

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLARİTROMİSİN VE ALPINIA OFFICINARUM EKSTRAKTI  
İÇEREN POLİKAPROLAKTON NANOPARTİKÜLLERİNİN  
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE ETKİNLİKLERİNİN  
HELICOBACTER PYLORI VE MİDE KANSERİ HÜCRELERİ  
ÜZERİNDE IN VITRO İNCELENMESİ**

**Bükre KIRAN**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Aralık, 2020

**T.C.**  
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLARİTROMİSİN VE ALPINIA OFFICINARUM EKSTRAKTI İÇEREN  
POLİKAPROLAKTON NANOPARTİKÜLLERİNİN SENTEZİ,  
KARAKTERİZASYONU VE ETKİNLİKLERİNİN HELICOBACTER  
PYLORI VE MİDE KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDE IN VITRO  
İNCELENMESİ**

Bükre KIRAN tarafından hazırlanan tez çalışması 25.12.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR  
Yıldız Teknik Üniversitesi  
Danışman

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Danışman  
Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ, Üye  
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK, Üye  
Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Danışmanım Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Klaritromisin ve Alpinia Officinarum Ekstraktı İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Etkinliklerinin Helicobacter Pylori ve Mide Kanseri Hücreleri Üzerinde İn Vitro İncelenmesi 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.

Bükre KIRAN

İmza

*Aileme*



## TEŞEKKÜR

---

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimleri ve tecrübeleriyle bana her zaman destek olan Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarının kurucuları değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e ve Sn. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya, araştırmalarımnda bilgi ve deneyimleriyle bana her zaman yol gösteren danışman hocam Sn. Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a,

Tezimin değerlendirilmesinde katkılarını esirgemeyen jüri üyelerim Sn. Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK'a ve Sn. Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ'a

Tez çalışmam sırasında sentezlenen nanopartiküllerin SEM görüntülerinin alınmasındaki katkılarından dolayı ArelPOTKAM - Polimer Teknolojiler ve Kompozit Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanı Uzm. Demet SEZGİN MANSUROĞLU'na,

Tez deneylerimin yapılması sırasında bilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen başta Tural SAFAROV olmak üzere katkılarından dolayı Sahar DİNPARVAR, Kübra KARADAŞ, Buşra AKGÜL, Umut OĞLUOĞLU, Murat IHLAMUR, Atıfcan DEMİRCİOĞLU ve tüm Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarı öğrencilerine,

Çalışmam boyunca en stresli anlarımda yanımda olan başta Damla Zeynep BAKMAZ ve Hale KESİM olmak üzere sevgili arkadaşlarıma,

Beni her zaman ve her konuda destekleyen, karşılıksız emekleri ve sevgileri için annem Sevgi KIRAN'a, babam Aydın KIRAN'a ve kardeşim Berna KIRAN'a,

Bana olan güvenini ve desteğini her zaman hissettiğim nişanlım Levent ÜNER'e

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bükre KIRAN

# İÇİNDEKİLER

<b>SİMGE LİSTESİ</b>	<b>ix</b>
<b>KISALTMA LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xv</b>
<b>ÖZET</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xviii</b>
<b>1 GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1 Literatür Özeti .....	1
1.2 Tezin Amacı .....	4
1.3 Hipotez .....	5
<b>2 GENEL BİLGİLER</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Helicobacter pylori</i> Tarihçesi .....	7
2.2 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Morfolojisi .....	8
2.3 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Patogenezi .....	10
2.3.1 Gastrik Ortamda Kolonizasyonu.....	10
2.4 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Virülans Faktörleri.....	12
2.5 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Kültür ve Üreme Özellikleri.....	14
2.6 Epidemiyoloji .....	16
2.7 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Bulaşma Yolları.....	17
2.8 <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu ve İlişkili Hastalıklar .....	18
2.8.1 Akut Enfeksiyon.....	19
2.8.2 Gastrit.....	19
2.8.3 Peptik Ülser.....	20
2.8.4 Gastrik Adenokarsinom.....	21
2.8.5 Mukoza İlişkili Lenfoid Doku Lenfoma.....	22

2.8.6 Gastro-özefagal Reflü Hastalığı.....	23
2.8.7 Fonksiyonel Dispepsi.....	24
2.8.8 Gastrointestinal Sistem Dışı Hastalıklar .....	24
2.9 <i>Helicobacter pylori</i> Tanı Yöntemleri.....	28
2.9.1 İnvaziv Yöntemler.....	29
2.9.2 İnvaziv olmayan yöntemler.....	35
2.10 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Tedavisi.....	38
2.10.1 Tedavide Kullanılan İlaçlar.....	38
2.10.2 Birinci Basamak <i>Helicobacter pylori</i> Tedavisi.....	40
2.10.3 İkinci Basamak <i>Helicobacter pylori</i> Tedavisi.....	41
2.11 Antibiyotik Dirençliliği.....	41
2.12 <i>Helicobacter pylori</i> 'ye Yönelik Alternatif Tedavi Yaklaşımları.....	44
2.12.1 Probiyotikler.....	45
2.12.2 Bitkiler .....	47
2.12.3 Nanopartiküller.....	52
<b>3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR</b> .....	<b>60</b>
3.1 Gereç.....	60
3.1.1 Ekipman ve Sarf Malzemeler.....	60
3.1.2 Kimyasal Maddeler.....	61
3.1.3 Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	61
3.1.4 Deneylerde Kullanılan Hücre Hatları.....	64
3.1.5 Mikroorganizmalar.....	65
3.2 Metod.....	65
3.2.1 <i>Helicobacter pylori</i> Kültürü ve Karakterizasyonu.....	65
3.2.2 Bitki Ekstraktlarının Elde Edilmesi.....	66
3.2.3 Bitki Ekstraktlarının Antibakteriyel Etkisinin <i>Helicobacter pylori</i> Kültüründe İncelenmesi.....	67
3.2.4 <i>Alpinia officinarumun</i> Ekstraktının Karakterizasyonu.....	67
3.2.5 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi.....	68
3.2.6 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	71

3.2.7	Klaritromisinin <i>Alpinia officinarum</i> Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin <i>Helicobacter pylori</i> Üzerinde Antibakteriyel Etkinliklerinin İncelenmesi.....	73
3.2.8	Klaritromisin <i>Alpinia officinarum</i> Ekstraktı ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin J774 ve AGS Hücre Hatlarında Sitotoksosite Analizleri.....	75
<b>4</b>	<b>DENEYSEL SONUÇLAR</b>	<b>80</b>
4.1	<i>Helicobacter pylori</i> 'nin Morfolojik Değerlendirilmesi ve Biyokimyasal Özellikleri.....	80
4.2	Bitki Ekstraktlarının Antibakteriyel Etkisinin <i>Helicobacter pylori</i> Kültüründe Disk Difüzyon Yöntemi ile Analizi.....	81
4.3	<i>Alpinia officinarum</i> Ekstraktının Toplam Fenolik Madde Tayini.....	83
4.4	Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu.....	85
4.4.1	Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Boyut Analizi.....	85
4.4.2	Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Zeta Potansiyel Analizi.....	87
4.4.3	Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi.....	89
4.4.4	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi.....	91
4.4.5	Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Reaksiyon Verimi.....	96
4.4.6	Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Enkapsülasyon Etkinliği.....	96
4.4.7	Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Salım Profilleri.....	97
4.5	Klaritromisin <i>Alpinia officinarum</i> Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin <i>Helicobacter pylori</i> Üzerinde Antibakteriyel Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	101
4.5.1	Klaritromisin ve <i>Alpinia officinarum</i> Ekstraktının Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Sıvı Makrodilüsyon Yöntemi ile Analizi.....	101
4.5.2	Klaritromisin ve <i>Alpinia officinarum</i> Ekstraktının Minimum Bakterisidal Konsantrasyonunun Analizi.....	102
4.5.3	Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Antimikrobiyal Etkinliklerinin Tayini.....	103

4.6	Klaritromisinin <i>Alpinia officinarum</i> Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin J774 ve AGS Hücre hatlarında Sitotoksik Analizleri.....	109
4.6.1	J774 Hücre Hattının Kültürü ve Morfolojik Değerlendirilmesi.....	109
4.6.2	Klaritromisinin <i>Alpinia officinarum</i> Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattında Toksiklerinin Belirlenmesi.....	110
4.6.3	AGS Hücre Hattının Kültürü ve Morfolojik Değerlendirilmesi.....	111
4.6.4	Klaritromisinin <i>Alpinia officinarum</i> Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin AGS Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	111
<b>5</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>115</b>
	<b>KAYNAKÇA</b>	<b>127</b>
	<b>TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR</b>	<b>145</b>

## SİMGE LİSTESİ

---

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\epsilon$	Epsilon
g	Gram
kDa	Kilo dalton
L	Litre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ m	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mV	Milivolt
nm	Nanometre
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
cm	Santimetre
~	Yaklaşık
%	Yüzde

