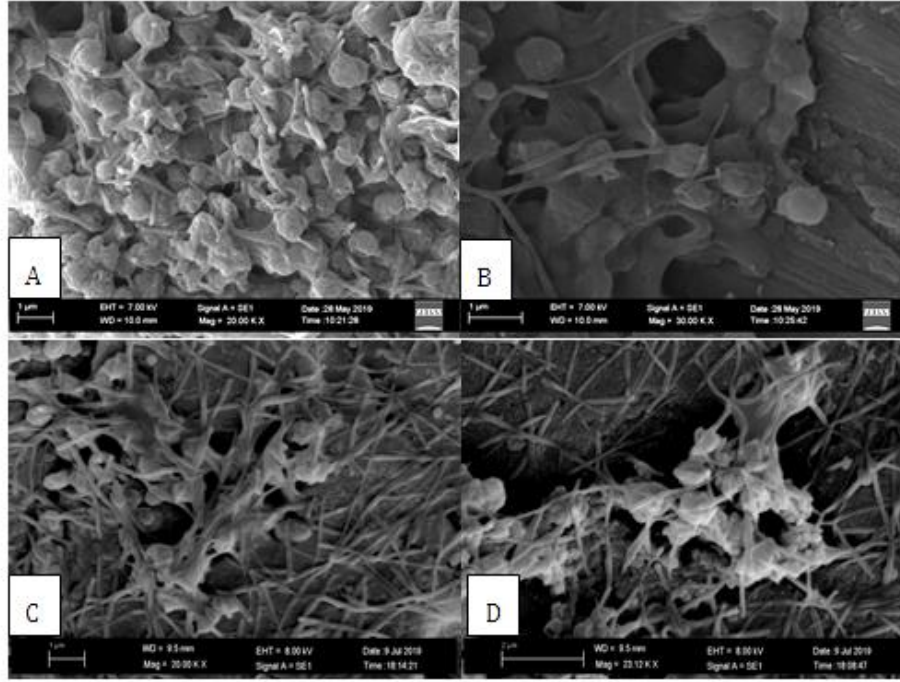
48. ve 192. saatte alınan örnekler 30.000X ve 40.000X büyütmede bakılmıştır. Şekil 4.5 A ve B'de 48.saatlik inkübasyonun sonunda *H. pylori* kültüründen alınan örneklerdeki spiral bakteriler gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere *H. pylori*'nin kıvrımlı basil morfolojisine uygun olarak boyutlar 3,7µm ile 0,43 µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir. SEM görüntülerine göre bakterilerin yığınlar oluşturduğu görülmüştür. 48.saatte %10 FBS içeren sıvı Brucella Broth besiyerinde herhangi bir strese maruz bırakılmayan örneklerde kokoidlere rastlanmamıştır. Diğer yandan Şekil 4.5 C ve D'de ise 192 saat inkübe edilen *H. pylori* bakterilerine ait SEM görüntüleri bulunmaktadır. Şekilde de görüldüğü üzere kültürün çoğunluğuna kokoidlerin hakim olduğu, spiral morfolojiye sahip bakterilerin ise sayısının kokoidlere göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte uzun süreli kültür koşullarında inkübasyonun ardından ortamda halen spiral şekilli bakterilerin bulunması dikkat çekici bulunmuştur.



Şekil 4. 5 %10 FBS, vankomisin, sefsulodin ve trimetoprim içeren *H. pylori* kültüründen 48.saatte alınan (A, B) ve 192. Saatlik inkübasyona sonrası alınan (C, D) örneklerin SEM görüntüleri

2. PBS ile İnoküle Edilen (Açlık) Kültürün Kokoid Oluşumuna Etkisi

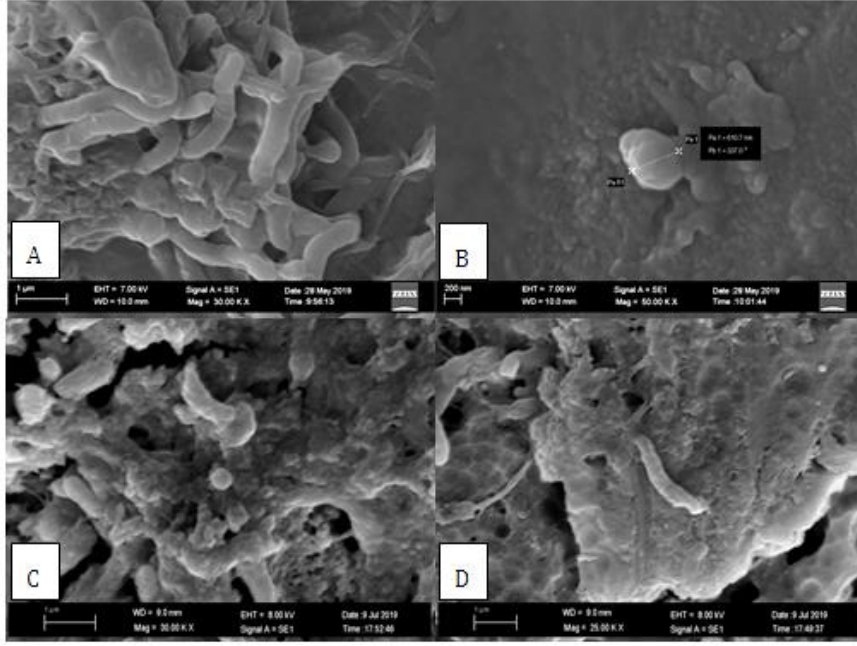
OD₆₀₀ 0,02'ye ulaşan kültür 8000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerak çöktürülmüş, süpernetant uzaklaştırıldıktan sonra pellet PBS ile inkübe edilerek bakteriler besin içermeyen ortamda bırakılmıştır. PBS ile süspanse edilen bakteriler 37 °C'de 110 rpm çalkalamalı inkübatörde inkübasyonuna devam edilmiştir. SEM analizi öncesi 48. ve 192. saatlerde kültürden alınan örnekler fikse edilmiş ve dehidre edilmiştir. Örnekler SEM cihazında 20.000X ve 30.000X büyütmelerde analiz edilmiştir. Şekil 4.6 A ve B'de 48 saatlik inkübasyona sonrası *H. pylori* bakterilerinin SEM cihazındaki görüntüleri gösterilmiştir. 48. saatlik inkübasyonun ardından bakteri kültüründe kokoidlerin spirallere göre oldukça yoğun bir biçimde bulundukları tespit edilmiştir. Diğer yandan 192 saatin sonunda kültürden alınan örnekte bakterilerin tamamen kokoid forma dönüştükleri ve ortamda spiral morfolojiye sahip bakterilerin bulunmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6 C ve D). Ayrıca kokoidlerin agregatlaşmaya meğilli olduğu ve kümeler halinde bulunduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 6 PBS ile 37°C'de 48 saat (A, B) ve 192 saat (C, D) inkübe edilmiş *H. pylori* kültürlerinin SEM görüntüleri

3. +4 °C'de İnoküle Edilen Kültürün Kokoid Oluşumuna Etkisi

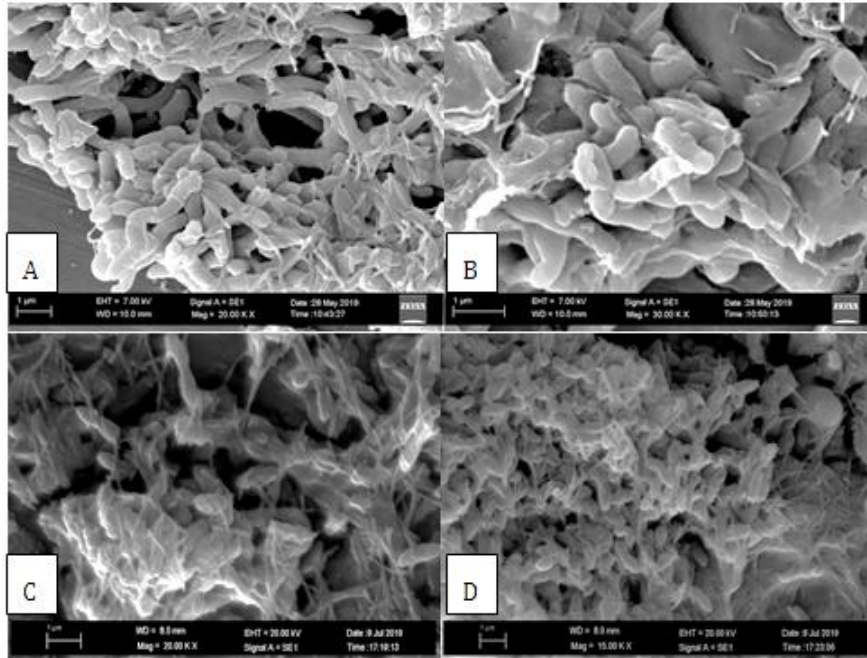
OD₆₀₀ 0,02'ye ulaşan kültür +4°C de inkübasyona devam ettirilmiş ve 48. ve 192.saatlerde alınan örnekler fikse edilmiş ve dehidre edilmiştir. Gride aktarılan örneklerin morfolojileri SEM cihazında 30.000X ve 50.000X büyötmelerde incelenmiştir. SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlara göre 48 saatlik inkübasyona sonrasında (Şekil 4.7 A ve B) ortamda çoğunlukla spiral kıvrımlı basiller olmak üzere az niktarda kokoidlere rastlanmıştır. Diğer yandan 192 saatlik inkübasyonun ardından ortamdaki bakterilerin çoğunlukla spiral formdan kokoid forma dönüştükleri gözlemlenmiştir. Bununla birlikte Şekil 4.7 C ve D'de gösterildiği gibi ortamda az sayıda da olsa spiral şekilli bakteriler bulunmaktadır.



Şekil 4. 7 +4 °C 'de inkübe edilmiş *H.pylori* kültürünün 48.saat (A, B) ve 192.saat (C, D) inkübasyona sonucunda alınan örneklerin SEM analizi görüntüleri

4. +22 °C'de İnoküle Edilen Kültür

OD₆₀₀ 0,02'ye ulaşan kültür +22 °C de inkübasyona devam ettirilmiş ve 48. ve 192.saatlerde alınan örnekler fikse edilmiş ve dehidre edilmiştir.

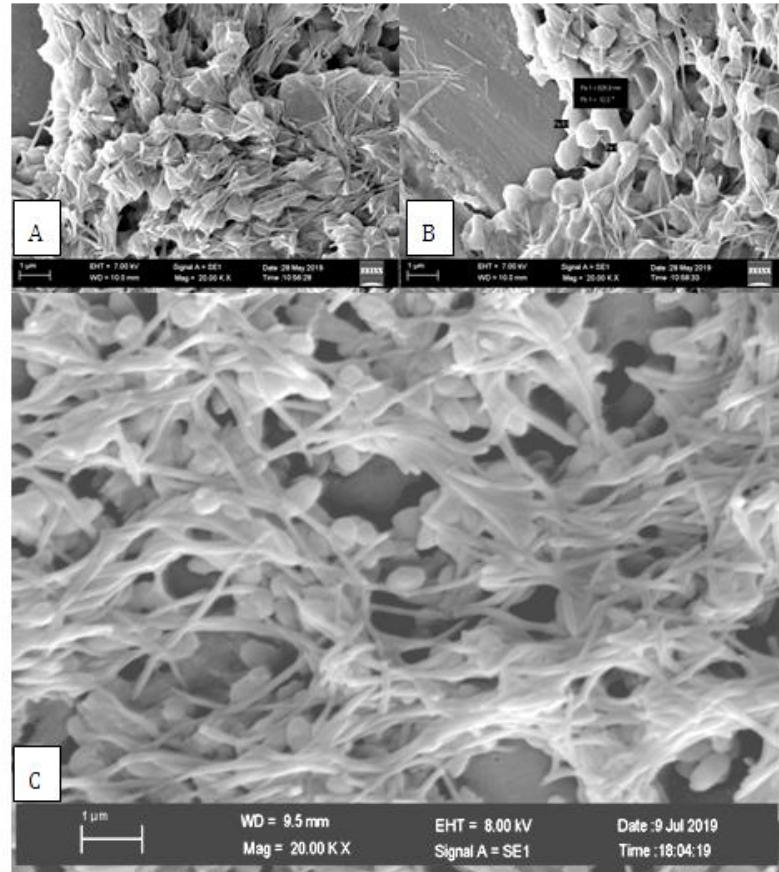


Şekil 4. 8 +22 °C'de inkübe edilmiş *H. pylori* kültürünün 48. Saat (A, B) ve 192. saat (C, D) inkübasyona sonundaki alınan örneklerin SEM analizi görüntüleri

H. pylori bakterilerinin morfolojik incelemeleri için SEM cihazı ile 20.000X ve 30.000X büyütmelerde görüntüler alınmıştır. Şekil 4.8 A ve B’de gösterildiği üzere 48 saatlik inkübasyonun ardından kültürden alınan görüntülerde kokoid şekile sahip herhangi bir bakteri varlığı tespit edilememiştir. Buna karşılık Şekil 4.8 C ve D’de 192 saatlik inkübasyonun ardında ortamda spiral ve kokoid bakterilerinin bir arada bulundukları gözlemlenmiştir.

5. Kanamisin İlave Edilen Kültürün Kokoid Oluşumuna Etkisi

OD₆₀₀ 0,02’ye ulaşan kültüre 100mg/L kanamisin eklenerek 37 °C de inkübasyona devam ettirilmiştir. Morfolojik analiz için inkübasyonun 48. ve 192.saatlerinde alınan örnekler fikse edilmiş ve dehidre edilmiştir. SEM cihazı analizi için gridlere aktarılan örnekler görüntülerin alınması için 20.000X ve 30.000X büyütmelerde incelenmiştir.



Şekil 4. 9 Kanamisin ile muamele edilmiş *H. pylori* kültürünün 48.saat (A, B) ve 192.saatlik (C) inkübasyon sonrası alınan örneklerin SEM analizi görüntüleri

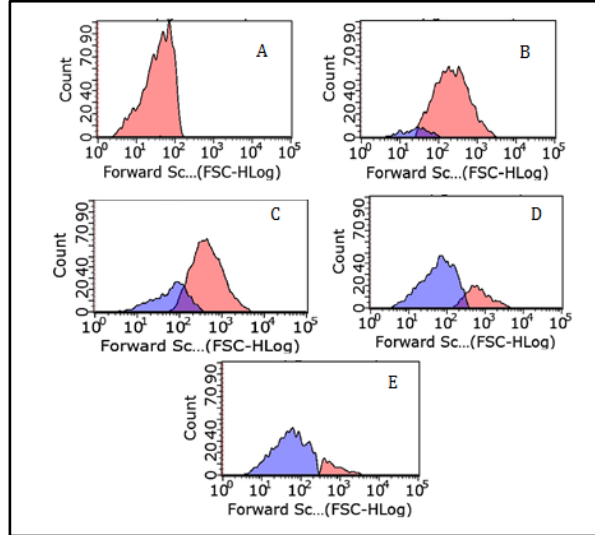
48 saatlik inkübasyona sonucu ortamda agregatlaşmış kokoid formlarına ve az miktarda spiral bakterilere rastlanmıştır (Şekil 4.9 A ve B). Kokoidlerin ortalama 0,82µm boyutlarında olduğu belirlenmiştir. 192 saatlik inkübasyona sonucunda ise ortamdaki bakterilerin tamamının kokoid forma dönüştüğü tespit edilmiştir. Ortamda herhangi bir spiral forma sahip bakteriye rastlanmamıştır (Şekil 4.9 C).

4.1.4 Flow Sitometre Analiz Sonuçları

Farklı ortam koşullarına maruz bırakılan *H. pylori* bakterilerinin morfolojik dönüşümleri aynı zamanda Flow-sitometrik analiz yapılarakta incelenmiştir. Bunun için 24 saatte bir alınan örnekler Flow-sitometre cihazında herhangi bir marker kullanılmadan boyutlarındaki değişimlere bağlı olarak spiral ve kokoid şeklinde değerlendirilmiştir. Aşağıda 5 farklı ortam koşullarında inkübe edilen bakteriler için 192.saat kadar elde edilen Flow-sitometrik analiz sonuçları sunulmuştur.

1. Uzun Süreli Kültür

Şekil 4.10'da uzun süreli kültüre bırakılan bakterilerin kültüründen 24 saatlik aralıklarla alınan örneklerde spiral ve kokoid dönüşmüş bakterilerin miktarlarındaki değişim incelenmiştir.