## KISALTMA LİSTESİ

---

CagA	Sitotoksin ilişkili gen A
CagA PAI	Sitotoksin ilişkili gen A patojenite adası
CGT	Kolesterol glikosil-transferaz
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco modifiye Eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EHMSG	Avrupa Helicobacter ve Mikrobiota Çalışma Grubu
ELISA	Enzim Bağlı Immune Assay
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Gıda ve ilaç dairesi
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GGT	γ-glutamil transpeptidaz GGT
GÖRH	Gastroözofageal reflü hastalığı
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
H&E	Hematoksilin ve eozin
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IFN	İnterferon
IgA	İmmüoglobülin A
IgG	İmmüoglobülin G
IgM	İmmüoglobülin M
IL	İnterlökin
KCl	Potasyum klorür
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Mono potasyum fosfat
MALT	Mukoza ile ilişkili lenfoid doku
MBK	Minimum bakterisidal konsantrasyon
MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

N <sub>2</sub>	Nitrojen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyum hidrojen monofosfat
NaCl	Sodyum klorür
NH <sub>3</sub>	Amonyak
NPV	Negatif prediktif değer
OMP	Dış zar proteinleri
PCL-ALP	<i>Alpinia officinarum</i> yüklü PCL nanopartikülleri PCL-ALP
PCL-CLR-ALP	Klaritromisin ve <i>Alpinia officinarum</i> yüklü PCL nanopartikülleri
PCL-CLR	Klaritromisin yüklü PCL nanopartikülleri
PCL	Polikaprolakton
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDI	Çoklu dağılım indeksi
PEG	Polietilen glikol
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
PPI	Proton pompa inhibitörleri
PPV	Pozitif prediktif değer
PVA	Polivinil alkol
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
ROS	Reaktif oksijen
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
T4SS	Tip IV sekresyon sistemi
Tc	Sitotoksik T hücreleri
UV	Ultraviyole
VacA	Vakuol oluşturucu sitotoksin A

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 J99 <i>H. pylori</i> suşunun ışık mikroskobu ve SEM görüntüleri.....	9
Şekil 2.2 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin farklı formlarının SEM görüntüsü.....	10
Şekil 2.3 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin gastrik ortamda kolonizasyonu.....	11
Şekil 2.4 Dış membran proteinleri aracılı patogenezin gösterimi.....	12
Şekil 2.5 <i>H. pylori</i> enfeksiyonunda mide patolojisine ve hastalık sonucuna katkıda bulunan faktörlerin şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.6 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin farklı boyama yöntemleriyle görüntülenmesi.....	21
Şekil 2.7 Klaritromisin ve metronidazolun Dünya çapında direnç oranları.....	22
Şekil 2.8 <i>Alpinia officinarum</i> un morfolojik özellikleri (A: Süs yaprakları ve çiçekleri, B: Rizomları.....	50
Şekil 2.9 Nanopartikül boyutu, şekli ve yüzey yüküne bağlı olarak akciğer, karaciğer, dalak ve böbrekteki biyo-dağılımı.....	55
Şekil 2.10 Standart tedavilerin konsantrasyon profili (kırmızı çizgi) ve zaman boyunca kontrollü salım (yeşil çizgi). ....	56
Şekil 2.11 Polikaprolaktonun yapısı.....	58
Şekil 4.1 <i>Helicobacter pylori</i> gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü (100X büyütme).....	80
Şekil 4.2 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin üreaz aktivitesi.....	81
Şekil 4.3 <i>Helicobacter pylori</i> 'nin katalaz aktivitesi.....	81
Şekil 4.4 Bitki ekstraktlarının inhibisyon zonları.....	82
Şekil 4.5 Bitki ekstraktlarının <i>H. pylori</i> üzerinde etkinliği (Disk difüzyon yöntemi).....	82
Şekil 4.6 2 saatlik inkübasyonun ardından gallik asitin farklı konsantrasyonlarının mavi renk şiddeti.....	83
Şekil 4.7 Gallik asitin standart grafiği.....	84
Şekil 4.8 2 saatlik inkübasyonun ardından <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktının farklı mavi renk şiddeti.....	83
Şekil 4.9 <i>Alpinia officinarum</i> un metanolik ekstraktının UV-Vis spektrumu.....	85
Şekil 4.10 Boş PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği.....	86
Şekil 4.11 Klaritromisin enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği.....	86

<b>Şekil 4.12</b> <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktı enkapsüle PCL Nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği.....	86
<b>Şekil 4.13</b> Klaritromisin ve <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktı enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut grafiği.....	87
<b>Şekil 4.14</b> Boş PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği.....	87
<b>Şekil 4.15</b> Klaritromisin enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği.....	88
<b>Şekil 4.16</b> <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktı enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği.....	88
<b>Şekil 4.17</b> Klaritromisin ve <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktı enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği.....	88
<b>Şekil 4.18</b> PCL-CLR nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (40.000X).....	89
<b>Şekil 4.19</b> PCL-CLR nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X).....	89
<b>Şekil 4.20</b> PCL-ALP nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X).....	90
<b>Şekil 4.21</b> PCL-ALP nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (160.000X).....	90
<b>Şekil 4.22</b> PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X).....	91
<b>Şekil 4.23</b> PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (160.000X) .....	91
<b>Şekil 4.24</b> Klaritromisinin FT-IR spektrumu.....	92
<b>Şekil 4.25</b> <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktının FT-IR spektrumu.....	93
<b>Şekil 4.26</b> Boş PCL nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu.....	93
<b>Şekil 4.27</b> PCL-CLR nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu.....	94
<b>Şekil 4.28</b> PCL-ALP nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu.....	95
<b>Şekil 4.29</b> PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu.....	96
<b>Şekil 4.30</b> Klaritromisin kalibrasyon grafiği.....	98
<b>Şekil 4.31</b> <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktının kalibrasyon eğrisi.....	98
<b>Şekil 4.32</b> Klaritromisin enkapsüle PCL nanopartiküllerinin salım grafiği.....	99
<b>Şekil 4.33</b> <i>Alpinia officinarum</i> enkapsüle PCL nanopartiküllerinin salım grafiği...100	
<b>Şekil 4.34</b> Klaritromisin ve <i>Alpinia officinarum</i> enkapsüle PCL nanopartiküllerinin salım grafiği.....	100
<b>Şekil 4.35</b> Klaritromisinin ATCC 700824 <i>Helicobacter pylori</i> suşu üzerinde makrodilüsyon analizi.....	101
<b>Şekil 4.36</b> <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktının ATCC 700824 <i>Helicobacter pylori</i> suşu üzerinde makrodilüsyon analizi.....	102

<b>Şekil 4.37</b> Klaritromisin ve <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktının minimum bakterisidal konsantrasyonunun analizi.....	102
<b>Şekil 4.38</b> PCL-CLR PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin antibakteriyel analizi (sıvı makrodilüsyon yöntemi).....	103
<b>Şekil 4.39</b> PCL-CLR nanopartiküllerinin <i>Helicobacter pylori</i> üzerinde etkinliği (gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü, A:1024 µg/mL, B:512 µg/mL).....	104
<b>Şekil 4.40</b> PCL-ALP nanopartiküllerinin <i>Helicobacter pylori</i> üzerinde etkinliği (gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü, A:1024 µg/mL, B:512 µg/mL).....	105
<b>Şekil 4.41</b> PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin <i>Helicobacter pylori</i> üzerinde etkinliği (gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü, A:1024 µg/mL, B:512 µg/mL).....	106
<b>Şekil 4.42</b> <i>H. pylori</i> kontrol grubunun gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü.	107
<b>Şekil 4.43</b> Klaritromisin <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktı, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin antibakteriyel etkinliği (Disk difüzyon yöntemi).....	108
<b>Şekil 4.44</b> Klaritromisin <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktı, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin oluşturduğu inhibisyon zonları.....	108
<b>Şekil 4.45</b> J774 Hücre kültürünün 7. gün morfolojik görüntüsü (10X).....	109
<b>Şekil 4.46</b> Klaritromisinin, <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin 48 saat inkübasyon sonunda J774 makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....	110
<b>Şekil 4.47</b> AGS Hücre kültürünün mikroskop görüntüleri (10X Büyütme).....	111
<b>Şekil 4.48</b> Klaritromisinin, <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin 48 saat inkübasyon sonunda AGS hücrelerinin canlılığına etkisi.....	112
<b>Şekil 4.49</b> PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin 1024 µg/mL konsantrasyonlarında oluşan formazan kristallerinin mikroskop görüntüsü (40x).....	113
<b>Şekil 4.50</b> Klaritromisinin, <i>Alpinia officinarum</i> ekstraktının ve PCL nanopartiküllerinin 1024µg/mL konsantrasyonlarında oluşan formazan kristallerinin mikroskop görüntüsü (40x).....	113
<b>Şekil 4.51</b> Kontrol grubunun formazan kristallerinin mikroskop görüntüsü (40x).....	114

## TABLO LİSTESİ

---

<b>Tablo 2.1</b> Hızlı üreaz ve üre nefes testlerinin karşılaştırılması.....	29
<b>Tablo 4.1</b> Polikaprolakton nanopartiküllerinin reaksiyon verimi.....	96
<b>Tablo 4.2</b> Polikaprolakton nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği.....	97



# **Klaritromisin ve *Alpinia Officinarum* Ekstraktı İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Etkinliklerinin *Helicobacter Pylori* ve Mide Kanseri Hücreleri Üzerinde In Vitro İncelenmesi**

Bükre KIRAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Dünya Sağlık Örgütü tarafından sınıf 1 karsinojen kabul edilen *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), Dünya nüfusunun yaklaşık %50'inde görülmekle birlikte ülser, mukozal atrofi, gastrik lenfoma ve gastrik karsinom gibi hastalıklara neden olmaktadır. *H. pylori*'nin mevcut tedavisinde klaritromisin, metronidazol ve levofloksasin gibi antibiyotikler ve proton pompa inhibitörleri kullanılmaktadır. Ancak, artan antibiyotik dirençliliği tedavide başarısızlığa neden olmaktadır. Son yıllarda, antibiyotik dirençliliğiyle mücadele edebilmek için nanoteknolojiye dayalı alternatif tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır. Biyouyumlu, biyobozunur ve non-toksik bir polimer olan polikaprolakton, terapötik bileşenlerin enkapsülasyonu ile oluşturulan nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. *Alpinia officinarum* ekstraktının antikanser ve antibakteriyel özelliklere sahip olduğu bilinmekle birlikte literatürde bu ekstraktın anti-helicobakteriyel etkinliğinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca, *Alpinia officinarum*'un polikaprolakton nanopartiküllerine tek başına ya da herhangi bir

antibiyotik ile enkapsülasyonu içeren herhangi bir çalışma da literatürde bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, *H. pylori*'nin birinci basamak tedavisinde kullanılan antibiyotiklerden biri olan klaritromisine karşı gelişen antibiyotik direncini azaltarak antibiyotiğin tedavideki etkinliğini artırmak amacıyla klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı yüklü polikaprolakton nanopartiküllerinin sentezi, karakterizasyonu, *Helicobacter pylori* üzerinde antibakteriyel ve *H. pylori*'nin de neden olduğu mide kanserine karşı ise antikanser etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, ekstrakt ve/veya klaritromisin polikaprolakton nanopartiküllerine kapsülünerek, SEM, FTIR, UV-VIS, DLS ile karakterizasyonu gerçekleştirildi. Nanopartiküllerin antibakteriyel aktiviteleri, ATCC 700824 *H. pylori* suşu, sitotoksik aktiviteleri J774 makrofaj hücreleri, antikanser etkinlikleri ise mide kanseri hücreleri (AGS ATCC CRL-1739) üzerinde in vitro incelendi. Makrodilüsyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar, klaritromisin ve ekstrakt içeren polikaprolakton nanopartiküllerinin tek başına ilaç veya ekstrakt içeren nanopartiküllere kıyasla daha fazla antibakteriyel etkinlik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, özellikle *Alpinia officinarum* ekstraktı içeren polikaprolakton nanopartiküllerinin mide kanseri hücrelerinin canlılığını büyük oranda azalttığı belirlenmiştir. Antibiyotik ve ekstrakt yüklü polikaprolakton nanopartiküllerinin anti-helicobakteriyel aktivitesinin yanı sıra mide kanseri hücreleri üzerinde göstermiş olduğu antikanserojen etkinlik *H. pylori* aracılı mide kanserinin tedavisinde ümit vericidir. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler ilaç ve ekstrakt yüklü polimerik nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin, ilaç dirençliliğinin giderilmesinde alternatif bir terapi olarak büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Alpinia officinarum*, *Helicobacter pylori*, nanopartikül, polikaprolakton

# **Synthesis, Characterization of Polycaprolactone Nanoparticles Containing Clarithromycin and *Alpinia Officinarum* Extract and Examination of Their Activities on *Helicobacter Pylori* and Stomach Cancer Cells In Vitro**

Bükre KIRAN

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Emrah Sefik ABAMOR

*Helicobacter pylori*, which is accepted as a class 1 carcinogen by the World Health Organization, is seen in approximately 50% of the world population, causes diseases such as mucosal atrophy, gastric lymphoma, and gastric carcinoma. Antibiotics such as clarithromycin, metronidazole are used in the current treatment of *H. pylori*. However, increasing antibiotic resistance causes treatment failure. For this reason, research has been conducted on alternative treatment approaches based on nanotechnology in recent years to combat antibiotic resistance. Polycaprolactone is used in the development of nanoparticle-based carrier systems by encapsulating therapeutic components thanks to its biocompatible, biodegradable, non-toxic properties. Although it is known that *Alpinia officinarum* extract has anticancer and antibacterial properties, there is no study investigating the anti-helicobacterial efficacy of this extract in the literature. At the same time, there were no studies in

the literature involving encapsulation in polycaprolactone nanoparticles of *Alpinia officinarum* alone or with any antibiotic. In this thesis study, antibiotic and extract loaded polycaprolactone nanoparticles were aimed to synthesized to reduce the antibiotic resistance developing against clarithromycin, one of the antibiotics used in the first-line treatment of *H. pylori*, and to increase the effectiveness of the antibiotic in treatment. *Alpinia officinarum* extract and/or clarithromycin were encapsulated in polycaprolactone nanoparticles and characterization of synthesized nanoparticles were performed by SEM, FTIR, UV-VIS, DLS analysis. In vitro antibacterial activities of the nanoparticles were investigated on ATCC 700824 *H. pylori* strain. Biocompatibility, cytotoxic and anticancer activity of nanoparticles were investigated on the J774 macrophage cell line and stomach cancer cell line (ATCC CRL-1739). The results obtained by the macrodilution method revealed that PCL nanoparticles containing the combination of clarithromycin and extract showed more antibacterial activity than nanoparticles containing drugs or extracts alone. On the other hand, it was revealed that PCL nanoparticles especially containing extract significantly reduced the viability of AGS gastric cancer cells. The data obtained within the scope of this thesis study show that drug and extract loaded polymeric nanoparticle carrier systems have a great potential as an alternative therapy in eliminating drug resistance.

**Keywords:** *Alpinia officinarum*, *Helicobacter pylori*, nanoparticle, polycaprolactone

### 1.1 Literatür Özeti

*Helicobacter pylori*, insanların mide mukozasında kolonize olan, gram negatif ve bulaşıcı bir mikroorganizmadır. *H. pylori* ile enfekte olmuş insanlarla ilgili mevcut tahmin, dünya nüfusunun yaklaşık 4,4 milyardır [1]. *H. pylori*'nin görülme sıklığı aynı ülke içinde farklı bölgelerde bile değişmekle birlikte Afrika'da %79,1, Latin Amerika ve Karayiplerde %63,4 ve Asya'da %54,72 olarak tespit edilmiştir [2]. Bakterinin neden olduğu enfeksiyon, kronik gastrit, peptik ülser ve mide kanseri gibi önemli gastrointestinal sistem hastalıklarına neden olmaktadır. Ayrıca Parkinson hastalığını tetiklediğinden veya kötüleştirdiğinden de şüphelenilmektedir [3]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *Helicobacter pylori*'nin Parkinson hastalığıyla ilişkisine benzer birçok nörolojik, dermatolojik, hematolojik, kardiyovasküler, metabolik, alerjik hastalıkların patojenik mekanizmalarında bakterinin potansiyel bir rolü olduğu klinik ektragastrik bulgulara da dayanarak ileri sürülmektedir [4]. *H. pylori* pozitif bireylerin %15-20'sinde enfeksiyon ile ilişkili hastalıklar gelişmesine rağmen enfekte kişilerin çoğu asemptomatiktir [5]. *H. pylori* enfeksiyonunun tedavi edilmesi, mukoza ile ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfomasının gerilemesine neden olmaktadır ve son zamanlarda mide kanserinin tedavisi için önleyici bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir [6]. Ayrıca, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu gastrik adenokarsinom için bilinen en güçlü risk faktörüdür [7].

*H. pylori*'nin mevcut tedavisi amoksisilin, klaritromisin, metronidazol ve levofloksasin gibi antimikrobiyal ajanların ve proton pompası inhibitörleri gibi antisekretuar ajanların kombinasyonuna dayanmaktadır [8]. Konvansiyonel antibiyotikler ve proton pompa inhibitörleri kullanılarak optimal tedaviler sağlamak için bir dizi terapötik rejimi özetleyen birçok kılavuz oluşturulmuştur [6]. Bu antibiyotik rejimleri arasında klaritromisin bazlı üçlü tedavi, bizmut bazlı dördümlü terapi, eşzamanlı terapi, ardışık terapi ve levofloksasin bazlı ikincil tedaviler yer

almaktadır. Bununla birlikte, ideal tek bir terapi yönteminin olmaması, *H. pylori* ile mücadelede büyük bir sorun oluşturmaktadır. Enfeksiyonla savaşmak için uygulanan birçok antibiyotiğin yanı sıra, antimikrobiyal dirençliliğin hızla artışı da *H. pylori*'nin ortadan kaldırılmasını engellemektedir.