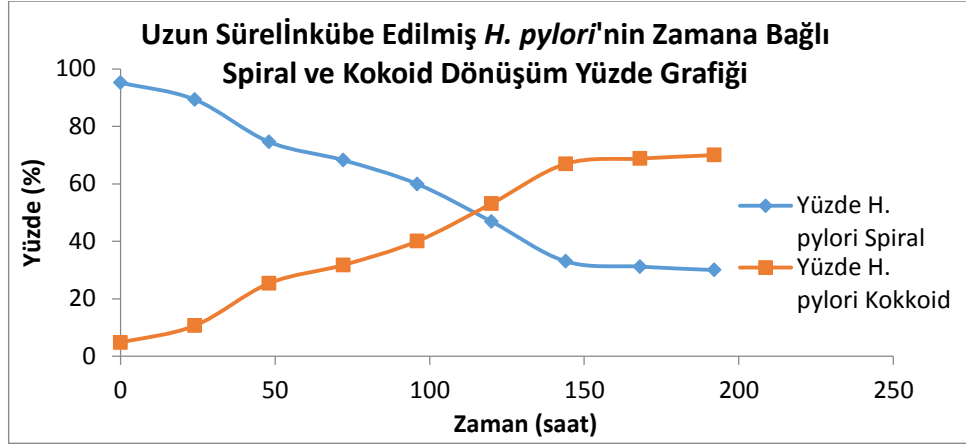
Şekil 4. 10 Herhangi bir strese maruz bırakılmamış *H. pylori* kültürünün 24 saatte bir yapılan Flow-sitometrik analiz sonuçları 0.an (A), 48.saat(B), 96.saat(C), 144.saat(D) ve 192.saat (E) pembe:spiral bakterileri, mor:kokoid bakterileri göstermektedir

Buna göre 24 saatlik inkübasyonun sonunda ortamda bulunan bakterilerin çoğunlukla spiral morfolojiye sahip oldukları gösterilmiştir. Buna karşılık inkübasyona süresi arttıkça ortamdaki bakterilerin spiral formdan kokoid forma dönüşmeye başladıkları da tespit edilmiştir. 192 saatlik inkübasyonun sonunda ortamdaki spiral bakterilerin sayısının giderek azaldığı ve kokoid formdaki bakterilerin ortama hakim oldukları tespit edilmiştir.

Tablo 4. 1 Herhangi bir strese maruz bırakılmamış *H. pylori* kültürünün Flow-sitometrik analizi sayısal sonuçları

Zaman(saat)	% Spiral	% Kokoid
0	99,32	0,68
24	89,35	10,65
48	74,64	25,36
72	68,26	31,74
96	59,94	40,06
120	46,88	53,12
144	33,03	66,97
168	10,66	68,81
192	29,99	70,01

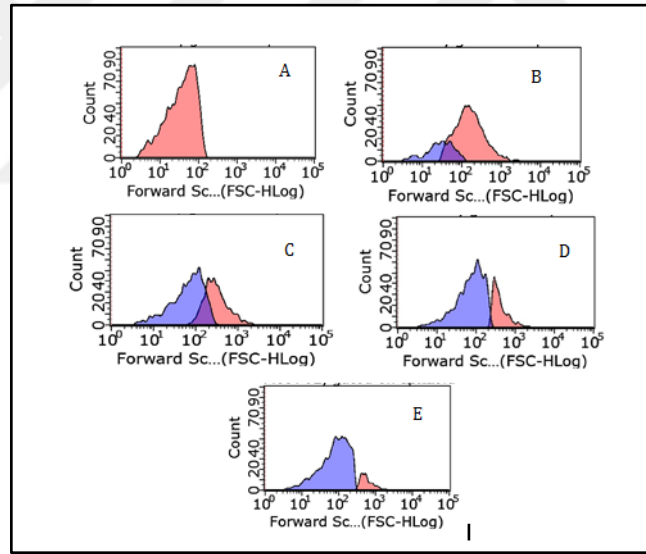
Tablo 4.1’de ise Flow-sitometre cihazından alınan sonuçlar sayısal veriler şeklinde sunulmuştur. Buna göre 24 saatlik inkübasyonun ardından ortamdaki spiral morfolojiye sahip bakterilerin yüzdesi %89 iken bu oran 192 saatlik inkübasyonun ardından %30'lara kadar düşmüştür. Tablo dikkatle incelendiğinde inkübasyona süresindeki artış ile bakterilerin morfolojik dönüşümleri arasında doğru orantı olduğu görülmektedir. Şekil 4.11’de de zamanla ortamdaki bakterilerin spiral formdan kokoid forma dönüştüğü gözlemlenmektedir. Yaklaşık inkübasyonun 120.saatinin ardından kokoid formun spiral forma kıyasla ortama hakim olmaya başladığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.11 Zamana bağlı *H. pylori* spiral ve kokoid dönüşüm yüzde grafiği

2. +4 °C'de İnkübe Edilmiş Kültür

Şekil 4.12'de +4 °C'de inkübasyona devam ettirilen bakterilerin kültüründen 24 saatlik aralıklarla alınan örneklerde spiral ve kokoide dönüşmüş bakterilerin miktarlarındaki değişime ait Flow-sitometrik analiz sonuçları gösterilmektedir.



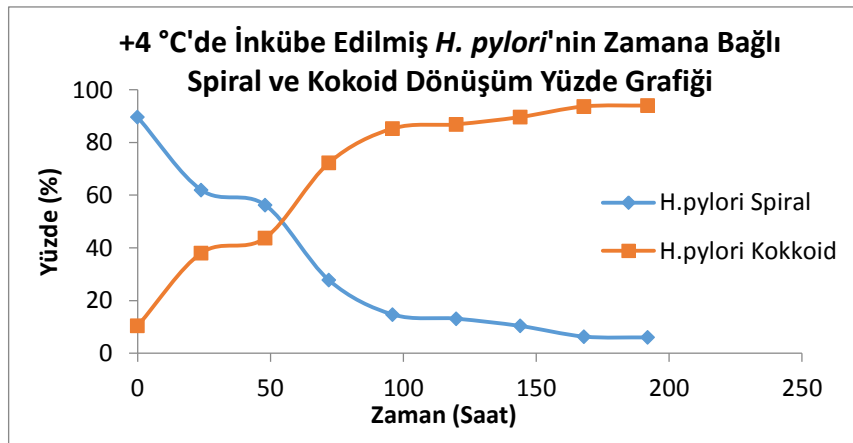
Şekil 4.12 +4 °C'de inkübe edilmiş *H. pylori* kültürünün Flow-sitometrik analiz sonuçları 0.an (A), 48.saat(B), 96.saat(C), 144.saat(D) ve 192.saat (E) pembe:spiral bakterileri, mor:kokoid bakterileri göstermektedir

Buna göre 24 saatlik inkübasyonun ardından bakterilerin çoğunlukla spiral morfolojide oldukları gözlenirken ilerleyen inkübasyona sürelerinde morfolojilerinin kokoide dönüştükleri tayin edilmiştir.

Tablo 4. 2 +4°C'de inkübe edilmiş *H. pylori* kültürünün Flow-sitometrik analizinin sayısal sonuçları

Zaman(saat)	% Spiral	% Kokoid
0	89,6	10,4
24	61,95	38,05
48	56,25	43,75
72	27,74	72,26
96	14,72	85,28
120	13,12	86,88
144	10,36	89,64
168	6,34	93,66
192	5,92	94,08

Flow-sitometrik analiz sonuçları sayısal olarak yorumlandığında (Tablo 4.2) ise 24 saatlik inkübasyonun ardından ortamdaki bakterilerin %62'sinin spiral morfolojiye sahip olduğu görülürken bu oranın 192 saatlik inkübasyonunun ardından %6'ya kadar düştüğü tespit edilmiştir.

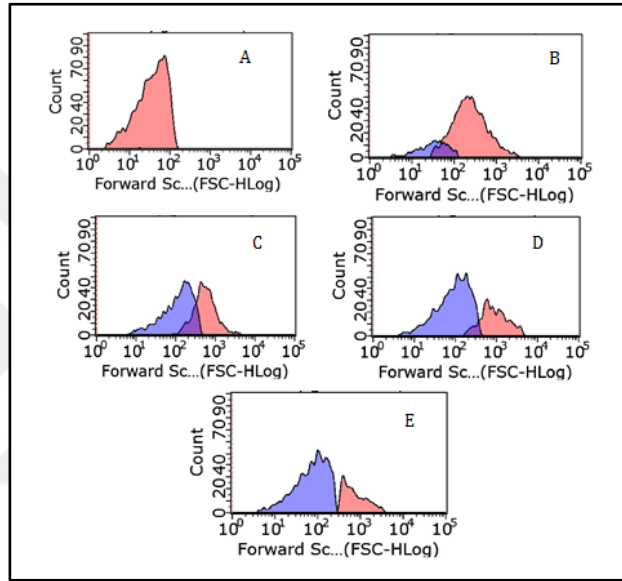


Şekil 4. 13 +4°C'de inkübe edilmiş *H. pylori* bakterilerinin zamana bağlı spiral ve kokoid dönüşüm grafiği

Şekil 4.13’de ise inkübasyona süresine bağlı olarak ortamdaki spiral ve kokoid morfolojili bakterilerin sayısındaki değişim gösterilmiştir. Şekilden de görüleceği üzere inkübasyonun 50.saatinden itibaren kokoid morfolojiye sahip bakterilerin kültür ortamına hakim olmaya başladıkları gözlemlenmiştir.

3. +22 °C’de İnkübe Edilmiş Kültür

Şekil 4.14’de +22°C’de inkübasyona devam ettirilen bakterilerin kültüründen 24 saatlik aralıklarla alınan örneklerde spiral ve kokoide dönüşmüş bakterilerin miktarlarındaki değişime ait Flow-sitometrik analiz sonuçları gösterilmektedir.



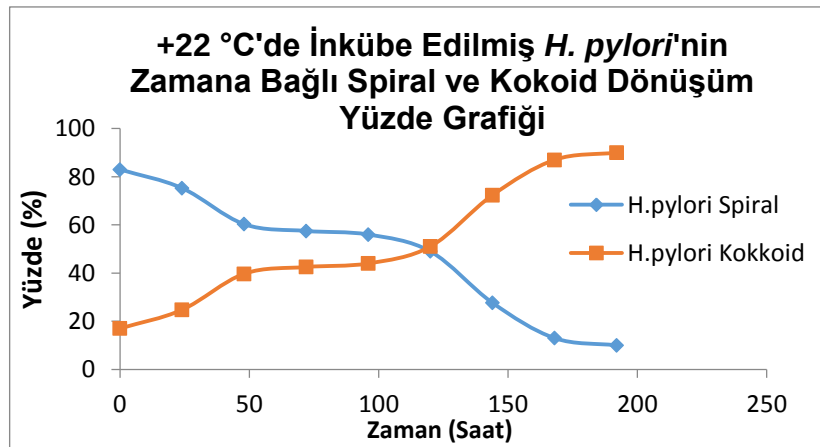
Şekil 4. 14 +22 °C’de inkübe edilmiş *H. pylori* bakterilerinin spiral ve kokoid formlarının zamana bağlı Flow-sitometre analizleri, 0.an (A), 48.saat(B), 96.saat(C), 144.saat(D) ve 192.saat (E) pembe:spiral bakterileri, mor:kokoid bakterileri göstermektedir

Buna göre bakterilerin zamanla spiral formdan kokoid forma dönüşümleri gözlemlenmektedir. Buna karşılık zamana bağlı olarak *H. pylori* bakterilerinin spiral formdan kokoid forma dönüşme hızının +4°C’de inkübe edilen bakterilere kıyasla daha yavaş olduğu görülmüştür (Şekil 4.15).

Tablo 4. 3 +22°C'de inkübe edilmiş *H. pylori* kültürünün Flow-sitometrik analizi sayısal sonuçları.

Zaman(saat)	% Spiral	% Kokoid
0	83,01	16,99
24	75,26	24,74
48	60,3	39,7
72	57,48	42,52
96	56	44
120	49,05	50,95
144	27,68	72,32
168	13,02	86,98
192	10,09	89,91

24 saatlik inkübasyonun ardından %75 olan spiral *H. pylori* bakterilerin sayısı 192 saat inkübasyona sonunda kültür ortamında %10'a düştüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca 192.saatin sonunda %89 oranında kokoid morfolojili bakterilerin varlığı saptanmıştır.

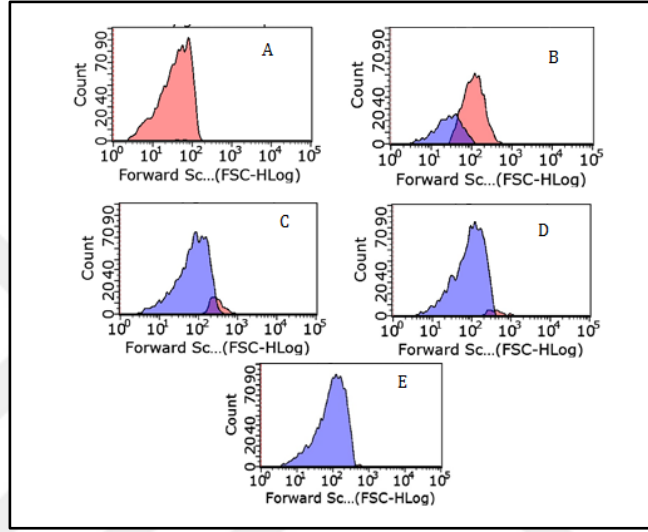


Şekil 4. 15 +22°C'de inkübe edilmiş *H. pylori* bakterilerinin spiral ve kokoid formlarının zamana bağlı yüzde dönüşümleri

Şekil 4.15'e göre sayısal veriler incelendiğinde 120.saatin sonrasında kokoid morfolojiye sahip bakterilerin kültür ortamına hakim olmaya başladıkları görülmüştür.

4. PBS (Açlık) ile İnkübe Edilmiş Kültür

Şekil 4.16'da PBS'de inkübasyona devam ettirilen bakterilerin kültüründen 24 saatlik aralıklarla alınan örneklerde spiral ve kokoide dönüşmüş bakterilerin miktarlarındaki değişime ait Flow-sitometrik analiz sonuçları gösterilmektedir.



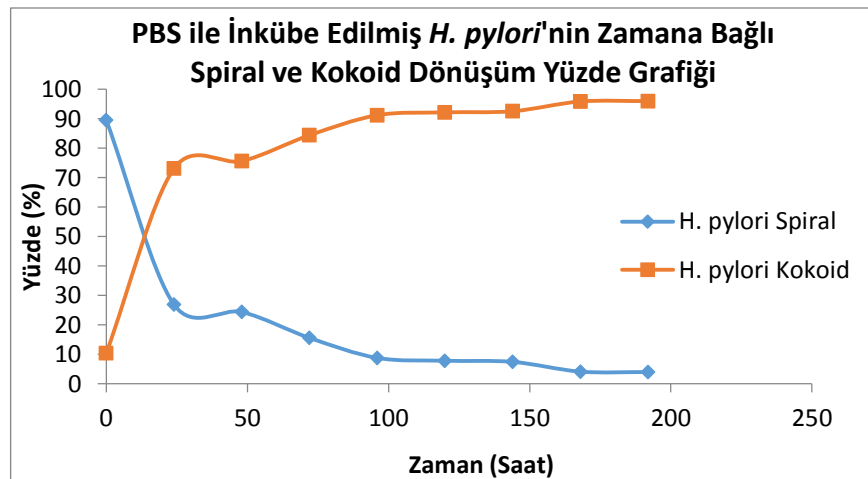
Şekil 4. 16 PBS ile inkübe edilmiş *H. pylori* bakterilerinin Flow-sitometre analiz sonuçları, 0.an (A), 48.saate(B), 96.saate(C), 144.saate(D) ve 192.saate (E) pembe:spiral bakterileri, mor:kokoid bakterileri göstermektedir

Buna göre bakterilerin diğer ortamlara göre (uzun süreli kültür, +4 ve +22 C) çok daha hızlı bir şekilde kokoid forma dönüştükleri tespit edilmiştir. 24 inkübasyon süresinin ardından kokoidlerin kültür ortamına hakim olmaya başladıkları gözlemlenmiştir. 72.saatlik inkübasyonun ardından spiral formdaki bakterilerin oranı %15'e kadar düştüğü görülmüştür (Tablo 4.4). 192.saat sonunda spiral bakterilerin oranı %4'e kadar düştüğü tespit edilmiştir. Şekil 4.17'de elde edilen verilerin grafiksel hali gösterilmiştir.

Tablo 4. 4 PBS ile inkübe edilen *H. pylori* kültürünün Flow-sitometrik analizi sayısal verileri

Zaman(saat)	% Spiral	% Kokoid
0	89,6	10,4
24	26,9	73,1
48	24,4	75,6
72	15,6	84,4
96	8,8	91,2
120	7,83	92,17
144	7,44	92,56
168	4,14	95,86
192	4	96

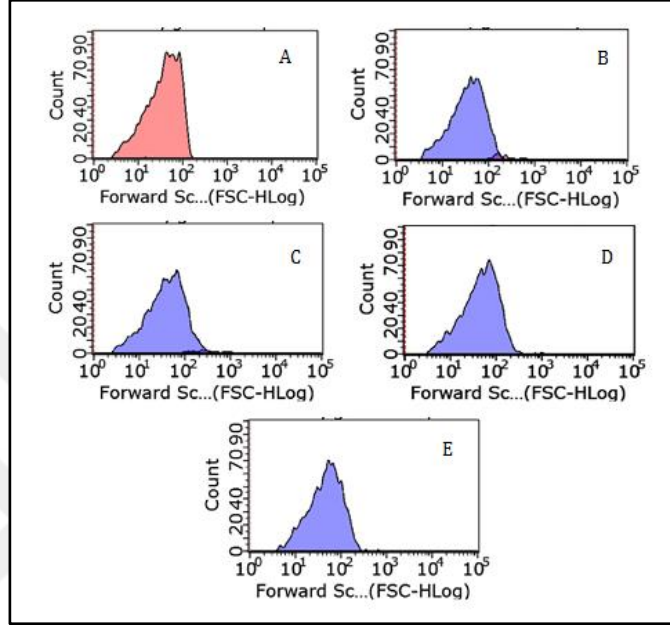
Bu sonuç PBS ile inkübasyonun *H. pylori* bakterilerinin kokoid forma dönüşmesinde oldukça etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir. Sayısal veriler incelendiğinde 192 saatlik inkübasyonun ardından ortamdaki kokoid oranının %96'ya ulaştığı belirlenmiştir.