Hasta uyumu ve diğer çevresel faktörler kısmen dahil olsa da *H. pylori*'nin tedavisindeki başarısızlıklar esas olarak antibiyotik dirençliliğine dayanmaktadır. *H. pylori* suşları arasında antibiyotik direnci, prevalansı farklı coğrafi bölgelerde değişiklik göstermektedir [9]. Amoksisilin ve tetrasikline karşı dirençlilik çoğu ülkede tedavide kullanılan diğer antibiyotiklere kıyasla daha düşük olmakla birlikte amoksisilin ve tetrasiklinin tedavide tek başına kullanımlarının etkili olmadığı bilinmektedir [10]. Bu nedenle, *H. pylori*'ye yönelik tedavide klaritromisin, metronidazol ve levofloksasin dirençliliği *H. pylori*'yi ortadan kaldırmak için kritik öneme sahiptir. *H. pylori*'nin klaritromisine direnci Asya'da %85,5; Avrupa'da %72,4; Amerika'da %70,6; Afrika'da %29; ve Okyanusya'da %9 İran'da  $\geq$ %10, Türkiye'de ise  $\geq$ %20 olarak bildirilmiştir [11]. Metronidazole yönelik direnç standart üçlü rejimin tedavi etkinliğini de önemli ölçüde azaltması sebebiyle önemlidir. Metronidazol dirençliliği birçok Avrupa ülkesinde artmakta ve Avrupa'da direnç %14 ila %33 arasında değişmektedir [12]. Kocazeybek ve ark. Türkiye'deki birincil *H. pylori* antimikrobiyal direnç oranlarının klaritromisin için %24,86; metronidazol için %33,75; levofloksasin için %23,77; amoksisilin için %0,97 ve tetrasiklin için %3,51 olduğunu belirtmişlerdir [13]. Meta analizlerle birlikte en son dünya çapındaki raporlar, *H. pylori* enfeksiyonunu tedavi etmek için mevcut olan antibiyotiklerin etkinliğinin önemli ölçüde azaldığını göstermektedir. Ayrıca, çoklu ilaca dirençli *H. pylori* suşlarının ortaya çıkması da tedavideki başarısızlığı arttırmaktadır.

*H. pylori*'ye karşı tedavi rejimlerinin nihai hedefi, mevcut tedavi yöntemleriyle mümkün olmayan %90'dan fazla inhibe edici oranlara sahip olmaktır. Ancak artan antibiyotik dirençliliği *H. pylori*'nin tedavisindeki her geçen gün başarı oranlarını düşürmektedir. Bu nedenle araştırmacılar nanopartiküler yaklaşımlar gibi alternatif tedavi yöntemleriyle ilgilenmektedir. Nanopartiküller, biyoyumlu, biyobozunur, non-toksik ve immünojenik olmamakla vücudun çeşitli bölgelerine ve aynı zamanda

uzun süreli ilaç sunma kabiliyetine sahiptir [14]. Nanopartiküller ile transdermal, inhalasyon, intravenöz ve oral gibi çeşitli yollarla ilaç taşınımı yapılabilmektedir. Oral yolla ilaç uygulamasında nanopartiküllerin kullanımı, terapötik bileşenlerin gastrointestinal sistemdeki enzimlerden korunarak biyoaktivitesinin artmasını sağlamaktadır [15].

Polimerik nanopartiküllerin, yüksek endositoz yeteneği, ilaçların ve diğer terapötik ajanları yüksek kapsülleme kapasitesi ve aktif veya pasif hedeflendirilebilmesi sayesinde tedavi edici bileşenlerin kontrollü salımı için sıklıkla tercih edilmektedir [16, 17]. *H. pylori*'nin tedavisinde kitosan, gliadin ve PLGA gibi polimerik nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı olarak tedavide etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur [18-20].

Günümüzde *H. pylori* enfeksiyonu dahil olmak üzere birçok enfeksiyon, kanser vb. hastalıklar için bitkisel ekstraktlarının veya bileşiklerinin etkinliğinin incelendiği birçok çalışma yapılmaktadır [21]. Bitkisel ekstrakt ve yağlarda bulunan fenolikler, polifenoller, flavonoidler, kinonlar, kumarinler, terpenoidler, alkaloidler gibi metabolitlerin antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır [22]. *Alpinia officinarum* (havlıcan) bitkisi uçucu yağlar, flavonoidler, diarilheptanoidler, fenilpropanoidler, glikozitler, flavonoidler ve flavonoid aglikonları gibi birçok biyoaktif bileşenlere sahiptir [23]. Diarilheptanoidler ise antiinflamatuvar, antitümör, antikanserojen, antiviral, antiemetik ve anti-*H. pylori* etkileri dahil olmak üzere birçok fizyolojik fonksiyona sahip havlıcanın ana karakteristik bileşenlerinden biridir [24]. Haeng-Byung Lee ve ark. *A. officinarum*dan izole edilen bileşen diarylheptanoid 5-hidroksi-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-3-heptanon izolasyonunu gerçekleştirerek anti-Helicobacteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir [25]. Ancak, *Alpinia officinarum* ekstraktının *H. pylori*'nin inhibe edilmesinde etkinliğinin incelendiği herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Çalışmamıza kadar *Alpinia officinarum* ekstraktı tek başına veya herhangi bir antibiyotik ile polimerik nanopartiküllere enkapsüle edilerek antibakteriyel ve antikanserojen etkinliği incelenmemiştir.

## 1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacını; *Helicobacter pylori* tedavisinde kullanılan klaritromisin antibiyotiği ile diarylheptanoid ve flavonoid gibi sahip olduğu metabolik bileşenlerinin antibakteriyel etkinliği bilinen *Alpinia officinarum* ekstraktının tek başlarına ve birlikte kombinasyon halinde polikaprolakton polimerine enkapsüle edilmesiyle geliştirilen nano-formülasyonların *H. pylori* bakterileri üzerindeki in vitro antibakteriyel etkinliklerinin incelenmesi oluşturmaktadır. Aynı zamanda bu tez çalışması kapsamında sentezlenen ilaç ve ekstrakt yüklü nanopartiküllerin *H. pylori*'nin de neden olduğu gastrik mide kanseri hücreleri üzerindeki in vitro antikanser ve makrofaj hücreleri üzerinde ise sitotoksik etkinliklerinin incelenmesi de amaçlanmıştır. Bu tez çalışması ile *H. pylori*'nin tedavisinde sıklıkla kullanılan ancak son yıllarda bakteriler tarafından kendisine karşı gelişen direnç hızlı bir şekilde artan klaritromisinin etkinliğinin artırılması için bitkisel ekstrakt içeren, nanoteknolojiye dayalı yeni bir yaklaşımın geliştirilmesi ve *H. pylori* enfeksiyonuna bağlı gelişen mide kanseri için de antikanser etkinliğe sahip yeni bir tedavi yönteminin önerilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaca ulaşmak için aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirildi.

- *Alpinia officinarum* bitkisinin metanolik ekstraktı elde edildi ve karakterizasyonu gerçekleştirildi.
- Klaritromisin içeren PCL-CLR, *Alpinia officinarum* ekstraktı yüklü PCL-ALP, klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL-CLR-ALP ve boş PCL nanopartikülleri çözücü buharlaştırma yöntemiyle sentezlendi.
- PCL-CLR, PCL-ALP, PCL-CLR-ALP ve boş PCL nanopartiküllerinin Zeta sizer ile boyut ve zeta potansiyeli ölçümü, SEM ile görüntülenmesi, FT-IR ile enkapsülasyon veriminin tayini, UV spektrofotometre ile de salım analizi gerçekleştirilerek formülasyonlar karakterize edildi.
- Klaritromisinin, *Alpinia officinarum* Ekstraktının, PCL-CLR, PCL-ALP, PCL-CLR-ALP ve PCL nanopartiküllerinin antibakteriyel etkinlikleri ATCC 700824 *H. pylori* suşunda sıvı makrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle incelendi.

- Klaritromisin, *Alpinia officinarum* Ekstraktının, PCL-CLR, PCL-ALP, PCL-CLR-ALP ve PCL nanopartiküllerinin sitotoksitesiteleri j774 makrofaj ve antikanser aktiviteleri ATCC CRL-1739 AGS mide kanseri hücre hatlarında MTT yöntemi ile belirlendi.

### 1.3 Hipotez

*Helicobacter pylori* enfeksiyonunun mevcut tedavisinde klaritromisin, metronidazol, amoksisilin ve tetrasiklin sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak özellikle artan antibiyotik dirençliğine bağlı olarak literatürde alternatif tedavi yaklaşımlarını içeren çalışmalara rastlanmaktadır. Günümüze kadar pek çok bitkisel bileşimin *H. pylori*'nin eradikasyonunda antibiyotiklere alternatif olarak, in vitro çalışmalarda incelendiği bilinmektedir. *Alpinia officinarum* bitkisinin rizomlarından izole edilen ekstraktın da antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Buna rağmen ismi geçen bitkiden elde edilen ekstraktların *H. pylori* bakterileri üzerindeki antibakteriyel etkinlikleri şu ana kadar incelenmemiştir. İlaç dirençliliğinin azaltılabilmesi için uygulanan alternatif yaklaşımlardan bir diğeri ise nanoteknolojik yaklaşımlardır. Literatürde, antibiyotikler ve bitkisel ekstraktların farklı türden nanopartiküllerin içine enkapsüle edilmesiyle sentezlenen formülasyonların *H. pylori*'ye karşı etkinliklerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur. Biyouyumlu, biyobozunur ve non-toksik bir polimer olan polikaprolakton da son yıllarda terapötik bileşenlerin hedef dokulara taşındığı nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasının hipotezini;

- Literatürdeki çalışmalarda *Alpinia officinarum* bitkisinin antibakteriyel etkinliğinin belirtilmiş olması,
- Polikaprolakton polimerinin ilaç ve bitkisel ajanların enkapsüle edilmesinde kullanılması,
- Polikaprolakton nanopartiküllerinin biyouyumlu, biyobozunur ve düşük toksisiteye sahip olduğunun daha önceki çalışmalarda gösterilmesi,
- Klaritromisin antibiyotiğine karşı dirençliliğin her geçen gün arttığı ve *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisindeki başarı oranlarının düştüğünün bilinmesi,

- Literatürde *Alpinia officinarum* ekstraktının anti-helicobakteriyel etkinliğinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olması,
- Aynı zamanda *Alpinia officinarum* ekstraktının tek başına veya antibiyotik ile polikaprolakton nanopartikülleri içerisine enkapsülasyonunun gerçekleştirilmemiş olması ve *H. pylori* üzerinde antibakteriyel etkinliklerinin incelenmemiş olması oluşturmaktadır.

Literatürdeki çalışmalardan farklı olarak bu tez kapsamında, *H. pylori*'nin birinci basamak tedavisinde kullanılan antibiyotiklerden biri olan klaritromisin ve antibakteriyel etkinliği bilinen *Alpinia officinarum* ekstraktının tek başına ve kombinasyon halinde PCL nanopartiküllerine enkapsülasyonu, sentezlenen nanopartiküllerin farklı yöntemlerle karakterizasyonu, non-toksik olduğu belirlenen konsantrasyonlarının *H. pylori* kültüründeki antibakteriyel etkinliklerinin, AGS mide kanser hücre hatlarında ise in vitro antikanser etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi hedeflenmiştir.

### 2.1 *Helicobacter pylori* Tarihçesi

*H. pylori*, Dünyadaki çoğu popülasyonu etkileyen insanlarda yaygın olarak görülen bakteriyel enfeksiyona neden olan mikroorganizmalardan biridir. Bakterinin adlandırması yakın zamanda yapılmış olsa da yapılan araştırmalar *Helicobacter pylori*'nin uzun yıllardır insan midesinde kolonize olduğunu göstermektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda enfeksiyon bölgesinde, mumyalanmış mide dokularında ve bağırsak içeriğinde antik *H. pylori* biyomoleküllerinin varlığı tespit edilmiştir [26]. Eski insan kalıntılarında *H. pylori* ile ilgili en kapsamlı çalışma "Ötzi" olarak anılan Iceman'ın 5300 yaşındaki *H. pylori* genomunun rekonstrüksiyonu ve analizidir. Bu çalışmaların sonucunda Iceman'ın mide dokusunda *H. pylori* DNA izlerini taşıdığı belirlenmiştir [26, 27].

*H. pylori*'nin keşfi, insan ve hayvanların mide mukozasındaki spiral mikroorganizmaların basit histolojik gözlemleri sayesinde gerçekleştirilmiştir [28]. Spiral şekilli mikroorganizmaların insan midesindeki varlığı, yaklaşık 100 yıl önce Polonyalı klinik araştırmacı, Cracow Jagiellonian Üniversitesi'nden Profesör W. Jaworski tarafından açıklandı. Varlıkları daha sonra hayvanlarda G.Bizzazero tarafından da doğrulandı. 1979'da Warren tarafından iltihaplı mide epitelinde ve peptik ülser ile ilişkili gastritte daha sonra *Helicobacter pylori* olarak adlandırılacak bakteriyi keşfettiğini duyurdu. Aynı yıllarda Marshall da biyopsi örnekleri ile bu bakteri hakkındaki araştırmalarını sürdürmekteydi. Bakterinin ilk kültürü ise 1982 yılında Marshall ve Warren tarafından gerçekleştirildi [29]. Keşfedilen mikroorganizma benzerlikten dolayı öncelikle *Campylobacter* benzeri olarak adlandırıldı [30]. Bakterinin adı 1984 yılında *Campylobacter pyloridis* olarak belirlenmiştir [31]. Daha sonra Marshall ve Goodwin tarafından bakterinin adının *Campylobacter pylori* olması uygun görülmüştür. 1989 yılında ise *Campylobacter* cinsi olmaktan tamamen çıkarıldı. Üreaza sahip olması ve midenin pilor bölgesinde

kolonize olması sebebiyle Goodwin ve ark. tarafından *Helicobacter pylori* olarak yeniden adlandırıldı [32].

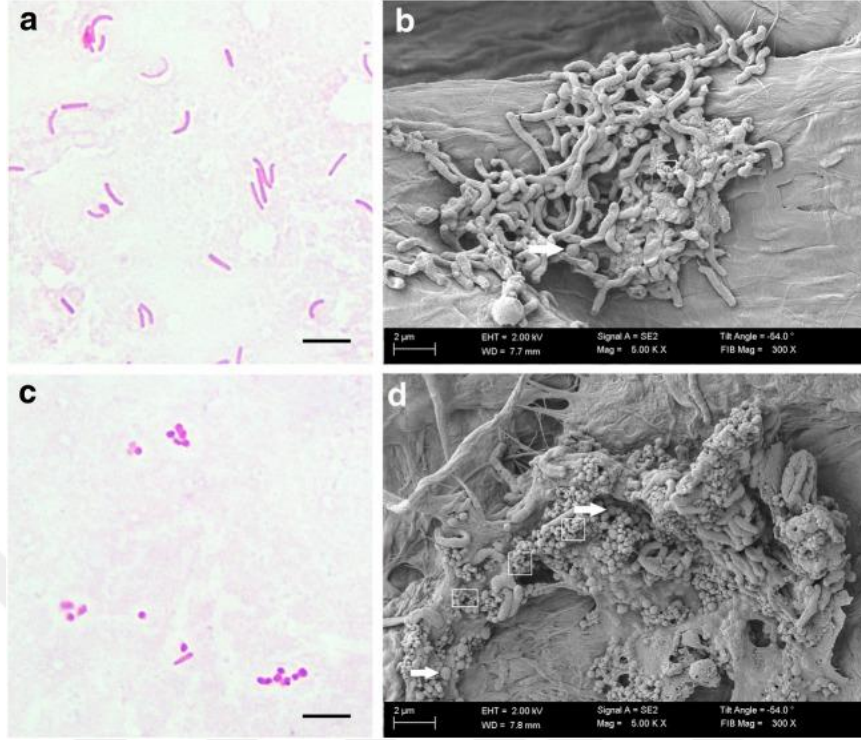
Marshall ve Warren'ın çalışmalarına dayanarak, *Helicobacter*'in midede mukoza ile ilişkili lenfoit doku lenfomalarının ana nedeni olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca 1994 yılında *H. pylori* Dünya Sağlık Örgütü tarafından tip I kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. 3 Ekim 2005 tarihinde ise J. Robin Warren ve Barry J. Marshall, *Helicobacter pylori* bakterisi ve gastrit ve peptik ülser hastalığı ile ilgili çalışmalarını için Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'ne layık görülmüştür [33].

*Helicobacter pylori*'nin tanımlanmasının ardından neden olduğu enfeksiyon ile ilişkili hastalıkların araştırılmasına yönelik çalışmalara önem verilmiştir. 2005 yılında Marshall ve Warren'ın Nobel ödülü kazanması ile de *H. pylori* yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Günümüze kadar *H. pylori*'nin kanser, fonksiyonel dispepsi ve immünojenik trombositopenik purpura, genel ürtiker gibi çeşitli immünolojik bozukluklar ve peptik ülser hastalığı ile olan ilişkisine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiş ve bu ve diğer hastalıklarla ilişkisine yönelik çalışmalar da gerçekleştirilmektedir [33].