Şekil 4. 17 PBS ile inkübe edilen *H. pylori*'nin zamana bağlı spiral ve kokoid dönüşüm yüzde grafiği

5. Kanamisin Eklenmiş Kültür

Şekil 4.18’de kanamisin ile inkübasyona devam ettirilen bakterilerin kültüründen 24 saatlik aralıklarla alınan örneklerde spiral ve kokoid dönüşmüş bakterilerin miktarlarındaki değişime ait Flow-sitometrik analiz sonuçları gösterilmektedir.



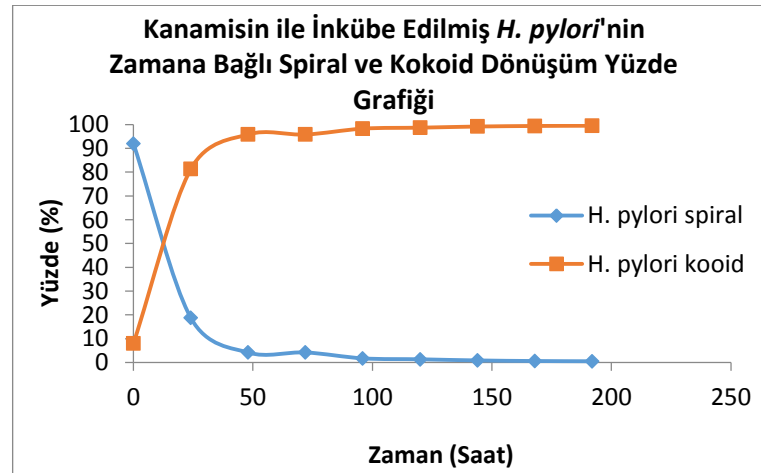
Şekil 4. 18 Kanamisin ile inkübe edilmiş *H. pylori* bakterilerinin zamana bağlı Flow-sitometre sonuçları, 0.an (A), 48.saat(B), 96.saat(C), 144.saat(D) ve 192.saat (E) pembe:spiral bakterileri, mor:kokoid bakterileri göstermektedir

Bu sonuçlara göre 24 saatlik inkübasyonun ardından ortamdaki *H. pylori* bakterilerinin tamamına yakınının kokoid formuna dönüştüğü gözlemlenmiştir. İncelenen tüm ortam koşulları kıyaslandığında kokoid morfolojisine değişimi en hızlı indükleyen ortamın kanamisin içeren besiyeri ortamı olduğu tespit edilmiştir. Sayısal veriler incelendiğinde (Tablo 4.5) 192 saatlik inkübasyonun ardından tüm *H. pylori* spiral bakterilerinin %99 oranında kokoid forma dönüştüğü Flow-sitometrik analiz ile kanıtlanmıştır. 192 saatlik inkübasyonun ardından spiral bakteri oranı %1’in altına düşmüştür.

Tablo 4. 5 Kanamisin ile kültüre edilen *H. pylori*'nin Flow-sitometrik analizi sayısal verileri

Zaman(saat)	% Spiral	% Kokoid
0	92	8
24	18,74	81,26
48	4,16	95,84
72	4,2	95,8
96	1,72	98,28
120	1,32	98,68
144	0,84	99,16
168	0,6	99,4
192	0,5	99,5

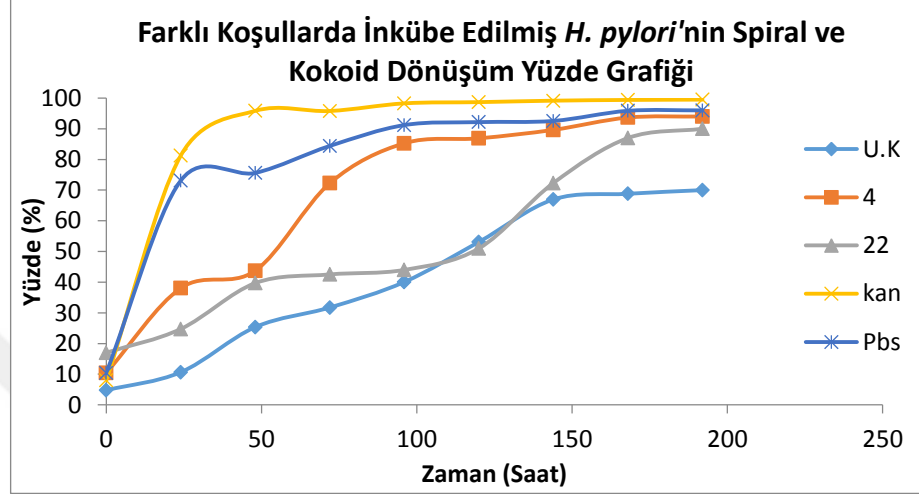
Flow-sitometre sonuçlarından elde edilen veriler grafik haline getirilmiştir. Şekil 4.19'daki grafiğe göre kanamisin içeren ortamda 24 saatlik inkübasyona ardından *H. pylori* kokoid formlarının oranı %80'in üzerine çıkarak kültür ortamına hakim olduğu belirlenmiştir. 192.saat sonunda ise bakterilerin tamamına yakını kokoid formuna dönüşmüştür.



Şekil 4. 19 Kanamisin ile inkübe edilmiş *H. pylori*'nin zamana bağlı spiral ve kokoid dönüşüm yüzde grafiği

Farklı Ortamlarda İnkübe Edilen *H. pylori* Bakterilerinin Zamana Bağlı Yüzde Kokoid Dönüşümleri

Beş farklı ortam koşullarında inkübe edilen *H. pylori* bakterilerinin spiral formdan kokoid forma dönüşümünün zamana bağlı karşılaştırılması olarak Şekil 4.20’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 20 Farklı koşullarda inkübe edilmiş *H. pylori*'nin spiral ve kokoid dönüşüm yüzde grafiği

Şekil 4.20’de farklı ortam koşullarında 192 saatlik inkübasyonun ardından *H. pylori*'nin spiral formdan kokoid forma dönüşüm yüzdeleri gösterilmiştir. Buna göre en yüksek düzeyde morfolojik değişimin gerçekleştiği koşullar kanamisin ve PBS (açlık) ile inkübasyona sonucu olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle tez çalışmasının ileri aşamalarında RPF içeren metabolitlerin kokoidler üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla bu iki ortam koşullarında inkübe edilen bakterilerin kokoid formları kullanılmıştır.

4.2 *Micrococcus luteus* ile Gerçekleştirilen Deneysel Çalışma Sonuçları

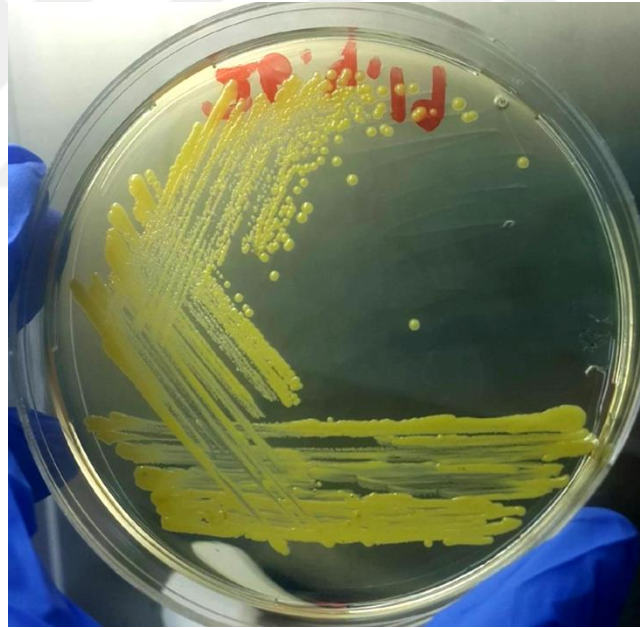
4.2.1 *Micrococcus luteus* Bakterilerinin Kültürü ve Kriyoprezervasyonu

Ticari olarak temin edilen ATCC 4698 kodlu ve liyofilize halde bulunan *M. luteus* suşu yine ticari olarak temin edilen süspansiyon sıvısı içerisinde çözülmüştür. Daha sonra TSA katı besiyeri içeren beş petriye ekimi gerçekleştirilen bakteriler 30°C oksijenli ortamda inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından *M.*

luteus'a özgü sarı, parlak, pürüzsüz kolonilerin gelişimi gerçekleşmiştir. Bunu takiben daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere *M. luteus* bakterisinin kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için her bir petride oluşan koloniler öze ile toplanarak 1ml %30 gliserol içeren BHI besiyerine aktarıldı. 1 saat -40°C'de tutulan kriyotüpler daha sonra laboratuvarımızda bulunan -196°C'de ki sıvı azot içeren tanka transfer edildi. Böylece laboratuvarımızda yaklaşık 25 kriyotüp *M. luteus* bakterisinin kriyobankı oluşturuldu. Deneysel çalışmalar sırasında kriyobanktan çıkarılan bakteriler yeniden TSA agara ekimi gerçekleştirildi.

4.2.2 *Micrococcus luteus* Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi

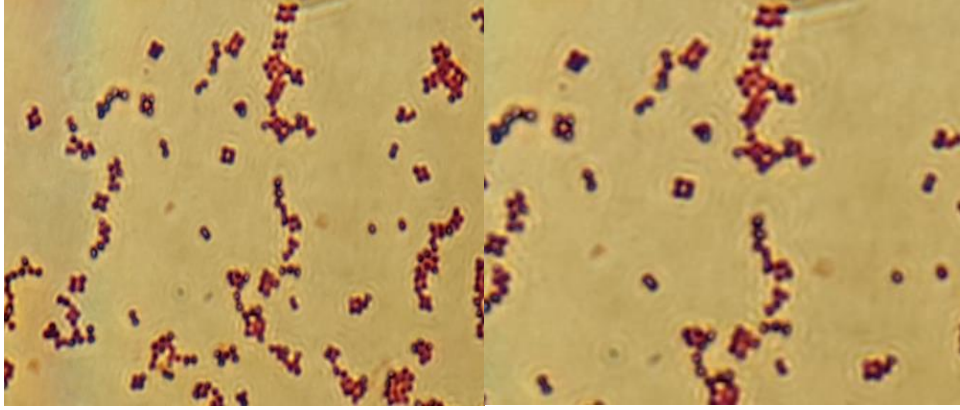
TSA besiyerinde 30°C'de, aerofilik ortamda inoküle edilen *M. luteus* bakteri kolonileri 24 saatte oluşmaya başlamış ve Şekil 4.21'de ki gibi 48.saatte belirgin sarı pigmentli, pürüzsüz koloniler oluşturduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4. 21 *M. lutues* bakterisinin TSA besiyerinde oluşturduğu kolonilerin görüntüsü

Oluşan kolonilerden alınan örneklerle gram boyama yapılmıştır. Işık mikroskobu ile 100x büyütmede görüntüler alınmıştır. Şekil 4.22'de gösterilen gram boyama sonucuna göre mor boyanmış ve düzeniz tetratlar halinde bulunan koklar tespit edilmiştir. Gram pozitif olduğu ve tetrat morfolojisine sahip olduğu bilinen *M.*

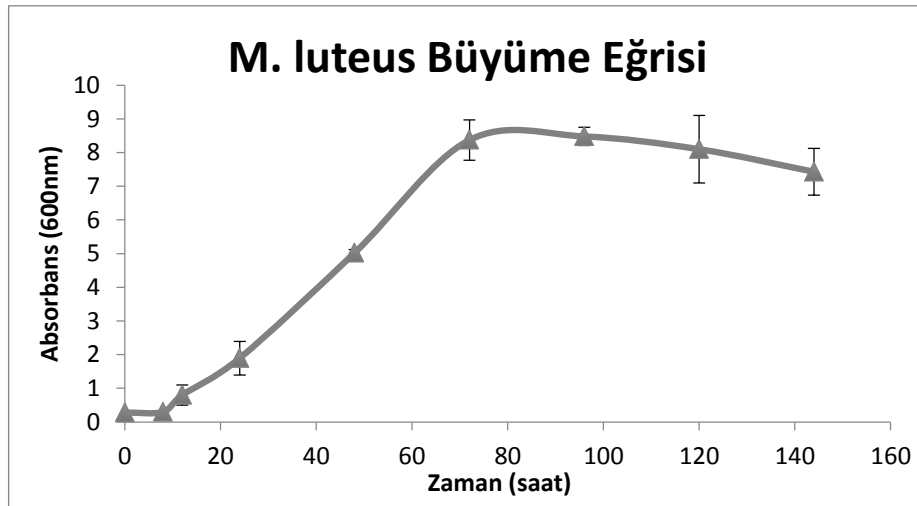
luteus bakterilerinin varlığı bu şekilde kanıtlanmıştır. RPF içeren metabolitlerin üretimi için bu bakteriler kullanılmıştır.



Şekil 4. 22 *M. luteus* bakterisinin TSA besiyerinde oluşturduğu kolonilerden elde edilen gram boyamaların ışık mikroskobu altında 100x büyütmedeki görüntüleri

4.2.3 *Micrococcus luteus* Büyüme Eğrisi

Literatür verilerine göre RPF enzimini içeren metabolitlerin *M. luteus*'un geç logaritmik faz ve stasyoner fazında üretildiği bilinmektedir. Geç logaritmik faz ve stasyoner fazların belirlenmesi amacıyla bakterinin büyüme eğrisi UV-spektrofotometrede 600 nm'de ölçüm yapılarak tespit edildi. Elde edilen eğriye göre Şekil 4.23'de geç logaritmik faz 60 ile 75. saatler arasında belirlenirken, stasyoner fazın ise 80-85.saatler arasında olduğu belirlenmiştir.



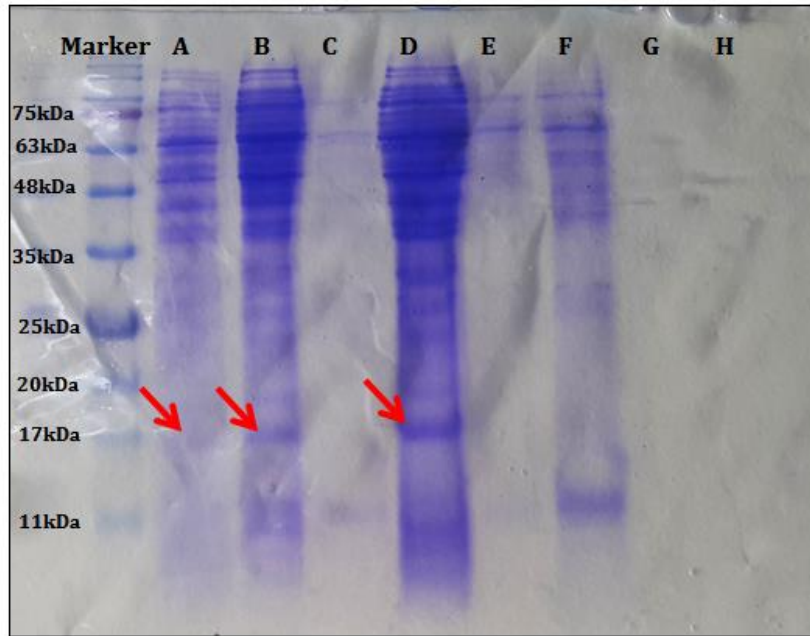
Şekil 4. 23 *M. luteus* bakterisinin 30°C', 160rpm'daki büyüme eğrisi grafiği

4.2.4 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimini İçeren Metabolitlerin Üretimi

Büyüme eğrisi belirlenen *M. luteus* bakterilerinden inkübasyonun 44, 48, 60, 65, 75 ve 96. saatlerinde alınan süpernetantlardaki RPF enzimi varlığı SDS-PAGE analizi ile enzimin konsantrasyonu ise Bradford Ptotein Tayin yöntemi ile belirlenmiştir.

4.2.5 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimini İçeren Metabolitlerin SDS-PAGE ile Protein Boyutlarının Tayini

Jel görüntüsünden elde edilen verilere göre 60. 65. ve 75. saatlerde alınan metabolitlerde 17kDa'luk bantlara rastlanırken 44. 48. ve 96. saatte bu bantlara rastlanmamış yada aktif olarak bir bant gözlemlenmemiştir.