## **2.2 *Helicobacter pylori*'nin Morfolojisi**

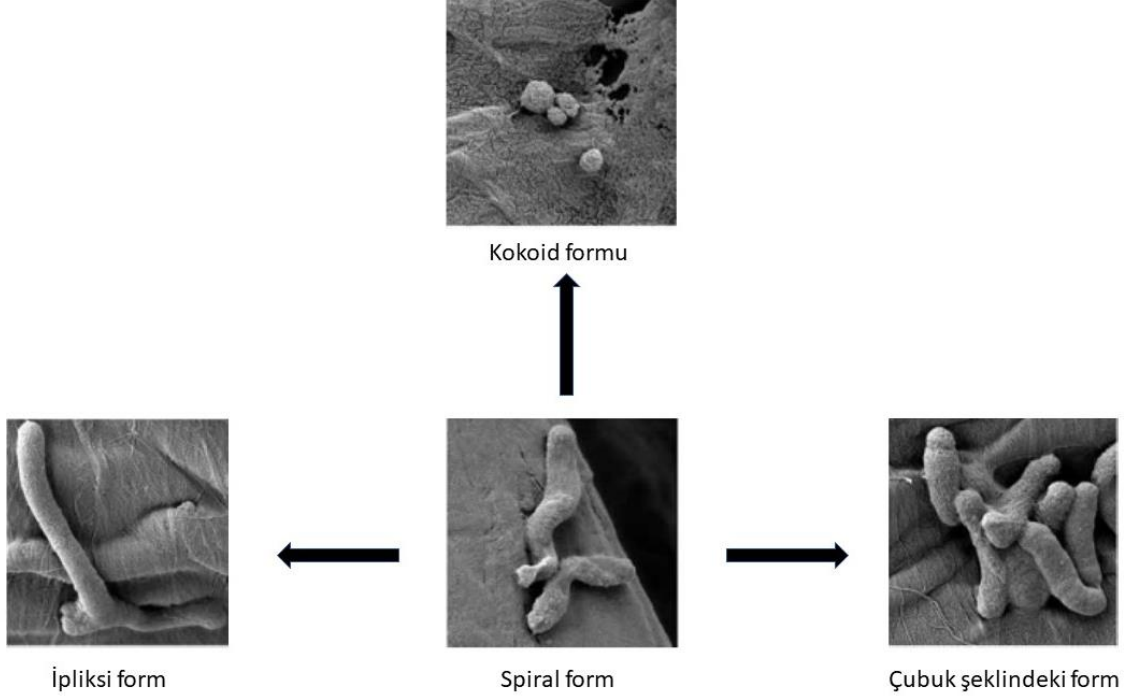
*Helicobacter pylori*; normal şartlar altında spiral şekilli, gram negatif ve mikroaerofilik bir bakteridir [34]. Yaklaşık 0,6 x 3,5 mikron büyüklüğünde ve flagellaları sayesinde oldukça hareketli bir patojendir [35]. Gastrointestinal patojen olan *H. pylori* konakçı içerisindeki doğal şartlarda spiral şekilde olsa da zararlı oksijen, alkali pH ve besin tükenmesi gibi çevresel streslere maruz kaldığında kokoid forma (Şekil 2.1) dönüştüğü de bilinmektedir [36]. *H. pylori*'nin kokoid formunda, DNA ve ATP sentezi için DNA ve 16S rRNA'nın yapısını korunduğu ve belirli proteinleri sentezinin yapılabildiği bilinmektedir [37]. Spiral formlara kıyasla kokoid formlar azalmış patojenite göstermektedirler. Kokoid formlu *H. pylori* spiral formlular ile bir arada bulunabilmektedir. Ayrıca mide mukozasının sadece kokoid form ile kolonize olduğunu gösteren raporlar da literatürde mevcuttur [38]. Bunun yanı sıra ağız boşluğunda çoğunlukla *H. pylori*'nin kokoid formunda bulunduğu bildirilmiştir [39]. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda kokoidlerin in vivo olarak kokoid formdan spiral forma dönebileceği de gösterilmiştir [40]. Ayrıca, *H.*

*pylori*'nin bu formu canlı fakat kültüre edilemez (viable but non-culturable) olarak da sınıflandırılmaktadır [36].



**Şekil 2.1** J99 *H. pylori* suşunun ışık mikroskobu ve SEM görüntüleri [41]

*H. pylori*'nin spiral ve kokoid formlarına ek olarak çubuk ve ipliksi formları da bulunmaktadır (Şekil 2.2). Çubuk formlarına dönüşümü etkileyen çevresel koşullar hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır. Özellikle *in vitro* kültürlerde uzun süreli pasaj sırasında görüldüğü bilinmektedir [42]. *H. pylori*'nin ipliksi filamentler şeklinde bir formu da bulunmaktadır. Mikroorganizmaların filament formlarının mukozal yüzeylere tutunmada rol oynadığı ve hücre uzunluğunu arttırarak fagositozdan kaçabildiği bilinmektedir [43]. *H. pylori*'nin filamentleşmesi ile göç etme ve kolonize olma yeteneğinin azaldığı bildirilmiştir [44]. Ayrıca, *H. pylori*'nin azitromisine maruz kalması, hiperosmotik ortamda veya CO<sub>2</sub> içermeyen aerobik ortamda bulunması ve saf suda inkübe edilmesi durumunda filamentler şeklinde ipliksi yapılar oluşturduğu bilinmektedir [42].

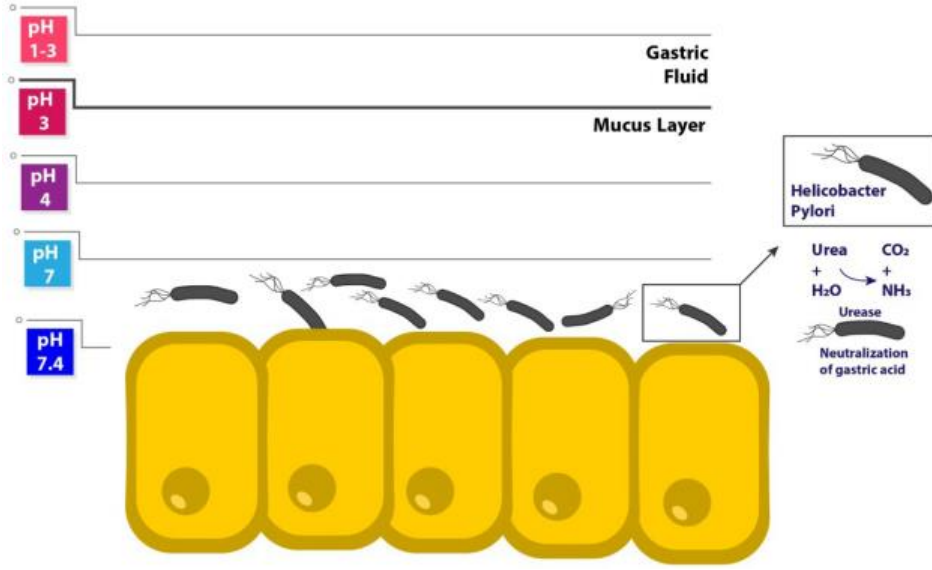


Şekil 2.2 *Helicobacter pylori*'nin farklı formlarının SEM görüntüsü [42]

## 2.3 *Helicobacter pylori*'nin Patogenezi

### 2.3.1 Gastrik Ortamda Kolonizasyonu

*H. pylori*'nin kolonizasyonu, üreaz, motilite, kemotaksi, adhezinler ve bakterinin özel sarmal morfolojisi gibi faktörlerine bağlıdır [45]. *H. pylori* belirtilen faktörlere sahip olması sebebi ile asidik ortamlara karşı dayanıklıdır. Ancak *H. pylori*'nin kolonizasyonu için optimal pH nötrdür [46]. *H. pylori*'nin sahip olduğu üreaz, üreyi  $\text{NH}_3$  ve  $\text{CO}_2$ 'ye hidrolize ederek mide asidinin nötralizasyonunu sağlar. Bu durum, bakterilerin çevresinde bulunan hücrelerin pH'ını artırır ve bakterilerin çoğalması için uygun ortam oluşturur [9](Şekil 2.3). Ayrıca üreaz, gastrik epitel hücreler üzerinde bulunan CD74 reseptörü ile etkileşime girerek inflamatuvar reaksiyonlara katılarak adezyonda da rol alır [45].

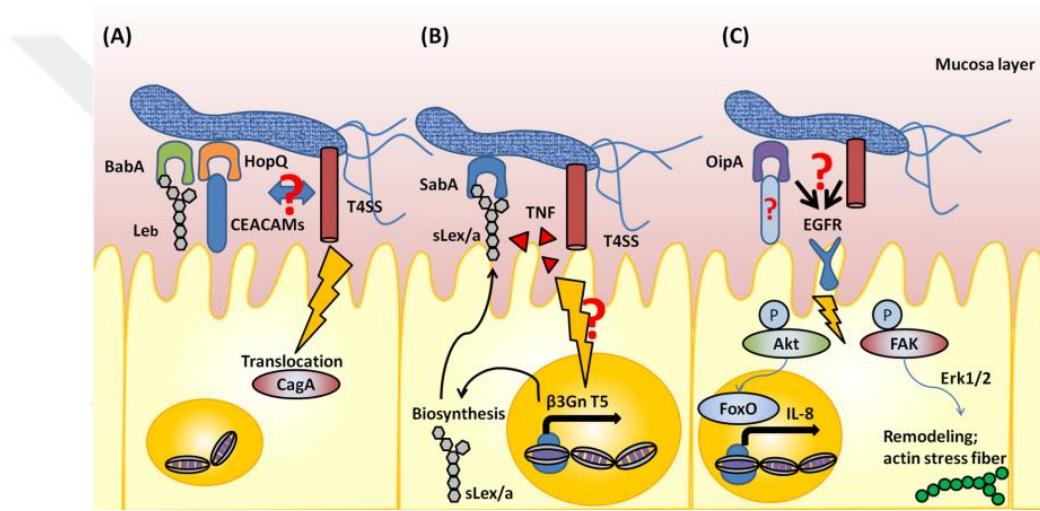


Şekil 2.3 *Helicobacter pylori*'nin gastrik ortamda kolonizasyonu [9]