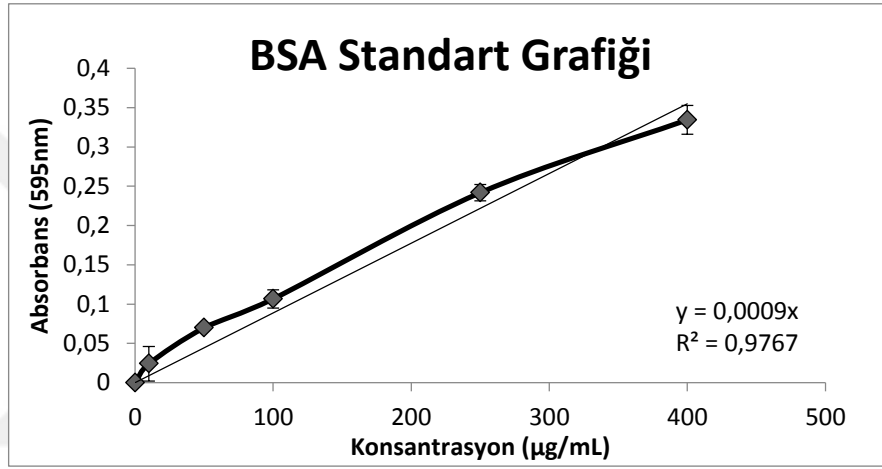


Şekil 4. 24 SDS-PAGE jel görüntüsü., *M. luteus*'dan elde edilen metabolitler A: 72.saat, B: 65.saat, C: 44.saat, D: 60.saat, E: 48.saat, F: 96.saat, G: 10K Ultra santrifüj tüpünde altta kalan kısım, H: Kontrol (su)

Şekil 4.24'deki jel görüntüsünde, *M. luteus* metabolitlerini konsantre etmek amacıyla kullanılan Amicon-15 Ultra 15K santrifüj tüpünün santrifüj sonrasında altta kalan filtrelenmiş sıvının protein içeriğinde kontrol edilmiştir (Şekil 4.24 G). Bu sıvıda herhangi bir protein varlığına rastlanmamıştır.

4.2.1 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimini İçeren Metabolitlerin Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

SDS-PAGE analizi sonrası 17kDa bandını içeren örneklerdeki protein konsantrasyonu Bradford Protein Tayin yöntemi ile tayin edilmiştir. Öncelikle protein konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla BSA ile standart grafiği oluşturulmuştur. Konsantrasyonu bilinmeyen örnekler bu standart grafiğe göre hesaplanarak konsantrasyon belirlenmiştir. Şekil 4.25'deki standart grafiği R^2 değeri %97,19 olarak belirlenerek grafiğin denklemi $y=0,0009x$ olarak saptanmıştır.

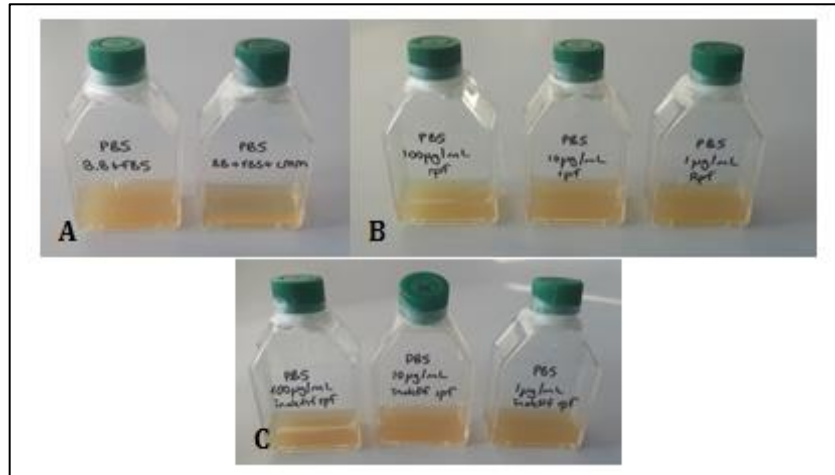


Şekil 4. 25 Bradford Protein Tayini için yapılan BSA standart grafiği

Grafik denklemine göre 60. saatte elde edilen total protein konsantrasyonu $392.5 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$, 65. saatte elde edilen total protein konsantrasyonu $379.5 \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$ ve 72.saatte elde edilen total protein konsantrasyonu $300.88 \pm 2,1 \mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır. SDS-PAGE analizi sonrası 17kDa boyutunda bant içeren tüm örnekler birleştirildikten sonra örneğin son konsantrasyon $300 \pm 1,75 \mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiş ve deneysel çalışmalarda *H. pylori* kokoid formları üzerinde etkisi incelenmek üzere bu örnek kullanılmıştır. Süpernetantları konsantre etmek amacı ile kullanılan Amicon ultra 10K santrifüj tüplerinde altta toplanan örneklerle de SDS-PAGE analizi yapılmış ve bu örneklerde herhangi bir protein varlığı yada 17 kDa bantı saptanmamıştır. Bu örneklerde yapılan Bradford proteyin tayininde de protein konsantrasyonları 0 çıkmıştır.

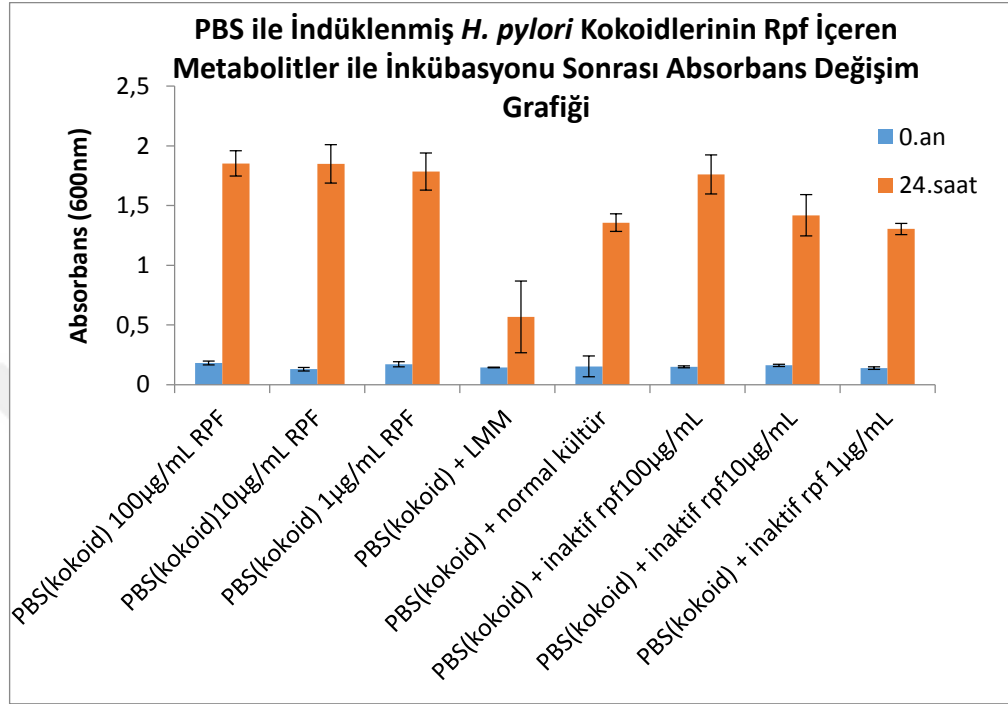
4.3 Resusitasyon Promatör Faktör Enzimini İçeren *Micrococcus luteus* Metabolitlerinin *Helicobacter pylori* Kokoid Formları Üzerindeki Resusitasyonuna Etkisi

Kanamisin ile muamele edilen ve PBS ortamında kültürü gerçekleştirilen aynı zamanda yüksek derecede kokoid morfolojisine dönüştüğü saptanan bakteriler üzerinde *M. luteus* RPF içeren metabolitlerinin 1, 10 ve 100 µg/mL'lik konsantrasyonlarının resusitasyon etkinliği incelenmiştir. PBS ortamında kokoidlere indüksiyonu gerçekleştirilen bakterilerin belirtilen konsantrasyonlara maruz bırakıldıktan sonra kültür ortamındaki görüntüsü Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Kontrollerde dahil olmak üzere RPF enziminin aktif ve inaktif formlarına maruz bırakılan bakterilerin Brucella Broth besiyerinde üremelerini gerçekleştirdikleri gözlemlenmiştir. Deney öncesi beklentimiz RPF enzimini içeren metabolitler ile muamele edilmeyen veya inaktif RPF enzimini içeren metabolitlerle muamele edilen kontrol gruplarında herhangi bir üreme olmazken yalnız aktif RPF enzimini içeren metabolitler ile muamele edilen grupta üremenin olması idi. Deney sonuçlarına göre her ne kadar aktif RPF ile muamele edilen grupta üreme olmuş olsada kontrol gruplarında da üremenin gözlemlenmesi RPF enziminin resusitasyon konusundaki etkinliği üzerine sağlıklı bir yorum yapmamızı engellemiştir.



Şekil 4. 26 PBS ile inkübe edilmiş kokoidlerin RPF içermeyen (A), RPF içeren (B) ve inaktif RPF içeren metabolitler(C) ile inkübasyon sonrası 24. saatteki flask görüntüleri

Şekil 4.27’de ise PBS içeren ortamda kokoide dönüştürülen bakterilerin aktif ve inaktif formdaki RPF enziminin farklı konsantrasyonlarına maruz kaldıktan 24 saat sonra flasklardaki bakteri yoğunluğunun UV-spektrofotometre kullanılarak belirlenmesine ait bir grafik sunulmuştur.



Şekil 4. 27 PBS ile indükleniş *H. pylori* kokoid formlarının RPF içeren metabolitlerle inkübasyona öncesi ve sonrası absorbansa bağlı değişim grafiği

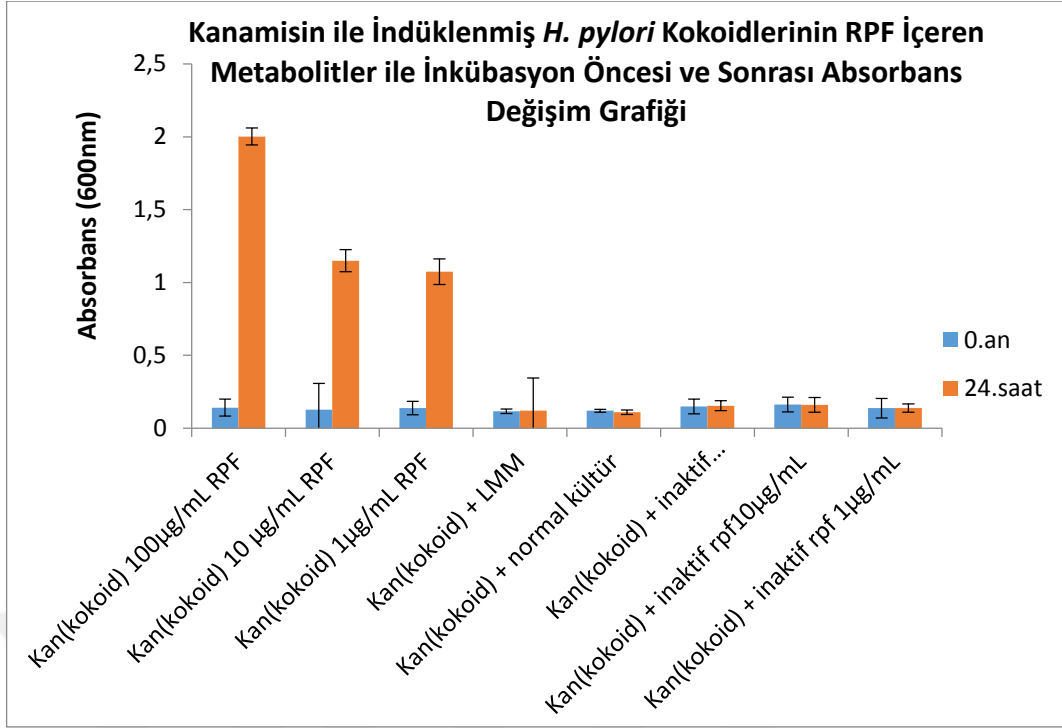
Şekil 4.27’den de görüleceği üzere RPF enziminin hem aktif hemde inaktif formlarına maruz kalan bakterilerin yüksek düzeyde üreme gösterdikleri ortaya çıkarılmıştır. Bu sonuçlar RPF enziminin resusitasyondaki etkinliğini belirlememizde yeterli veriyi sunmamaktadır.



Şekil 4. 28 Kontroller (A ve B), RPF enzimi içeren metabolitlerle inkübe edilmiş kokkoidler (C)

Diğer yandan kanamisin ile indüklenen ve ardından aktif ve inaktif RPF enzimini içeren metabolitlerin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan *H. pylori* bakterilerinin Brucella Broth besiyerindeki üremelerine ait flask görüntüleri Şekil 4.28'de gösterilmektedir. PBS ile muamele edilen gruptaki bakterilerden farklı olarak kanamisin ile indüklenen ancak RPF enzimini içeren metabolitlere maruz bırakılmayan *H. pylori* kokoidlerinin herhangi bir üreme göstermedikleri gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar inaktif RPF enzimi içeren metabolitler ile muamele edilen bakteriler içinde geçerli olduğu görülmüştür. Buna karşılık aktif formdaki RPF enzimini içeren metabolitler ile muamele edilen *H. pylori* bakterilerinin Brucella Broth besiyerinde üredikleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlar RPF ile indüklenen *H. pylori* kokoidlerinin spiral forma dönüştüklerini yani resusitasyona uğradıklarını göstermektedir.

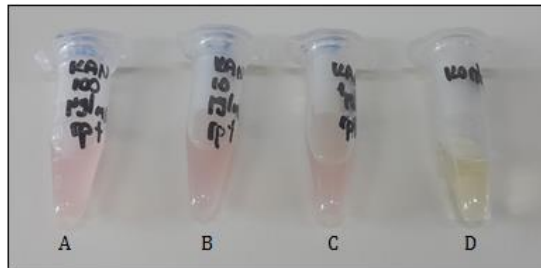
Aynı zamanda Şekil 4.29'da ise 24 saatlik inkübasyona sonrası 1, 10, ve 100µg/mL RPF enzimini içeren metabolitler ile muamele edilen bakterilerin 600nm'deki UV-spektrofotometrik analiz sonuçları sunulmuştur.



Şekil 4. 29 Kanamisin ile indüklenmiş kokoid formlarının RPF içeren metabolitlerle inkübasyon öncesi ve sonrası absorbansa bağlı değişim grafiği

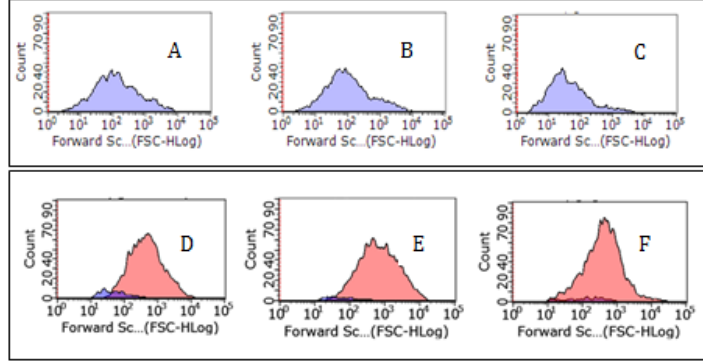
Grafikten görüleceği üzere en yüksek düzeyde bakteri üremesi 100µg/mL RPF enzimi içeren metabolitler ile inkübe edilen kültür ortamında görülmüştür. Diğer yandan inaktif formdaki RPF enzimini içeren metabolitler ile muamele edilen kültür ortamında ise herhangi bir üreme görülmemiştir. Bu sonuçlar RPF enziiminin *H. pylori* bakterilerindeki resusitasyonu indüklediğini kanıtlamaktadır.

Elde edilen bu sonuçların ardından üreme tespit edilen kültür ortamlarından alınan örneklerdeki üreaz enzim varlığı oksidaz ve katalaz testleride yapılmıştır.



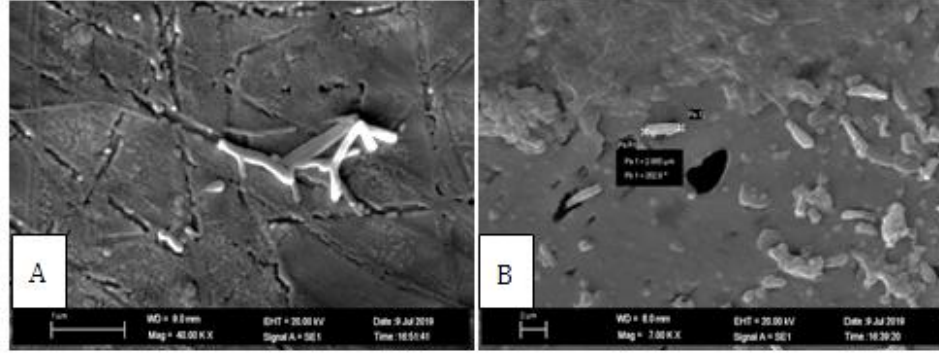
Şekil 4. 30 Kanamisine maruz bırakılan *H. pylori* kokkoidlerin RPF enzimi içeren metabolitlerle inkübasyonu sonrası kültürlerden alınan örneklerin üreaz test sonuçları

Şekil 4.30'da görüldüğü üzere 1, 10 ve 100 µg/mL RPF enzimini içeren metabolitlerle muamele edilen kültür ortamlarındaki bakterilerin üreaz pozitif oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca bu örneklerin katalaz ve oksidaz pozitif olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar *H. pylori* kokoidlerinin spiral forma dönüştüklerini bir kez daha ortaya koymuştur.



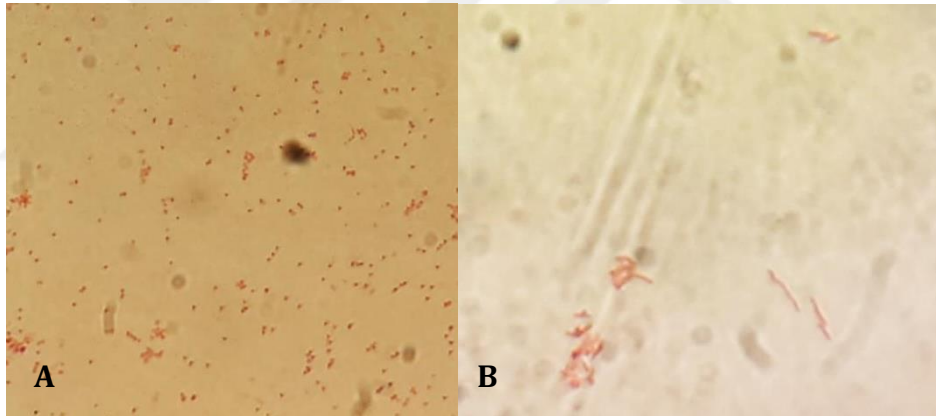
Şekil 4. 31 Kanamisin ile indüklenmiş *H. pylori* bakterisinin RPF içeren metabolitlerle inkübasyonu öncesi (A: 1 µg/mL, B:10 µg/mL, C:100 µg/mL) ve 24 saat sonraki (D: 1 µg/mL, E:10 µg/mL, E:100 µg/mL) flow-sitometre grafikleri

Şekil 4.31'de 1, 10 ve 100 µg/mL RPF içeren metabolit ile inkübe edilmiş kültürün 0.an ve 24.saatlerde alınmış örneklerin Flow-sitometre grafikleri verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere 0.anda ortamda kokoidler hakimken 24 sonra her üç kültür ortamında az miktarlarda kokoidlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Flow-sitometreden elde edilen sayısal veriler 1 µg/mL RPF içeren metabolit eklenmiş kültür ortamında % 8,12 kokoidlerin, %91,88 spiral bakterilerinin bulunduğu, 10 µg/mL RPF içeren metabolit eklenmiş kültür ortamında % 6,68 kokoidlerin, %93,32 oranında ise spiral bakterilerin bulunduğu tespit edilmiştir. 100 µg/mL RPF içeren metabolit eklenmiş kültür ortamında bu oranlar kokoid için % 4.14, spiral bakteriler için % 95,86 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 32 100µg/mL RPF içeren metabolit ile muamele edilen (A) ve (B) *H. pylori* kültürünün 24 saatlik inkübasyona sonrası SEM analizi görüntüleri

Şekil 4.32’de ise 100 g/mL konsantrasyonunda RPF içeren metabolitlerle muamele edilen örneğe ait SEM analiz görüntüleri gösterilmiştir. Şekil 3.32 A’da görüldüğü üzere metabolit ile maumele edilen örnekte bakterilerin spiral/kıvrımlı formda oldukları görülürken aynı zamanda örneklerde 2.87µm uzunluğunda basil formunda bakterilerin de bulunduğu tespit edildi.



Şekil 4. 33 Kanamisin ile indüklenen *H. pylori* kokodilerinin (A) ve 100µg/mL RPF içeren metabolitlerle inkübe edilen *H. pylori* kokoidlerinin resusitasyon sonrası (B) gram boyama görüntüleri

Şekil 4.33 A’da kanamisin ile indüklenen *H. pylori* kokoid formlarının gram boyama görüntüsü verilmiştir. Normal koşullarda spiral ve kıvrımlı bir morfolojiye sahip *H. pylori* kanamisin ile inkübasyon sonrası bakterilerin pembe boyanmış gram negatif kokoid morfolojide olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.33 B’de ise 100µg/mL RPF içeren metabolitlerle inkübasyonun 24. saatinde alınan örnekte ise pembe boyanmış gram negatif kıvrımlı bakterilerin varlığı belirlenmiştir.

Günümüzde *H. pylori* enfeksiyonu dünyanın yarısından fazlasını ve gelişmekte olan ülkelerin ise %80'ninden fazlasını etkileyen oldukça ciddi hastalıklarla ilişkili bir global halk sağlığı tehditidir. *H. pylori* bir bakteri olduğundan enfeksiyon ile mücadele basit görülmekte yapılan çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Uygulanan antibiyotik tedavisinde henüz %100 eradikasyona ulaşılamamış ve günümüze kadar terapötik ve koruyucu aşılarda geliştirilmesi mümkün olmamıştır. *H. pylori* enfeksiyonuna karşı tedavi uygulamalarında ikili yada üçlü antibiyotik kombinasyonları kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda tedavide kullanılan CLA, TET, MTZ, AMX ve LEV gibi ilaçlara karşı bakterilerde direnç gelişmesi nedeniyle yeterli başarıya ulaşılamamaktadır. Tedavide yaşanan bir diğer önemli problem ise antibiyotiğe maruz bırakılan bakterilerin aktif spiral formdan kokoid forma dönüşmeleridir. Bu durumda bakteriler antibiyotik tedavisine direnç geliştirmekte, uygun ortam koşulları oluştuğunda ise yeniden enfeksiyon başlatabilme kapasitesine erişmektedir. Stres koşullarında *H. pylori* kokoid formlarının oluşması ve çevresel etmenlerden kendini koruyarak içme ve atık sularında bile bulunabilmesi *H. pylori* bakterisinin ne kadar ciddi bir tehdit olduğunu göstermektedir. Bu nedenle *H. pylori* tedavisi sırasında antibiyotiklere maruz kalan bakterilerin kokoid forma dönüşümünün engellenmesinin tedavideki eradikasyon başarısını arttırabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak *H. pylori*'nin kokoid formdan yeniden spiral forma dönüşümünü inceleyen çalışmalar yapılmıştır. Ancak günümüze kadar bu morfolojik dönüşümü tetikleyebilen biyolojik temelli herhangi bir ajan kullanılmamıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda VBNC sınıfına dahil bakterilerde incelenen RPF enziminin stasyonere fazda olsa bile bakterilerin çoğalmalarını stimüle ettikleri gösterilmiştir. *H. pylori*'nin kokoid formunun canlı fakat üremeyen dormant fazı olduğu düşünüldüğünde RPF enzimi uygulamasının bakterilerin yeniden çoğalabilen aktif/spiral forma dönüşümünü indükleyebilecekleri tarafımızca

düşünülmüştür. Buna karşılık günümüze kadar RPF enzimi ve enzimi içeren metabolitin *H. pylori*'nin kokoid formları üzerinde resusitasyon etkisinin incelendiği herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasının amacı *Micrococcus luteus*'dan elde edilen resusitasyon promotör faktörleri içeren metabolitlerin üretilmesi ve karakterizasyonu, farklı kültür ortamlarında *H. pylori*'nin kokoid forma dönüşümünün indüklenmesi ve elde edilen RPF içeren metabolitlerin *H. pylori*'nin kokoid formlarının aktif-spiral forma dönüşümüne etkisinin incelenmesi olmuştur.

Tezin amaç ve hedefine uygun olarak öncelikle ATCC 43504 suşu olan *H. pylori* kriyobanktan çıkarıldı ve laboratuvarımızda kültürü yapıldı. Ardından *H. pylori*'nin karakterizasyonu üreaz, katalaz, oksidaz testleri ve gram boyama yöntemleri ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre bu bakterinin üreaz, katalaz ve oksidaz pozitif bir bakteri olduğu belirlenerek gram boyama sonucunda gram negatif olduğu tespit edildi. Bu özelliklerinden dolayı kokoid formlarının oluşturulması amacıyla çalışmalar bu suş ile devam ettirildi.

Daha sonraki aşamada ise çalışmamızın temelini oluşturan *H. pylori*'nin kokoid formunu oluşturmak için bakteriler birbirinden farklı ortam koşullarında inkübe edildi. Literatürde *H. pylori*'nin spiral formdan kokoid forma dönüşümünün incelendiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [27, 160, 161, 163, 166]. *H. pylori*'nin kokoid formlarının indüklenmesi için kültür ortamına antibiyotik ilavesi, ekstrem sıcaklıklarda ve besin içermeyen ortamlarda inkübasyon, su ile indükleme, ekstrem pH'lara maruz bırakılma ve hatta farklı bakteri türleri ile kokültür gibi koşulların etkisi yapılan çalışmalar arasındadır.

Bu bilgiler ışığında çalışmalarımızda *H. pylori*'nin kokoid formlarını oluşturmak için uzun süreli kültür (kültürün yaşlanması), +4 ve +22°C'lerde inkübasyon, kanamisin ilave edilmiş kültür ortamında inkübasyona ve PBS (açlık) ortamında inkübasyona gibi beş farklı koşulun etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Kokoid formlarının dönüşümü Flow-sitometre, gram boyama, UV spektrofotometre ve SEM analiz yöntemleri ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 192 saatlik inkübasyon sonrası incelenen tüm ortam koşullarında *H. pylori* kokoid formlarının olduğu ancak yalnızca PBS (açlık) ve kanamisin antibiyotiği

varlığında inkübe edilen spiral *H. pylori* bakterilerinin tamamen kokoid forma dönüştüğü saptandı. Beş farklı koşulda kokoid dönüşümleri incelenen *H. pylori* bakterileri arasında kanamisin ile inkübe edilen bakterilerin 24 saat sonunda bile çoğunluğunun kokoid forma dönüştüğü gözlemlenmiştir. Kusters ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kloramfenikol, tetrasiklin, rifampin ve kanamisin antibiyotiklerinin *H. pylori* üzerindeki morfolojik değişimleri incelenmiş ve bu antibiyotikler içerisinde en hızlı kokoidleşmeye neden olan antibiyotiğin kanamisin olduğu ve 24 saatlik süre içerisinde spiral formları tamamen kokoid formlara dönüştürdüğü gösterilmiştir. Bu sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile karşılaştırıldığında benzer bir sonuç olmuştur [27]. Diğer yandan PBS (açlık) ortamı bakteri metabolizma için gerekli bileşikleri içermemesi nedeniyle *H. pylori*'nin hızlıca kokoid formlarına dönüşümünü indüklediği gözlemlenmiştir. Yine Kusters ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *H. pylori*'nin PBS ile inkübasyonu sırasında kokoid dönüşümleri gösterilmiş ve çalışmamızda gösterildiği gibi benzer şekilde 50.saatten itibaren kokoid oranının %80'in üzerine çıktığı gözlemlenmiştir [27]. Fakat +4°C, +22°C'de inkübasyon ve kültürün uzun süre devam ettirilmesi durumlarında 192 saatlik inkübasyona sonunda bile ortamda hala spiral bakterilerin bulunduğu belirlenmiştir.

Bu nedenle daha sonraki deneylerimizde RPF içeren metabolitlerin kokoid formdan spiral forma dönüşümüne etkisinin gösterilebilmesi için çalışmalarımızda tamamen kokoid formlarının görüldüğü PBS ve kanamisine maruz bırakılan kokoidler kullanılmıştır. Literatürde bulunan çalışmalarda elde edilen sonuçlarda Cellini ve ark. 20 gün boyunca kültürledikleri ve 20 gün sonunda elde ettikleri *H. pylori* kokoidleri kullanılmış ve bakteri sayısını optik yoğunluğa göre değerlendirilmiştir. Fakat tüm bakterilerin kokoid forma dönüştürüldüğünden emin olmanın zor olduğu bildirilmiştir [30]. Kusters ve arkadaşları ise 19 gün kültürledikleri *H. pylori*'lerin tamamının kokoide dönüştüğü gösterilsede dönüşüm sürecinin asimptotik olması bu sonuca kuşku ile yaklaşımlarına neden olmuştur.

RPF içeren metabolitlerin üretimi için kullanılan *M. luteus* bakterisinin kültürü yapılmıştır. Ekstraselüler bir enzim olan RPF, *M. luteus* bakteri kültürünün süpernetantında bulunmaktadır. Literatürde var olan bilgiye ek olarak bizde

çalışmamızda RPF enzim üretiminin geç logaritmik fazdan itibaren üretilmeye başladığı sonucunu vardık. *M. luteus* kültürünün 44,48, 60, 65, ve 72.saat gibi farklı inkübasyon zamanlarında alınan örneklerin SDS-PAGE analizi ile protein içeriklerine bakılmıştır. RPF enzime özgü 17kDa'luk bant geç logaritmik faza denk gelen 60, 65 ve 72. saatlerde alınan örneklerde tespit edilmiştir. 17kDa'luk bantlara sahip bu örneklerin total protein konsantrasyonu Bradford protein tayin yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en fazla protein üretimi 60.saatte gerçekleştiği tespit edilmiştir.

PBS ortamında indüklenen *H. pylori* kokoid formları aktif ve inaktif RPF enzimini içeren metabolitler ile kontrol gruplarına ilave edilmiş ve sonuç olarak aktif ve inaktif RPF enzimini içeren ve kontrol grupları dahil tüm ortamlarda üreme meydana gelmiştir. Bu durumun ortamda bulunan spiral bakteri varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde yer alan bilgiye göre *H. pylori* tatlı su kaynaklarında 1 yıldan uzun bir süre yaşayabilme kabiliyetine sahiptir. Tüm flasklarda gözlemlenen bu üreme PBS ile indüklenen *H. pylori* bakterilerinin tamamının kokoide dönüştüğü gösterilse bile ihmal edilen ve ortamda bulunan herhangi bir aktif spiral *H. pylori* varlığının neden olabileceği düşünülmektedir. Bu durum literatürde de var olan *H. pylori* kokoid çalışmalarının temel problemlerinden biridir. *H. pylori* kokoid formlarının indükleme yöntemleri ve bu yöntemlere maruz kalma süreleri, kokoid bakterilerinin yoğunlukları ve canlılıkları ayrıca resusitasyonları üzerinde çalışılması ve standardize edilmesi gereken bir problemidir.

Bu sebeple bu tez çalışmasında aşağıdakiler gerçekleştirilmiştir;

- *H.pylori* bakterilerinin PBS (açlık), uzun süreli kültür, +4 ve +22°C'de inkübasyona ve kanamisin varlığında kültür olmak üzere beş farklı koşulda *H. pylori* spiral bakterilerinin kokod forma dönüşümleri incelenerek beş farklı koşulda kokoidler üretilmiştir. Üretilen bu kokoid formları Flow-sitometre ve SEM analizi ile gösterilmiş ve aynı zamanda gram boyamalarla görüntüler alınmıştır.
- Uzun süreli kültür, +4, +22°C'de, PBS ve kanamisin gibi 5 farklı koşulda inkübe edilen ve kokoid dönüşümleri incelenen *H. pylori* bakterileri

arasında kanamisin ile inkübe edilen bakterilerin kokoide dönüşme hızı diğer koşullara göre en hızlı faktör olduğu belirlenmiştir.

- Ayrıca ilk kez olarak çalışmamızda kokoid ve spiral formlarının sayısal olarak belirlenmesinde Flow sitometre yönteminin uygun olduğu belirlendi.
- *M. luteus* bakterisinden RPF içeren metabolitler elde edilmiş ve Bradford proteyin tayin yöntemi kullanılarak protein konsantrasyonu belirlenmiştir. Ayrıca SDS-PAGE yapılarak metabolit içeriği görüntülenmiştir. Metabolitlerde 17 kDa ağırlığında bantlara denk gelen protein bantlarının varlığı gösterilmiştir. En fazla protein üretimi ise *M. luteus* kültürünün 60.saatinde elde edildi.
- PBS ve kanamisin varlığında indüklenen kokoid formları 1, 10 ve 100µg/mL konsantrasyonlarda RPF enzimini içeren metabolitler ile inkübe edilerek kokoidlerin spiral forma dönüşümüne etkisi incelenmiştir.
- RPF enziminin incelenmesine yönelik PBS ile indüklenen kokoidler RPF içeren ve içermeyen ortamların hepsinde üreme göstermiş bu PBS ile indüklenen ortamda tüm bakterilerin mikroskopik olarak kokoide dönüştüğü gösterilse bile ortamda spiral bakterilerin varlığına işaret etmekte olduğu saptandı.
- Böylece bu tez kapsamında ilk kez olarak *M. luteus*'dan elde edilen ve rpf içeren metabolitlerin kanamisin ile indüklenen *H. pylori*'nin kokoid formları üzerindeki resusitasyon etkinliği incelenmesi sonucunda resusitasyon sağlandığı tespit edilmiştir.