*H. pylori*'nin kolonizasyonunda motilite oldukça önemli bir faktördür. Motiliteyi *H. pylori*'nin sahip olduğu flagellalar ve kemotaksi sağlamaktadır. Flagellalar, sıvı ortamdaki "yüzme hareketliliği", yumuşak agarda "yayıma hareketliliği" ve yarı katı yüzeyde "kayma hareketliliği" gibi farklı hareketlilik türlerine sahiptir [45]. Flagella, çoğunlukla FlaA ve FlaB flagellinlerinden oluşur. Bu flagellinleri kodlayan her iki gen de *H. pylori*'nin tam motilitesi için gereklidir. Ayrıca flagellanın kılıfının onları midede asidik ortamdan koruduğuna yönelik bilgiler literatürde mevcuttur [47]. *Helicobacter pylori*'nin kemotaksisi için dört kemoreseptör (TlpA, B, C, D), CheA kinaz, CheY'ye duyarlı regülatör ve çoklu birleştirme proteinleri görevlidir [48]. 1 ila 6 arasında değişen sayıda bulunan polar flagellalar ve çoklu kemotaksi reseptörlerinin aracılık ettiği yönlü hareketlilik *Helicobacter pylori*'nin kolonizasyonunda rol oynamaktadır [49].

*Helicobacter pylori*'nin spiral yapısı çoğaldığı kalın mide mukusunun içerisine nüfuz etmesini kolaylaştırmaktadır. Laura K.Sycuro ve arkadaşları tarafından sarmal şekil için gerekli olan üç LytM peptidoglikan endopeptidaz homoloğu (csd1-3) ve bir ccmA homoloğundan oluşan dört gen belirlenmiştir [49]. *H. pylori*'nin şekli ve motilitesi mide mukozasını kolonize edebilen tek bakteri olmasının başlıca nedenleri olarak gösterilebilir.

*H. pylori* mûsin tabakasına nûfuz ettiğinde, spesifik adezinlerle gastrik epitel hücrelerine tutunur. Üreaz aktivitesi sebebiyle en yüksek üre ve bikarbonat konsantrasyonlarının bulunduğu bölgelere doğru hareket eder. Ayrıca, suşa da bağı olarak mûsin içinde bulunan siyalik aside yönelme eğilimindedir. Yöneldiği bölgelere tutunmak için özelleşmiş HpaA, Nap, SapA gibi tanımlanmış yaklaşık 20 adezin mevcuttur. Örneğin, BabA adezini Mûsin MUC5AC içindeki Lewis B (LeB) antijenine bağlanmayı sağlamaktadır [47]. Dış zar proteinleri (OMP'ler) olan adezinler de gastrik epitel hücrelere tutunmada oldukça önemlidir. Bazı OMP'lerin adezyondaki moleküler etkileşimi yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Şekil 2.4'de 3 OMP'nin patogenezdaki rolleri açıklanmıştır [50].



Şekil 2.4 Dış membran proteinleri aracılı patogenezin gösterimi [50]

## 2.4 *Helicobacter pylori*'nin Virülans Faktörleri

Doğrudan hücre hasarına neden olan en iyi karakterize edilmiş *H. pylori* virülans faktörleri arasında, sitotoksin ilişkili gen A (CagA), cag patojenite adası (Cag PAI), tip IV sekresyon sistemi (T4SS), Vakuol oluşturucu sitotoksin A (VacA),  $\gamma$ -glutamil transpeptidaz (GGT), kolesterol glikosil-transferaz (CGT) ve serin proteaz yüksek sıcaklık gereksinimi A (HtrA, serin proteaz) bulunmaktadır [51].

### Sitotoksin İlişkili Gen A

120 ila 145 kDa ağırlığında bir protein olan CagA, tip IV salgılama sistemini (T4SS) kodlayan 40 kb'lik bir lokus (31 gen içeren) olan cag patojenisite adasında kodlanmaktadır [22]. CagA proteininin C-terminal bulunan dört ayrı aminoasitten

oluşan glutamat-prolin-izolösin-tirosin-alanin (EPIYA) motifleri, konak hücre içerisinde Abl kinaz veya Src familyasının kinazları tarafından fosforile edilebilerek hücrede morfolojik değişikliklere neden olmaktadır. Ayrıca CagA fosforile edilmeden de doğrudan, hücresel sıkı bağlantıyı, hücresel polariteyi, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını, enflamatuar yanıtın indüklenmesini ve hücresel uzamayı etkilemektedir [52]. CagA pozitif suşları ile enfekte olan hastalarda daha yüksek oranda peptik ülser ve mide kanseri görüldüğü bilinmektedir. In vivo olarak yapılan çalışmalarda da cagA'nın hastalık ilerlemesi ve gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Klinik olarak, cagA-pozitif *H. pylori* suşu ile enfeksiyon, yüksek dereceli gastrik mukozal inflamasyonun yanı sıra ciddi atrofik gastrit ile ilişkilendirilmiştir ve gastrik karsinom gelişiminde önemli bir rol oynadığı da bildirilmiştir [22, 52].

### **Vakuol Oluşturucu Sitotoksin A**

VacA en çok incelenen ikinci *H. pylori* virülans faktörüdür. Vakuolizasyonu indüklemesinin yanı sıra membran-kanal oluşumu, apoptoza yol açan mitokondrilerden sitokrom c salımı, hücre-membran reseptörlerine bağlanma ve ardından bir proenflamatuar yanıtın başlatılması dahil olmak üzere birçok hücresel aktiviteye neden olmaktadır. Ayrıca T-hücresi aktivasyonunu ve proliferasyonunu spesifik olarak inhibe ettiği de bilinmektedir [53].

### **$\gamma$ -Glutamil Transpeptidaz**

Gama-glutamil transpeptidaz (GGT), glutamini glutamat ve amonyağa dönüştüren ve aynı zamanda glutatyonu glutamat ve sisteinil-glisine dönüştüren bakteriyel virülans faktörüdür. *H. pylori* GGT'nin ürünleri reaktif oksijen türleri oluşumuna neden olarak gastrik epitel hücrelerinde hücre döngüsünün durmasını, apoptoza ve nekrozu indükler. *H. pylori* GGT, apoptoza inhibe edebilir ve siklooksijenaz-2, epidermal büyüme faktörü ile ilişkili peptitler, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve interlökin-8 indüksiyonu yoluyla gastrik epitelyal hücre proliferasyonunu da indükleyebilir [7, 54]. Ayrıca, T hücresi aracılı bağışıklığın ve dendritik hücre farklılaşmasının inhibisyonuna neden olarak bağışıklık toleransı sağlayabilmektedir [55].

## **Kolesterol- $\alpha$ -Glikosil-Transferaz**

*H. pylori*, enfeksiyon sırasında, kolesterol gradyanına doğru göç ederek glikosile ve glikosile edilmemiş kolesterolü bakteriyel membrana dahil etmek için gastrik epitelyal hücre zarlarından etkili bir şekilde kolesterolü çıkarmaktadır. Kolesterol- $\alpha$ -glukozil-transferaz (CGT) enzimi hp0421 geni tarafından kodlanır ve CGT'nin ekspresyonu, konakçı zarların kolesterol tükenmesi ile ilişkilidir ve bu da lipit sallarının ciddi şekilde tahrip olmasına neden olmaktadır [51, 56]. Kolesterol-glikozitler, *H. pylori*'nin antijen sunan hücreler tarafından alınmasını engellemektedir. CGT enzimi bu sayede bakterinin bağışıklık sisteminden kaçışında ve kalıcı enfeksiyonları teşvik ederek gastrik karsinogeneze katkıda bulunan *H. pylori* virülans faktörüdür [51].

## **Serin Proteaz HtrA**

Birkaç yıl önce tanımlanan serin proteaz yüksek sıcaklık gereksinimi A (HtrA) proteini *H. pylori* enfeksiyonunda önemli rol oynayan bir virülans faktörüdür. Birçok bakteri tarafından kodlandığı bilinen HtrA homologlarının, hepsi protein-protein etkileşimi için tripsin benzeri proteaz alanı ve bir veya iki karboksi terminal PDZ- alanı, bazıları ise periplazmada lokalizasyonlarına yardımcı olan bir amino terminal sinyal peptidi içermektedir. *H. pylori* suşlarında, periplazmalarda bir şaperon işlevi gören ve bakterilerin stres durumlarının üstesinden gelmesine yardımcı olan tek bir HtrA homoloğu içerdiği belirlenmiştir. Serin proteaz HtrA, hücre dışı boşluğa salgılanmakta ve hücre-hücre yapıştırıcı bağlantı proteini E-cadherin, sıkı bağlantı proteinleri occludin ve claudin-8, ekstraselüler matriks proteini fibronektini etkileyerek bağlantılara zarar vermektedir. Bu sayede, *H. pylori*'nin epitelyumun bazolateral tarafına girmesi için paraselüler yol yoluyla göç etmesini sağlanmaktadır. Bu durum T4SS ve integrin reseptörleri yoluyla CagA'yı konakçı hücreye enjekte edilmesinde de rol oynamaktadır [57, 58].