Öneriler

- Kriyobankımızda bulunan ATCC 43504 *H. pylori* suşu azot tankından çıkarıldıktan sonra vankomisin, sefsulodin ve trimetoprim antibiyotiklerini içermeyen %10 at kanı ilave edilmiş Brucella agarda ekimi gerçekleştirilmesi bakterilerin yeniden besiyeri ortamına adaptasyonu açısından daha etkili olmaktadır. Ayrıca %10 at kanı ilave edilmiş Brucella agarda üremeleri gözlemlenen bakterilerin sıvı Brucella broth besi yerine adaptoasyonun sağlanabilmesi için %10 yerine %20 FBS içeren Brucella Broth kullanımı bakterilerin katı besiyeri ortamından sıvı besiyerine geçişi sırasındaki adaptasyonu kolaylaştırmıştır.
- Flow-sitometre analizi ile *H. pylori*'nin spiral ve kokoidlerin ayırt edilmesinde ve sayısal verilerin elde edilmesinde literatürde bulunan seri dilüsyon yöntemine göre daha avantajlı olduğu görülmüştür bu nedenle çalışmalarda spiral ve kokoid bakterilerin sayısal olarak belirlenmesinde Flow-sitometrenin kullanılması önerilmektedir.
- RPF içeren *M. luteus* metabolitlerinin içeriğinin tam olarak tayin edilmesi için Western-Blot yönteminde yapılması ayrıca enzim aktivitesinin belirlenmesi resusitasyon etkinliğinin anlaşılması için daha geniş bilgi sunacağından bu analizlerin de yapılması önerilmektedir.
- *M. luteus* bakterilerinden elde edilen RPF enzimini içeren metabolitlerin 1, 10 ve 100µg/mL konsantrasyonları kanamisin ile indüklenen *H. pylori* kokoid formu üzerindeki resusitasyon etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre RPF enzimini içeren metabolitlerin artan konsantrasyonlarında bakterilerin üreme oranlarının da arttığı görülmüştür. Bu durum RPF enzimi içeren metabolitlerin bakteri büyüme faktörü gibi etki gösterdiği görüşünü akla getirmektedir. Bu nedenle bu konsantrasyonların alt ve üst değerlerinin de resusitasyon etkilerinin incelenmesi bu etkinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.
- *M. luteus* bakterilerinden elde edilen RPF enziminin metabolitten saflaştırılması ve farklı antibiyotik kombinasyonları ile *H. pylori*

enfeksiyonunun tedavideki etkilerinin iv vitro ve in vivo çalışmalarının yapılması *H. pylori* kokoidlerinin tedavi sırasındaki resusitasyonunun anlaşılabilmesi açısından bu çalışmaların yapılması önerilmektedir.



- [1] Y. Moodley, "Age of the Association between *Helicobacter pylori* and Man," vol. 8, May 2012.
- [2] S. L. Percival ve D. W. Williams, "Chapter Seven - *Helicobacter pylori*," in *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)*, ed London: Academic Press, 2014, pp. 119-154.
- [3] M. L. Worku, R. L. Sidebotham, M. M. Walker, T. Keshavarz, ve Q. N. Karim, "The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology," *Microbiology*, vol. 145 (Pt 10), pp. 2803-11, Oct 1999.
- [4] B. Foliguet, F. Vicari, J. C. Guedenet, J. D. De Korwin, ve L. Marchal, "[Scanning electron microscopic study of *Campylobacter pylori* and associated gastroduodenal lesions]," *Gastroenterol Clin Biol*, vol. 13, pp. 65b-70b, 1989.
- [5] M. R. Amieva ve E. M. El-Omar, "Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection," *Gastroenterology*, vol. 134, pp. 306-23, Jan 2008.
- [6] M. Pflock, S. Kennard, N. Finsterer, ve D. Beier, "Acid-responsive gene regulation in the human pathogen *Helicobacter pylori*," *J Biotechnol*, vol. 126, pp. 52-60, Oct 20 2006.
- [7] D. S. Merrell, M. L. Goodrich, G. Otto, L. S. Tompkins, ve S. Falkow, "pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*," *Infect Immun*, vol. 71, pp. 3529-39, Jun 2003.
- [8] S. J. Hessey, J. Spencer, J. I. Wyatt, G. Sobala, B. J. Rathbone, A. T. Axon, vd., "Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis," *Gut*, vol. 31, pp. 134-8, Feb 1990.
- [9] R. Suzuki, S. Shiota, ve Y. Yamaoka, "Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*," *Infect Genet Evol*, vol. 12, pp. 203-13, Mar 2012.
- [10] S. Backert, M. Clyne, ve N. Tegtmeyer, "Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*," *Cell Commun Signal*, vol. 9, p. 28, Nov 1 2011.
- [11] J. Viala, C. Chaput, I. G. Boneca, A. Cardona, S. E. Girardin, A. P. Moran, vd., "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island," *Nat Immunol*, vol. 5, pp. 1166-74, Nov 2004.
- [12] P. Krzyzek ve G. Gosciniak, "A proposed role for diffusible signal factors in the biofilm formation and morphological transformation of *Helicobacter pylori*," *Turk J Gastroenterol*, vol. 29, pp. 7-13, Jan 2018.
- [13] S. M. Smith, C. O'Morain, ve D. McNamara, "*Helicobacter pylori* resistance to current therapies," *Curr Opin Gastroenterol*, vol. 35, pp. 6-13, Jan 2019.
- [14] J. K. Y. Hooi, W. Y. Lai, W. K. Ng, M. M. Y. Suen, F. E. Underwood, D. Tanyingoh, vd., "Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic

- Review and Meta-Analysis," *Gastroenterology*, vol. 153, pp. 420-429, Aug 2017.
- [15] J. Faghri, F. Poursina, S. Moghim, H. Zarkesh Esfahani, B. Nasr Esfahani, H. Fazeli, vd., "Morphological and Bactericidal Effects of Different Antibiotics on *Helicobacter pylori*," *Jundishapur J Microbiol*, vol. 7, Jan 2014.
 - [16] T. Falsafi, P. Moradi, M. Mahboubi, E. Rahimi, H. Momtaz, ve B. Hamed, "Chemical composition and anti-*Helicobacter pylori* effect of *Satureja bachtiarica* Bunge essential oil," *Phytomedicine*, vol. 22, pp. 173-7, Jan 15 2015.
 - [17] M. Obonyo, L. Zhang, S. Thamphiwatana, D. Pornpattananangkul, V. Fu, ve L. Zhang, "Antibacterial activities of liposomal linolenic acids against antibiotic-resistant *Helicobacter pylori*," *Mol Pharm*, vol. 9, pp. 2677-85, Sep 4 2012.
 - [18] H. Tsugawa, H. Suzuki, I. Nakagawa, T. Nishizawa, Y. Saito, M. Suematsu, vd., "Alpha-ketoglutarate oxidoreductase, an essential salvage enzyme of energy metabolism, in coccoid form of *Helicobacter pylori*," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 376, pp. 46-51, Nov 7 2008.
 - [19] V. Berry, K. Jennings, ve G. Woodnutt, "Bactericidal and morphological effects of amoxicillin on *Helicobacter pylori*," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 39, pp. 1859-61, Aug 1995.
 - [20] N. F. Azevedo, C. Almeida, L. Cerqueira, S. Dias, C. W. Keevil, ve M. J. Vieira, "Coccoid Form of *Helicobacter pylori* as a Morphological Manifestation of Cell Adaptation to the Environment," *Appl Environ Microbiol*, vol. 73, pp. 3423-7, May 2007.
 - [21] V. I. Reshetnyak ve T. M. Reshetnyak, "Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis," *World J Gastroenterol*, vol. 23, pp. 4867-78, Jul 21 2017.
 - [22] S. L. Percival ve L. Suleman, "Biofilms and *Helicobacter pylori*: Dissemination and persistence within the environment and host," *World J Gastrointest Pathophysiol*, vol. 5, pp. 122-32, Aug 15 2014.
 - [23] K. Kogure, "Papers from the 4th Medical Microbiology Interdisciplinary Commission (MEMIC) Symposium, Viable but nonculturable microorganisms and emerging infectious diseases," *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 6, p. 107.
 - [24] H. S. Xu, N. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Attwell, D. J. Grimes, ve R. R. Colwell, "Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment," *Microb Ecol*, vol. 8, pp. 313-23, Dec 1982.
 - [25] J. D. Oliver, "The viable but nonculturable state in bacteria," *J Microbiol*, vol. 43 Spec No, pp. 93-100, Feb 2005.
 - [26] M. M. Lleo, B. Bonato, M. C. Tafi, C. Signoretto, M. Boaretti, ve P. Canepari, "Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state," *J Appl Microbiol*, vol. 91, pp. 1095-102, Dec 2001.

- [27] J. G. Kusters, M. M. Gerrits, J. A. Van Strijp, ve C. M. Vandenbroucke-Grauls, "Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death," *Infect Immun*, vol. 65, pp. 3672-9, Sep 1997.
- [28] T. Okada ve G. Adkins, "Unidentified intralesional and intracellular coccoid microorganism discovered in the young man with a diffuse erosive gastroduodenitis and multiple superficial ulcerations," *BMJ Case Rep*, vol. 2014, Feb 4 2014.
- [29] G. Bode, F. Mauch, ve P. Malfertheiner, "The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability," *Epidemiol Infect*, vol. 111, pp. 483-90, Dec 1993.
- [30] L. Cellini, N. Allocati, D. Angelucci, T. Iezzi, E. Di Campi, L. Marzio, vd., "Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice," *Microbiol Immunol*, vol. 38, pp. 843-50, 1994.
- [31] W. Y. Chan, P. K. Hui, K. M. Leung, J. Chow, F. Kwok, ve C. S. Ng, "Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach," *Am J Clin Pathol*, vol. 102, pp. 503-7, Oct 1994.
- [32] P. Krzyzek, M. M. Biernat, ve G. Gosciniak, "Intensive formation of coccoid forms as a feature strongly associated with highly pathogenic *Helicobacter pylori* strains," *Folia Microbiol (Praha)*, Nov 17 2018.
- [33] M. Sarem ve R. Corti, "[Role of *Helicobacter pylori* coccoid forms in infection and recrudescence]," *Gastroenterol Hepatol*, vol. 39, pp. 28-35, Jan 2016.
- [34] K. Costa, G. Bacher, G. Allmaier, M. G. Dominguez-Bello, L. Engstrand, P. Falk, vd., "The morphological transition of *Helicobacter pylori* cells from spiral to coccoid is preceded by a substantial modification of the cell wall," *J Bacteriol*, vol. 181, pp. 3710-5, Jun 1999.
- [35] S. A. Muller, S. R. Pernitzsch, S. B. Haange, P. Uetz, M. von Bergen, C. M. Sharma, vd., "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture based proteomics reveals differences in protein abundances between spiral and coccoid forms of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*," *J Proteomics*, vol. 126, pp. 34-45, Aug 3 2015.
- [36] N. Panutdaporn, K. Kawamoto, H. Asakura, ve S. I. Makino, "Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella Typhimurium* strain LT2," *Int J Food Microbiol*, vol. 106, pp. 241-7, Feb 15 2006.
- [37] G. V. Mukamolova, A. S. Kaprelyants, D. I. Young, M. Young, ve D. B. Kell, "A bacterial cytokine," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, pp. 8916-21, Jul 21 1998.
- [38] G. V. Mukamolova, A. G. Murzin, E. G. Salina, G. R. Demina, D. B. Kell, A. S. Kaprelyants, vd., "Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation," *Mol Microbiol*, vol. 59, pp. 84-98, Jan 2006.

- [39] G. V. Mukamolova, O. A. Turapov, K. Kazarian, M. Telkov, A. S. Kaprelyants, D. B. Kell, *vd.*, "The rpf gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor," *Mol Microbiol*, vol. 46, pp. 611-21, Nov 2002.
- [40] L. Lang, "Barry Marshall 2005 Nobel Laureate in Medicine and Physiology: Anil K. Rustgi, MD, Section Editor," *Gastroenterology*, vol. 129, pp. 1813-1814, 2005.
- [41] Francis Mégraud, Stuart Hazell, ve Youri Glupczynski. Chapter 42 Antibiotic Susceptibility and Resistance in *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*, H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, and S. L. Hazell, Eds., ed Washington (DC): ASM Press, 2001.
- [42] A. Lee, S. L. Hazell, J. O'Rourke, ve S. Kouprach, "Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach," *Infection and immunity*, vol. 56, pp. 2843-2850, 1988.
- [43] K. L. Heilmann ve F. Borchard, "Gastritis due to spiral shaped bacteria other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings," *Gut*, vol. 32, pp. 137-40, Feb 1991.
- [44] C. S. Goodwin, R. K. McCulloch, J. A. Armstrong, ve S. H. Wee, "Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa," *J Med Microbiol*, vol. 19, pp. 257-67, Apr 1985.
- [45] K. A. Eaton, D. R. Morgan, ve S. Krakowka, "Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*," *J Med Microbiol*, vol. 37, pp. 123-7, Aug 1992.
- [46] L. K. Sycuro, C. S. Rule, T. W. Petersen, T. J. Wyckoff, T. Sessler, D. B. Nagarkar, *vd.*, "Flow cytometry-based enrichment for cell shape mutants identifies multiple genes that influence *Helicobacter pylori* morphology," *Mol Microbiol*, vol. 90, pp. 869-83, Nov 2013.
- [47] J. L. Wallace ve D. N. Granger, "The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense," *Faseb j*, vol. 10, pp. 731-40, May 1996.
- [48] D. Y. Graham, "Therapy of *Helicobacter pylori*: current status and issues," *Gastroenterology*, vol. 118, pp. S2-8, Feb 2000.
- [49] B. J. Marshall, L. J. Barrett, C. Prakash, R. W. McCallum, ve R. L. Guerrant, "Urea protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid," *Gastroenterology*, vol. 99, pp. 697-702, Sep 1990.
- [50] N. S. F. Zina Deretsky. (11 August 2009). https://www.flickr.com/photos/nsf_beta/4822021538/in/set-2157621768317570.
- [51] J. C. Das ve N. Paul, "Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children," *Indian J Pediatr*, vol. 74, pp. 287-90, Mar 2007.
- [52] L. J. van Doorn, C. Figueiredo, R. Sanna, A. Plaisier, P. Schneeberger, W. de Boer, *vd.*, "Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*," *Gastroenterology*, vol. 115, pp. 58-66, Jul 1998.

- [53] M. J. Blaser, "Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation," *Gastroenterology*, vol. 102, pp. 720-7, Feb 1992.
- [54] A. M. Allahverdiyev, M. Bagirova, R. Caliskan, H. B. Tokman, H. Aliyeva, G. Unal, *vd.*, "Isolation and diagnosis of *Helicobacter pylori* by a new method: microcapillary culture," *World J Gastroenterol*, vol. 21, pp. 2622-8, Mar 7 2015.
- [55] K. L. Goh, "Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Malaysia--observations in a multiracial Asian population," *Med J Malaysia*, vol. 64, pp. 187-92, Sep 2009.
- [56] H. M. Malaty, D. G. Evans, D. J. Evans, Jr., ve D. Y. Graham, "*Helicobacter pylori* in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class," *Gastroenterology*, vol. 103, pp. 813-6, Sep 1992.
- [57] F. Mégraud, M. P. Brassens-Rabbé, F. Denis, A. Belbouri, ve D. Q. Hoa, "Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations," *Journal of clinical microbiology*, vol. 27, pp. 1870-1873, 1989.
- [58] M. Woodward, C. Morrison, ve K. McColl, "An investigation into factors associated with *Helicobacter pylori* infection," *J Clin Epidemiol*, vol. 53, pp. 175-81, Feb 2000.
- [59] P. K. Bardhan, "Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries," *Clin Infect Dis*, vol. 25, pp. 973-8, Nov 1997.
- [60] H. M. Mitchell, Y. Y. Li, P. J. Hu, Q. Liu, M. Chen, G. G. Du, *vd.*, "Epidemiology of *Helicobacter pylori* in southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition," *J Infect Dis*, vol. 166, pp. 149-53, Jul 1992.
- [61] D. B. Gregson, D. E. Low, M. M. Cohen, N. B. Cooter, J. J. Connon, S. L. Wolman, *vd.*, "The prevalence of *Campylobacter pylori* gastritis among asymptomatic adults," *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, vol. 140, pp. 1449-1453, 1989.
- [62] D. Y. Graham, E. Adam, G. T. Reddy, J. P. Agarwal, R. Agarwal, D. J. Evans, Jr., *vd.*, "Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. Comparison of developing and developed countries," *Dig Dis Sci*, vol. 36, pp. 1084-8, Aug 1991.
- [63] N. Banatvala, K. Mayo, F. Megraud, R. Jennings, J. J. Deeks, ve R. A. Feldman, "The cohort effect and *Helicobacter pylori*," *J Infect Dis*, vol. 168, pp. 219-21, Jul 1993.
- [64] D. J. Cullen, B. J. Collins, K. J. Christiansen, J. Epis, J. R. Warren, I. Surveyor, *vd.*, "When is *Helicobacter pylori* infection acquired?," *Gut*, vol. 34, pp. 1681-2, Dec 1993.
- [65] F. Cantet, C. Magras, A. Marais, M. Federighi, ve F. Mégraud, "*Helicobacter* species colonizing pig stomach: molecular characterization and determination of prevalence," *Applied and environmental microbiology*, vol. 65, pp. 4672-4676, 1999.

- [66] P. Lehours ve O. Yilmaz, "Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection," *Helicobacter*, vol. 12 Suppl 1, pp. 1-3, Oct 2007.
- [67] A. De Schryver, M. Van Winckel, K. Cornelis, G. Moens, G. Devlies, ve G. De Backer, "*Helicobacter pylori* infection: further evidence for the role of feco-oral transmission," *Helicobacter*, vol. 11, pp. 523-8, Dec 2006.
- [68] N. G. Morris A., Lloyd G., Haines D., Rogers A., Taylor D., "Seroepidemiology of *Campylobacter pyloridis*," *N. Z. Med. J.*, vol. 99, pp. 657–659., 1986.
- [69] D. A. C. Vaira D., Holton J., Dowsett J. F., Londei M., Bertoni F., Beltrandi E., Grauenfels P., Salmon P. R., Gandolfi L, "*Campylobacter pylori* in abattoir workers: is it a zoonosis?," *Lancet*, vol. ii, pp. 725–726, 1988.
- [70] J. G. Fox, "Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*," *Aliment Pharmacol Ther*, vol. 9 Suppl 2, pp. 93-103, 1995.
- [71] H. M. Mitchell, "The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and its relation to gastric cancer," pp. 95–114., 1993.
- [72] K. A. Eaton, D. R. Morgan, ve S. Krakowka, "Persistence of *Helicobacter pylori* in Conventionalized Piglets," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 161, pp. 1299-1301, 1990.
- [73] G. S. Engstrand L., Jorgensen A., Schwan A., Scheynius A., "Inoculation of barrier-born pigs with *Helicobacter pylori*: a useful animal model for gastritis type B.," *Infect. Immun.* , vol. 58, pp. 1763–1768, 1990.
- [74] M. P. Dore, M. Bilotta, D. Vaira, A. Manca, G. Massarelli, G. Leandro, vd., "High Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection in Shepherds," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 44, pp. 1161-1164, 1999/06/01 1999.
- [75] M. P. Dore, A. R. Sepulveda, M. S. Osato, G. Realdi, ve D. Y. Graham, "*Helicobacter pylori* in sheep milk," *Lancet*, vol. 354, p. 132, Jul 10 1999.
- [76] R. Neiger, C. Dieterich, A. Burnens, A. Waldvogel, I. Corthésy-Theulaz, F. Halter, vd., "Detection and prevalence of *Helicobacter* infection in pet cats," *Journal of clinical microbiology*, vol. 36, pp. 634-637, 1998.
- [77] K. F. Boehnke, R. K. Brewster, B. N. Sanchez, M. Valdivieso, A. Bussalleu, M. Guevara, vd., "An assessment of drinking water contamination with *Helicobacter pylori* in Lima, Peru," *Helicobacter*, Jan 8 2018.
- [78] M. Shahamat, U. Mai, C. Paszko-Kolva, M. Kessel, ve R. R. Colwell, "Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water," *Appl Environ Microbiol*, vol. 59, pp. 1231-5, Apr 1993.
- [79] F.-F. She, J.-Y. Lin, J.-Y. Liu, C. Huang, ve D.-H. Su, "Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice," *World journal of gastroenterology*, vol. 9, pp. 516-520, 2003.
- [80] X. G. Fan, A. Chua, T. G. Li, ve Q. S. Zeng, "Survival of *Helicobacter pylori* in milk and tap water," *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 13, pp. 1096-8, Nov 1998.
- [81] X. Jiang ve M. P. Doyle, "Effect of environmental and substrate factors on survival and growth of *Helicobacter pylori*," *J Food Prot*, vol. 61, pp. 929-33, Aug 1998.

- [82] N. F. Azevedo, N. Guimaraes, C. Figueiredo, C. W. Keevil, ve M. J. Vieira, "A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity," *Crit Rev Microbiol*, vol. 33, pp. 157-69, 2007.
- [83] H. Uzunismail, "Helicobacter Pylori ve Eradikasyon," *Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu*, pp. 19-26, 11-12 Ocak 2001.
- [84] M. Ö. Mustafa Altındış, "Helicobacter Pylori ve Tanısı," *Kocatepe Tıp Dergisi*, vol. 2, pp. 1-12, 2003.
- [85] Mümin Polat, Serkan Köksoy, "Gastrointestinal Sistemde Tip 1 Kanserojen Bir Bakteri; *Helicobacter pylori*," *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, vol. 3(2), pp. 84-86, 2015.
- [86] E. Bessede, P. Dubus, F. Megraud, ve C. Varon, "Helicobacter pylori infection and stem cells at the origin of gastric cancer," *Oncogene*, vol. 34, pp. 2547-55, May 14 2015.
- [87] J. C. Atherton, "The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases," *Annu Rev Pathol*, vol. 1, pp. 63-96, 2006.
- [88] R. J. Hopkins, L. S. Girardi, ve E. A. Turney, "Relationship between *Helicobacter pylori* eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: a review," *Gastroenterology*, vol. 110, pp. 1244-52, Apr 1996.
- [89] N. O. Ömer Yılmaz, "Helicobacter Pylori ve Gastrointestinal Sistemle İlişkisi" *AÜTD* vol. 38, pp. 13-17 2006.
- [90] E. A. Aysun BOZBAfi, "MALT Lenfoma," *Güncel Gastroenteroloji* Eylül, 2003.
- [91] N. El-Mashad, W. M. El-Emshaty, M. S. Arfat, B. A. Koura, ve S. S. Metwally, "Relation of Cag-A-positive *Helicobacter pylori* strain and some inflammatory markers in patients with ischemic heart diseases," *Egypt J Immunol*, vol. 16, pp. 39-47, 2009.
- [92] M. L. Tomasini, S. Zanussi, M. Sozzi, R. Tedeschi, G. Basaglia, ve P. De Paoli, "Heterogeneity of cag genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens," *J Clin Microbiol*, vol. 41, pp. 976-80, Mar 2003.
- [93] S. Ishaq ve L. Nunn, "Helicobacter pylori and gastric cancer: a state of the art review," *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, vol. 8, pp. S6-S14, Spring 2015.
- [94] V. Conteduca, D. Sansonno, G. Lauletta, S. Russi, G. Ingravallo, ve F. Dammacco, "H. pylori infection and gastric cancer: state of the art (review)," *Int J Oncol*, vol. 42, pp. 5-18, Jan 2013.
- [95] P. C. Konturek, S. J. Konturek, ve T. Brzozowski, "Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis," *J Physiol Pharmacol*, vol. 60, pp. 3-21, Sep 2009.
- [96] M. Hatakeyama, "Helicobacter pylori CagA -- a bacterial intruder conspiring gastric carcinogenesis," *Int J Cancer*, vol. 119, pp. 1217-23, Sep 15 2006.
- [97] C. A. Gonzalez, C. Figueiredo, C. B. Lic, R. M. Ferreira, M. L. Pardo, J. M. Ruiz Liso, vd., "Helicobacter pylori cagA and vacA genotypes as predictors of

- progression of gastric preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain," *Am J Gastroenterol*, vol. 106, pp. 867-74, May 2011.
- [98] P. R. Murray, E. J. Baron, ve M. American Society for, *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C.: ASM Press, 2003.
 - [99] M. Heep, K. Scheibl, A. Degrell, ve N. Lehn, "Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of *Helicobacter pylori*," *J Clin Microbiol*, vol. 37, pp. 3764-6, Nov 1999.
 - [100] S. W. Han, R. Flamm, C. Y. Hachem, H. Y. Kim, J. E. Clarridge, D. G. Evans, vd., "Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates," *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 14, pp. 349-52, Apr 1995.
 - [101] B. E. Dunn, H. Cohen, ve M. J. Blaser, "*Helicobacter pylori*," *Clin Microbiol Rev*, vol. 10, pp. 720-41, Oct 1997.
 - [102] L. K. Siu, W. K. Leung, A. F. Cheng, J. Y. Sung, T. K. Ling, J. M. Ling, vd, "Evaluation of a selective transport medium for gastric biopsy specimens to be cultured for *Helicobacter pylori*," *J Clin Microbiol*, vol. 36, pp. 3048-50, Oct 1998.
 - [103] M. H. Uyanık ve O. A. , "*Helicobacter Pylori*'nin Mikrobiyolojik Tanısı," *The Eurasian Journal of Medicine*, EAJM: 39, Aralık 2007.
 - [104] E. a. Bonamico M, "Evaluation of stool antigen test, PCR on ORAL samples and serology for the noninvasive detection of *Helicobacter pylori* infection in children.," *Helicobacter*, 2004.
 - [105] D. Y. Aksoy, M. Aybar, E. Ozaslan, T. Kav, D. Engin, S. Ercis, vd., "Evaluation of the *Helicobacter pylori* stool antigen test (HpSA) for the detection of *Helicobacter pylori* infection and comparison with other methods," *Hepatogastroenterology*, vol. 50, pp. 1047-9, Jul-Aug 2003.
 - [106] S. Kabir, "Review article: clinic-based testing for *Helicobacter pylori* infection by enzyme immunoassay of faeces, urine and saliva," *Aliment Pharmacol Ther*, vol. 17, pp. 1345-54, Jun 1 2003.
 - [107] J. Faghri, F. Poursina, S. Moghim, H. Zarkesh Esfahani, B. Nasr Esfahani, H. Fazeli, vd., "Morphological and Bactericidal Effects of Different Antibiotics on *Helicobacter pylori*," *Jundishapur J Microbiol*, vol. 7, p. e8704, Jan 2014.
 - [108] G. Ayala, W. I. Escobedo-Hinojosa, C. F. de la Cruz-Herrera, ve I. Romero, "Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection," *World J Gastroenterol*, vol. 20, pp. 1450-69, Feb 14 2014.
 - [109] W. A. de Boer ve G. N. Tytgat, "Regular review: treatment of *Helicobacter pylori* infection," *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 320, pp. 31-34, 2000.
 - [110] S. H. Francis Mégraud, ve Youri Glupczynski., *Chapter 42 Antibiotic Susceptibility and Resistance*: ASM Press, 2001.
 - [111] P. J. Jenks, "Causes of failure of eradication of *Helicobacter pylori*," *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 325, pp. 3-4, 2002.

- [112] G. Chen, Y. Takeuchi, R. Kikuchi, D. Arai, K. Fukuchi, ve K. Gomi, "[The cause of failure of eradication treatment of *Helicobacter pylori*]," *Rinsho Byori*, vol. 53, pp. 692-7, Aug 2005.
- [113] C. O'Morain ve S. Smith, "*Helicobacter pylori* Treatment Failure: The Rationale for Alternative Antibiotics," *Digestion*, vol. 93, pp. 309-310, 2016.
- [114] V. De Francesco, F. Giorgio, C. Hassan, G. Manes, L. Vannella, C. Panella, vd., "Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review," *J Gastrointestin Liver Dis*, vol. 19, pp. 409-14, Dec 2010.
- [115] B. Kocazeybek ve H. B. Tokman, "Prevalence of Primary Antimicrobial Resistance of *H. pylori* in Turkey: A Systematic Review," *Helicobacter*, vol. 21, pp. 251-60, Aug 2016.
- [116] F. Mégraud, N. Lehn, T. Lind, E. Bayerdörffer, C. O'Morain, R. Spiller, vd., "Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 43, pp. 2747-2752, 1999.
- [117] T. Lind, S. Veldhuyzen van Zanten, P. Unge, R. Spiller, E. Bayerdorffer, C. O'Morain, vd., "Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies combining omeprazole with two antimicrobials: the MACH I Study," *Helicobacter*, vol. 1, pp. 138-44, Sep 1996.
- [118] D. Y. Graham ve L. Fischbach, "*Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance," *Gut*, vol. 59, pp. 1143-53, Aug 2010.
- [119] L. Boyanova ve I. Mitov, "Geographic map and evolution of primary *Helicobacter pylori* resistance to antibacterial agents," *Expert Rev Anti Infect Ther*, vol. 8, pp. 59-70, Jan 2010.
- [120] V. D. Francesco, A. Zullo, C. Hassan, F. Giorgio, R. Rosania, ve E. Ierardi, "Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal," *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, vol. 2, pp. 35-41, 2011.
- [121] F. Megraud ve P. Lehours, "*Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing," *Clin Microbiol Rev*, vol. 20, pp. 280-322, Apr 2007.
- [122] N. C. Elviss, R. J. Owen, A. Breathnach, C. Palmer, ve N. Shetty, "*Helicobacter pylori* antibiotic-resistance patterns and risk factors in adult dyspeptic patients from ethnically diverse populations in central and south London during 2000," *J Med Microbiol*, vol. 54, pp. 567-74, Jun 2005.
- [123] J. Versalovic, D. Shortridge, K. Kibler, M. V. Griffy, J. Beyer, R. K. Flamm, vd., "Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 40, pp. 477-480, 1996.
- [124] L. J. van Doorn, Y. J. Debets-Ossenkopp, A. Marais, R. Sanna, F. Megraud, J. G. Kusters, vd., "Rapid detection, by PCR and reverse hybridization, of mutations in the *Helicobacter pylori* 23S rRNA gene, associated with macrolide resistance," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 43, pp. 1779-82, Jul 1999.

- [125] F. Mégraud, "H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing," *Gut*, vol. 53, pp. 1374-84, Sep 2004.
- [126] K. van Amsterdam, A. Bart, ve A. van der Ende, "A Helicobacter pylori TolC efflux pump confers resistance to metronidazole," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 49, pp. 1477-82, Apr 2005.
- [127] K. Hirata, H. Suzuki, T. Nishizawa, H. Tsugawa, H. Muraoka, Y. Saito, vd., "Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in Helicobacter pylori," *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 25 Suppl 1, pp. S75-9, May 2010.
- [128] Z. Zhang, Z. Q. Liu, P. Y. Zheng, F. A. Tang, ve P. C. Yang, "Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of Helicobacter pylori," *World J Gastroenterol*, vol. 16, pp. 1279-84, Mar 14 2010.
- [129] D. I. Edwards, "Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action," *J Antimicrob Chemother*, vol. 31, pp. 9-20, Jan 1993.
- [130] M. A. Jorgensen, J. Manos, G. L. Mendz, ve S. L. Hazell, "The mode of action of metronidazole in Helicobacter pylori: futile cycling or reduction?," *J Antimicrob Chemother*, vol. 41, pp. 67-75, Jan 1998.
- [131] R. Docampo ve S. N. Moreno, "Free radical metabolism of antiparasitic agents," *Fed Proc*, vol. 45, pp. 2471-6, Sep 1986.
- [132] M. A. Smith ve D. I. Edwards, "Oxygen scavenging, NADH oxidase and metronidazole resistance in Helicobacter pylori," *J Antimicrob Chemother*, vol. 39, pp. 347-53, Mar 1997.
- [133] J. Tankovic, D. Lamarque, J. C. Delchier, C. J. Soussy, A. Labigne, ve P. J. Jenks, "Frequent association between alteration of the rdxA gene and metronidazole resistance in French and North African isolates of Helicobacter pylori," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 44, pp. 608-613, 2000.
- [134] D. H. Kwon, J. A. Pena, M. S. Osato, J. G. Fox, D. Y. Graham, ve J. Versalovic, "Frameshift mutations in rdxA and metronidazole resistance in North American Helicobacter pylori isolates," *J Antimicrob Chemother*, vol. 46, pp. 793-6, Nov 2000.
- [135] A. Goodwin, D. Kersulyte, G. Sisson, S. J. Veldhuyzen van Zanten, D. E. Berg, ve P. S. Hoffman, "Metronidazole resistance in Helicobacter pylori is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase," *Mol Microbiol*, vol. 28, pp. 383-93, Apr 1998.
- [136] V. Cattoir, J. Nectoux, C. Lascols, L. Deforges, J. C. Delchier, F. Megraud, vd., "Update on fluoroquinolone resistance in Helicobacter pylori: new mutations leading to resistance and first description of a gyrA polymorphism associated with hypersusceptibility," *Int J Antimicrob Agents*, vol. 29, pp. 389-96, Apr 2007.
- [137] Y. Glupczynski, F. Megraud, M. Lopez-Brea, ve L. P. Andersen, "European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in Helicobacter pylori," *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 20, pp. 820-3, Nov 2001.

- [138] P. Bogaerts, C. Berhin, H. Nizet, ve Y. Glupczynski, "Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium," *Helicobacter*, vol. 11, pp. 441-5, Oct 2006.
- [139] E. Glocker ve M. Kist, "Rapid detection of point mutations in the *gyrA* gene of *Helicobacter pylori* conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach," *J Clin Microbiol*, vol. 42, pp. 2241-6, May 2004.
- [140] J. Tankovic, C. Lascols, Q. Sculo, J. C. Petit, ve C. J. Soussy, "Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 47, pp. 3942-4, Dec 2003.
- [141] H. Miyachi, I. Miki, N. Aoyama, D. Shirasaka, Y. Matsumoto, M. Toyoda, vd., "Primary levofloxacin resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan," *Helicobacter*, vol. 11, pp. 243-9, Aug 2006.
- [142] P. Malfertheiner, F. Megraud, C. O'Morain, F. Bazzoli, E. El-Omar, D. Graham, vd., "Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report," *Gut*, vol. 56, pp. 772-81, Jun 2007.
- [143] E. M. Co ve N. L. Schiller, "Resistance mechanisms in an in vitro-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 50, pp. 4174-6, Dec 2006.
- [144] M. P. Dore, M. S. Osato, G. Realdi, I. Mura, D. Y. Graham, ve A. R. Sepulveda, "Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*," *J Antimicrob Chemother*, vol. 43, pp. 47-54, Jan 1999.
- [145] M. P. Dore, D. Y. Graham, ve A. R. Sepulveda, "Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori*," *Helicobacter*, vol. 4, pp. 154-61, Sep 1999.
- [146] M. M. Gerrits, A. P. Godoy, E. J. Kuipers, M. L. Ribeiro, J. Stoof, S. Mendonca, vd., "Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*," *Helicobacter*, vol. 11, pp. 181-7, Jun 2006.
- [147] E. Rimbara, N. Noguchi, T. Kawai, ve M. Sasatsu, "Correlation between substitutions in penicillin-binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*," *Microbiol Immunol*, vol. 51, pp. 939-44, 2007.
- [148] E. Rimbara, N. Noguchi, T. Kawai, ve M. Sasatsu, "Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*," *J Antimicrob Chemother*, vol. 61, pp. 995-8, May 2008.
- [149] M. J. Matteo, G. Granados, M. Olmos, A. Wonaga, ve M. Catalano, "*Helicobacter pylori* amoxicillin heteroresistance due to point mutations in PBP-1A in isogenic isolates," *J Antimicrob Chemother*, vol. 61, pp. 474-7, Mar 2008.
- [150] H. Nikaido, "Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria," *J Bacteriol*, vol. 178, pp. 5853-9, Oct 1996.
- [151] J. J. Kim, R. Reddy, M. Lee, J. G. Kim, F. A. El-Zaatari, M. S. Osato, vd., "Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of

- Helicobacter pylori* isolates from Korea," *J Antimicrob Chemother*, vol. 47, pp. 459-61, Apr 2001.
- [152] D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, ve V. Ramakrishnan, "The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit," *Cell*, vol. 103, pp. 1143-54, Dec 22 2000.
- [153] J. Y. Wu, J. J. Kim, R. Reddy, W. M. Wang, D. Y. Graham, ve D. H. Kwon, "Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 49, pp. 578-83, Feb 2005.
- [154] L. Nonaka, S. R. Connell, ve D. E. Taylor, "16S rRNA mutations that confer tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* decrease drug binding in *Escherichia coli* ribosomes," *J Bacteriol*, vol. 187, pp. 3708-12, Jun 2005.
- [155] C. A. Trieber ve D. E. Taylor, "Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline," *J Bacteriol*, vol. 184, pp. 2131-40, Apr 2002.
- [156] I. Chopra ve M. Roberts, "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance," *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 65, pp. 232-60 ; second page, table of contents, Jun 2001.
- [157] L. P. Andersen ve L. Rasmussen, "*Helicobacter pylori*-coccoid forms and biofilm formation," *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 56, pp. 112-5, Jul 2009.
- [158] M. Sarem ve R. Corti, *Role of Helicobacter pylori coccoid forms in infection and recrudescence* vol. 39, 2016.
- [159] F. F. She, D. H. Su, J. Y. Lin, ve L. Y. Zhou, "Virulence and potential pathogenicity of coccoid *Helicobacter pylori* induced by antibiotics," *World J Gastroenterol*, vol. 7, pp. 254-8, Apr 2001.
- [160] F. F. She, J. Y. Lin, J. Y. Liu, C. Huang, ve D. H. Su, "Virulence of water-induced coccoid *Helicobacter pylori* and its experimental infection in mice," *World J Gastroenterol*, vol. 9, pp. 516-20, Mar 2003.
- [161] X. Wang, E. Sturegard, R. Rupar, H. O. Nilsson, P. A. Aleljung, B. Carlen, vd., "Infection of BALB/c A mice by spiral and coccoid forms of *Helicobacter pylori*," *J Med Microbiol*, vol. 46, pp. 657-63, Aug 1997.
- [162] U. Mai, G. Geis, H. Leying, G. Ruhl, ve W. Opferkuch., "Dimorphism of *Campylobacter pylori*," *F. Megraud and H. Lamouliatte (ed.), Gastroduodenal pathology and Campylobacter pylori*, p. 33, 1989.
- [163] N. Saito, K. Konishi, F. Sato, M. Kato, H. Takeda, T. Sugiyama, vd., "Plural transformation-processes from spiral to coccoid *Helicobacter pylori* and its viability," *J Infect*, vol. 46, pp. 49-55, Jan 2003.
- [164] M. Nilius, A. Strohle, G. Bode, ve P. Malfertheiner, "Coccoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity," *Zentralbl Bakteri*, vol. 280, pp. 259-72, Sep 1993.

- [165] M. Benaissa, P. Babin, N. Quellard, L. Pezennec, Y. Cenatiempo, ve J. L. Fauchere, "Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form," *Infect Immun*, vol. 64, pp. 2331-5, Jun 1996.
- [166] R. Willen, B. Carlen, X. Wang, N. Papadogiannakis, R. Odselius, ve T. Wadstrom, "Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from spiral to coccoid form. Scanning (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) suggest viability," *Ups J Med Sci*, vol. 105, pp. 31-40, 2000.
- [167] K. H. Schleifer ve O. Kandler, "Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications," *Bacteriological Reviews*, vol. 36, pp. 407-477, 1972.
- [168] S. Hirukawa, H. Sagara, S. Kaneto, T. Kondo, K. Kiga, T. Sanada, vd., "Characterization of morphological conversion of *Helicobacter pylori* under anaerobic conditions," *Microbiol Immunol*, vol. 62, pp. 221-228, Apr 2018.
- [169] C. Chaput, C. Ecobichon, N. Cayet, S. E. Girardin, C. Werts, S. Guadagnini, vd., "Role of AmiA in the morphological transition of *Helicobacter pylori* and in immune escape," *PLoS Pathog*, vol. 2, p. e97, Sep 2006.
- [170] B. Janas, E. Czkwianianc, L. Bak-Romaniszyn, H. Bartel, D. Tosik, ve I. Planeta-Malecka, "Electron microscopic study of association between coccoid forms of *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells," *Am J Gastroenterol*, vol. 90, pp. 1829-33, Oct 1995.
- [171] D. Bumann, H. Habibi, B. Kan, M. Schmid, C. Goosmann, V. Brinkmann, vd., "Lack of Stage-Specific Proteins in Coccoid *Helicobacter pylori* Cells," *Infect Immun*, vol. 72, pp. 6738-42, Nov 2004.
- [172] H. Mizoguchi, T. Fujioka, K. Kishi, A. Nishizono, R. Kodama, ve M. Nasu, "Diversity in protein synthesis and viability of *Helicobacter pylori* coccoid forms in response to various stimuli," *Infection and immunity*, vol. 66, pp. 5555-5560, 1998.
- [173] K. Tominaga, N. Hamasaki, T. Watanabe, T. Uchida, Y. Fujiwara, O. Takaishi, vd., "Effect of culture conditions on morphological changes of *Helicobacter pylori*," *J Gastroenterol*, vol. 34 Suppl 11, pp. 28-31, 1999.
- [174] J. A. Armstrong, S. H. Wee, C. S. Goodwin, ve D. H. Wilson, "Response of *Campylobacter pyloridis* to antibiotics, bismuth and an acid-reducing agent in vitro--an ultrastructural study," *J Med Microbiol*, vol. 24, pp. 343-50, Dec 1987.
- [175] C. R. DeLoney ve N. L. Schiller, "Competition of various beta-lactam antibiotics for the major penicillin-binding proteins of *Helicobacter pylori*: antibacterial activity and effects on bacterial morphology," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 43, pp. 2702-9, Nov 1999.
- [176] M. L. Worku, R. L. Sidebotham, ve Q. N. Karim, "Effects of ranitidine bismuth citrate on *Helicobacter pylori* motility, morphology and survival," *Aliment Pharmacol Ther*, vol. 13, pp. 753-60, Jun 1999.
- [177] M. Nakao, M. Tada, K. Tsuchimori, ve M. Uekata, "Antibacterial properties of lansoprazole alone and in combination with antimicrobial agents

- against *Helicobacter pylori*," *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 14, pp. 391-399, May 01 1995.
- [178] F. Poursina, J. Fagri, N. Mirzaei, ve H. G. Safaei, "Overexpression of *spoT* gene in coccoid forms of clinical *Helicobacter pylori* isolates," *Folia Microbiol (Praha)*, vol. 63, pp. 459-465, Jul 2018.
 - [179] F. Sisto, M. I. Brenciaglia, M. M. Scaltrito, ve F. Dubini, "*Helicobacter pylori*: *ureA*, *cagA* and *vacA* expression during conversion to the coccoid form," *Int J Antimicrob Agents*, vol. 15, pp. 277-82, Aug 2000.
 - [180] M. F. Loke, C. G. Ng, Y. Vilashni, J. Lim, ve B. Ho, "Understanding the dimorphic lifestyles of human gastric pathogen *Helicobacter pylori* using the SWATH-based proteomics approach," *Sci Rep*, vol. 6, p. 26784, May 25 2016.
 - [181] R. G. Correa Silva, N. C. Machado, M. A. Carvalho, ve M. A. Rodrigues, "*Helicobacter pylori* infection is high in paediatric nonulcer dyspepsia but not associated with specific gastrointestinal symptoms," *Acta Paediatr*, vol. 105, pp. e228-31, May 2016.
 - [182] S. A. Park ve N. G. Lee, "Global regulation of gene expression in the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* in response to aerobic oxygen tension under a high carbon dioxide level," *J Microbiol Biotechnol*, vol. 23, pp. 451-8, Apr 2013.
 - [183] F. Poursina, J. Fagri, N. Mirzaei, ve H. G. Safaei, "Overexpression of *spoT* gene in coccoid forms of clinical *Helicobacter pylori* isolates," *Folia Microbiologica*, vol. 63, pp. 459-465, 2018/07/01 2018.
 - [184] Y. Moreno ve M. A. Ferrus, "Specific detection of cultivable *Helicobacter pylori* cells from wastewater treatment plants," *Helicobacter*, vol. 17, pp. 327-32, Oct 2012.
 - [185] P. Chamanrokh, M. H. Shahhosseiny, M. Mazaheri Assadi, T. Nejdassattari, ve D. Esmaili, "Three Tests Used to Identify Non-Culturable Form of *Helicobacter pylori* in Water Samples," *Jundishapur J Microbiol*, vol. 8, p. e16811, Apr 2015.
 - [186] J. A. Benson, K. A. Fode-Vaughan, ve M. L. Collins, "Detection of *Helicobacter pylori* in water by direct PCR," *Lett Appl Microbiol*, vol. 39, pp. 221-5, 2004.
 - [187] A. A. Al-Sulami, T. A. Al-Edani, ve A. A. Al-Abdula, "Culture Method and PCR for the Detection of *Helicobacter pylori* in Drinking Water in Basrah Governorate Iraq," *Gastroenterol Res Pract*, vol. 2012, p. 245167, 2012.
 - [188] A. E. McDaniels, L. Wymer, C. Rankin, ve R. Haugland, "Evaluation of quantitative real time PCR for the measurement of *Helicobacter pylori* at low concentrations in drinking water," *Water Res*, vol. 39, pp. 4808-16, Nov 2005.
 - [189] S. Narikawa, S. Kawai, H. Aoshima, O. Kawamata, R. Kawaguchi, K. Hikiji, vd., "Comparison of the nucleic acids of helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*," *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, vol. 4, pp. 285-290, 1997.
 - [190] L. Cellini, I. Robuffo, E. Di Campli, S. Di Bartolomeo, T. Taraborelli, ve B. Dainelli, "Recovery of *Helicobacter pylori* ATCC43504 from a viable but not

- culturable state: regrowth or resuscitation?," *Apmis*, vol. 106, pp. 571-9, May 1998.
- [191] M. Kocur, Z. Paova, ve T. Martinec, "Taxonomic status of *Micrococcus luteus* (Schroeter 1872) Cohn 1872, and designation of the neotype strain," *International Journal of Systematic Bacteriology* vol. 22, pp. 218-223, 1972.
 - [192] V. Koltunov, C. L. Greenblatt, A. V. Goncharenko, G. R. Demina, B. Y. Klein, M. Young, vd., "Structural changes and cellular localization of resuscitation-promoting factor in environmental isolates of *Micrococcus luteus*," *Microb Ecol*, vol. 59, pp. 296-310, Feb 2010.
 - [193] T. Ohama, A. Muto, ve S. Osawa, "Role of GC-biased mutation pressure on synonymous codon choice in *Micrococcus luteus*, a bacterium with a high genomic GC-content," *Nucleic Acids Res*, vol. 18, pp. 1565-9, Mar 25 1990.
 - [194] D. H. Bergey ve J. G. Holt, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 1994.
 - [195] A. S. Kaprelyants ve D. B. Kell, "Dormancy in Stationary-Phase Cultures of *Micrococcus luteus*: Flow Cytometric Analysis of Starvation and Resuscitation," *Appl Environ Microbiol*, vol. 59, pp. 3187-96, Oct 1993.
 - [196] C. Greenblatt, J. Baum, B. Klein, S. Nachshon, V. Koltunov, ve R. Cano, *Micrococcus luteus - Survival in Amber* vol. 48, 2004.
 - [197] R. P. Adang, H. C. Schouten, F. H. van Tiel, ve G. H. Blijham, "Pneumonia due to *Micrococcus* spp. in a patient with acute myeloid leukaemia," *Leukemia*, vol. 6, pp. 224-6, Mar 1992.
 - [198] G. Miltiadous ve M. Elisaf, "Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature," *Journal of medical case reports*, vol. 5, pp. 251-251, 2011.
 - [199] J. R. Dib, W. Liebl, M. Wagenknecht, M. E. Farias, ve F. Meinhardt, "Extrachromosomal genetic elements in *Micrococcus*," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 97, pp. 63-75, Jan 2013.
 - [200] G. V. Mukamolova, N. D. Yanopolskaya, D. B. Kell, ve A. S. Kaprelyants, "On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus*," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 73, pp. 237-43, Apr 1998.
 - [201] X. Su, Y. Liu, J. Hu, L. Ding, ve C. Shen, "Optimization of protein production by *Micrococcus luteus* for exploring pollutant-degrading uncultured bacteria," *Springerplus*, vol. 3, p. 117, 2014.
 - [202] Y. Liu, X. Su, L. Lu, L. Ding, ve C. Shen, "A novel approach to enhance biological nutrient removal using a culture supernatant from *Micrococcus luteus* containing resuscitation-promoting factor (Rpf) in SBR process," *Environ Sci Pollut Res Int*, vol. 23, pp. 4498-508, Mar 2016.
 - [203] N. H. Keep, J. M. Ward, M. Cohen-Gonsaud, ve B. Henderson, "Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states," *Trends in microbiology*, vol. 14, pp. 271-276, 2006/06// 2006.

- [204] J. M. Tufariello, W. R. Jacobs, Jr., ve J. Chan, "Individual Mycobacterium tuberculosis resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo," *Infect Immun*, vol. 72, pp. 515-26, Jan 2004.
- [205] M. Kurokawa, M. Nukina, H. Nakanishi, S. Tomita, T. Tamura, ve T. Shimoyama, "[Resuscitation from the viable but nonculturable state of *Helicobacter pylori*]," *Kansenshogaku Zasshi*, vol. 73, pp. 15-9, Jan 1999.
- [206] I. D. Puspita, W. Kitagawa, Y. Kamagata, M. Tanaka, ve C. H. Nakatsu, "Increase in Bacterial Colony Formation from a Permafrost Ice Wedge Dosed with a *Tomitella biformata* Recombinant Resuscitation-Promoting Factor Protein," *Microbes Environ*, vol. 30, pp. 151-6, 2015.
- [207] I. Dewi Puspita, M. Uehara, T. Katayama, Y. Kikuchi, W. Kitagawa, Y. Kamagata, vd., "Resuscitation promoting factor (Rpf) from *Tomitella biformata* AHU 1821(T) promotes growth and resuscitates non-dividing cells," *Microbes Environ*, vol. 28, pp. 58-64, Mar 2013.
- [208] X. Y. Yu, L. Zhang, B. Ren, N. Yang, M. Liu, X. T. Liu, vd, "Arthrobacter liuii sp. nov., resuscitated from Xinjiang desert soil," *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 65, pp. 896-901, Mar 2015.
- [209] Y. Jin, G. Gan, X. Yu, D. Wu, L. Zhang, N. Yang, vd., "Isolation of Viable but Non-culturable Bacteria from Printing and Dyeing Wastewater Bioreactor Based on Resuscitation Promoting Factor," *Curr Microbiol*, vol. 74, pp. 787-797, Jul 2017.
- [210] X. M. Su, Y. D. Liu, M. Z. Hashmi, L. X. Ding, ve C. F. Shen, "Culture-dependent and culture-independent characterization of potentially functional biphenyl-degrading bacterial community in response to extracellular organic matter from *Micrococcus luteus*," *Microb Biotechnol*, vol. 8, pp. 569-78, May 2015.
- [211] A. Allahverdiyev, "Somatik ve Kök Hücre Kültür Sistemlerinin Temel İlkeleri," *Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul*, 2018.
- [212] L. Bircher, A. Geirnaert, F. Hammes, C. Lacroix, ve C. Schwab, "Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes," *Microbial biotechnology*, vol. 11, pp. 721-733, 2018.
- [213] M. Benore, A. Ninfa, ve D. Ballou, *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology 2nd Edition*, 2010.
- [214] J. G. N. Thomas G. Blanchard, "Laboratory Maintenance of *Helicobacter* Species," *Curr Protoc Microbiol*, 2006.
- [215] R. Coico, "Gram staining," *Curr Protoc Microbiol*, vol. Appendix 3, p. Appendix 3C, Oct 2005.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: didem.aktas1992@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. D. Aktaş, M. Bağirova, A.M. Allahverdiyev ve E.Ş. Abamor, '*Helicobacter pylori*'nin Kokoid Formu Üzerinde Etkisi İncelenmek Üzere *Micrococcus luteus* Ekstraselüler Metabolitlerinin Üretilmesi', VII. Ulusal Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, 3-5 Mayıs 2019, İzmir.

Projeler

1. *Micrococcus Luteus* Metabolitlerinin, *Helicobacter Pylori*'nin Kokoid Formu Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün TYL-2018-3326 Numaralı Yüksek Lisans Projesi.