## **2.5 *Helicobacter pylori*'nin Kültür ve Üreme Özellikleri**

*H. pylori*, insan mide biyopsi örneklerinden izole edilebilmekte ve çeşitli yaklaşımlar kullanılarak in vitro olarak çoğaltılabilmektedir. *H. pylori*'nin in vitro kültürü, at kanı veya koyun kanı (% 5-10) ilave edilerek hazırlanan Brucella agar, Columbia

agar, beyin-kalp infüzyon agar veya Tryptic Soy agar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Kan yerine  $\beta$ -siklodekstrin veya yumurta sarısı emülsiyon ortamı da kullanılan çalışmalar mevcuttur [59]. Katı kültür ortamında 3-7 gün 37°C sıcaklıkta mikroaerofilik koşullar altında (%85 N<sub>2</sub>, %10 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub>) nemli ortamda inkübasyonun ardından, yuvarlak, şeffaf ve pürüzsüz *H. pylori* kolonileri gözlemlenebilmektedir [60]. Katı kültür ortamlarının dışında sıvı in vitro kültürü de gerçekleştirilmektedir. *H. pylori*'nin sıvı kültüründe genellikle fetal bovine serum (%5-10) içeren Brucella Broth kullanılmaktadır [34].

Mikroaerofilik bir bakteri olan *H. pylori* inkübasyon sırasında %5-10 CO<sub>2</sub>, 37°C sıcaklık ve nemli bir ortam gerektirmektedir. Yüksek CO<sub>2</sub> gereksiniminin birçok faktörle ilişkili olduğu düşünülmektedir. CO<sub>2</sub> fiksasyonu ile piruvat üretimi karbon asimilasyonu için bir yol sağlayabilir. Ayrıca, *H. pylori* karbonik anhidraz CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dönüşümünü katalize ettiğinden, CO<sub>2</sub> pH homeostazında rol oynayabilir [34]. *H. pylori* oksijene duyarlı bir mikroaerofildir ve gastrik biyopsi örneklerinden *H. pylori* kültürlenirken mikroaerobik koşullar oldukça önemlidir. Ancak 2006 yılında yapılan bir çalışmada *H. pylori*'nin, yüksek hücre yoğunluklarının bulunduğu laboratuvar koşullarında %5 ila 21 arasında değişen oksijen konsantrasyonları ile in vitro atmosferlerde büyüebildiği de gösterilmiştir [61]. Aynı zamanda, çeşitli oksijen atmosferleri altında *H. pylori* büyümesinden kaynaklanan fizyolojik farklılıklar tam olarak anlaşılammıştır. Hemolizin üretimi, metronidazol direnci, ferredoksin oksidoredüktaz aktivitesi ve bakterilerin epitel hücrelerinde değişiklik meydana getirme kabiliyeti dahil olmak üzere *H. pylori*'nin çeşitli özelliklerinin, bakterilerin mikroaerobik veya aerobik koşullarda yetiştirilmesine bağlı olarak değiştiği de yapılan çalışmalarda bildirilmektedir [34].

*H. pylori*'nin midede çoğalmasında pH oldukça önemlidir. *Helicobacter pylori* için optimum pH nötrdür ve pH 7.5-8.5 arasında oldukça iyi üreyebilmektedir. pH 4.5'ten düşük olduğunda ise üreaz aktivitesine de bağlı olarak üreme yok denecek kadar azdır. Ancak, intra-bakteriyel üreaz gibi aktiviteler sayesinde 2.5 pH'a kadar canlılığını sürdürebilmektedir [62].

*H. pylori* kültürü için uygun örnek, endoskopi sırasında elde edilen biyopsi örnekleridir. Alınan çok sayıda örnek özellikle tanı için güvenilirliği arttırmaktadır.

Bu nedenle, midenin antrum ve body bölümlerinden iki örnek alınması önerilmektedir [60]. Alınan örneklerin mümkün olan en kısa zamanda uygun besiyerine ekimi yapılmalıdır. Alınan örneklerde kontamine edici mikroorganizmaların varlığı ihtimaline yönelik kültür ortamında seçici takviyeler kullanılmaktadır. Bunlar; vankomisin veya teikoplanin gibi gram-pozitif bakterilerin büyümesini engelleyen antibiyotikler, nalidiksik asit kolistin veya trimetoprim gibi gram-negatif bakterileri hedefleyen antibiyotikler ve nistatin veya amfoterisin B gibi antifungal takviyelerdir [63].

Kültür ortamında çoğaltılan bakteriler %10-20 gliserol ve besiyeri içeren ortamlarda -70°C sıcaklıkta aylarca veya -196 °C'de sıvı azotta daha uzun sürelerde saklanabilmektedir [64].

## 2.6 Epidemiyoloji

*H. pylori*'nin başlıca rezervuarının insanlar olduğu ve Dünya nüfusunun yaklaşık yarısını enfekte ettiği bilinmektedir. *H. pylori* enfeksiyonunun prevalansı coğrafi bölgeye, yaşa, ırka, etnik kökene göre değişmektedir. *H. pylori*'nin görülme sıklığı gelişmiş olan ülkelere kıyasla gelişmekte olan ülkelerde daha yüksektir [65]. Sosyo-ekonomik koşullara bağlı olarak enfeksiyon genellikle çocukluk çağında ortaya çıkmaktadır ve hijyen uygulamalarındaki gelişmelerle azalmaktadır. Özellikle çocukluk döneminde edinilen *H. pylori* enfeksiyonu yaygın olarak kişiden kişiye, özellikle aile üyeleri arasında ilerler. En sık bulaşma yolu da anneden çocuklara doğrudur [66].

Son yıllarda, özellikle Batı ülkelerinde ve çeşitli gelişmekte olan ülkelerde *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı azalmaktadır. Bununla birlikte, bazı bölgelerde, enfeksiyon oranları %60'ın üzerinde olduğu da bildirilmektedir [66]. Meta analiz (2011-2016) çalışmalarına bağlı olarak dünyadaki tüm çocukların yaklaşık üçte birinin *H. pylori* ile enfekte olduğu ileri sürülmüştür [67]. 1970 ve 2016 yılları arasındaki prevalans ile veriler değerlendirilerek yapılan çalışmada bölgeler ve ülkeler arasında *H. pylori* dağılımında büyük farklılıklar olduğu belirtilmektedir. Bakterinin görülme sıklığı en yüksek olan Afrika'da %79.1, Latin Amerika ve Karayiplerde %63.4 ve Asya'da %54.72'dir. Buna karşılık, en düşük *H. pylori* prevalans değerleri Kuzey Amerika'da %37.1 ve Okyanusya'da % 24.4'dir. *H. pylori* prevalansındaki bu farklılıklar

kentleşme, sanitasyon, temiz suya erişim ve çeşitli sosyoekonomik duruma bağlıdır. Aynı ülkede bile görülme sıklığında önemli farklılıklar bulunmaktadır [2].

## **2.7 *Helicobacter pylori*'nin Bulaşma Yolları**

*H. pylori*'nin doğrudan bir kişiden diğerine veya dolaylı olarak enfekte olmuş bir kişiden çevreye yayılabileceğini bilinmekle birlikte bulaşma yolları tam olarak anlaşılamamıştır. *H. pylori*'nin esas olarak kişiden kişiye bulaşmasında, özellikle çocukluk döneminde ve aile içinde bulaştığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bakterilerin kişiden kişiye nasıl bulaştığı ve kolonizasyonun neden bazı kişilerde gerçekleşmediği açık değildir. *H. pylori*'nin bilinen tek rezervuarı mide olduğu için dar bir konakçı aralığına sahiptir. Kişilerarası bulaşma yolundan farklı olarak çevresel kirlenme de bir bulaşma yolu oluşturmaktadır. Günümüzde kişilerarası bulaşma ihtimali çevresel maruz kalma ihtimalinden daha olasıdır [68, 69].

Kişiden kişiye bulaşma dikey ve yatay iletim olarak iki ana kategoriye ayrılabilir. Dikey iletim, aile içerisindeki kişilerde bulaşma, yatay iletim ise aile dışındaki kişilerle temas veya çevresel kontaminasyon olarak ifade edilmektedir [70]. *H. pylori* prevalansı düşük olan gelişmiş ülkelerde, enfekte olmuş annenin çocuklarda birincil enfeksiyon kaynağı olması muhtemeldir. Ancak Yüksek *H. pylori* prevalansı ve kötü sosyo-ekonomik koşulları olan popülasyonlarda, kardeşler arası ve dış etkenler ile bulaşma, enfekte anne aracılığıyla bulaşma ihtimalinden daha olasıdır [67]. Kişiden kişiye bulaşma gastro-oral, oral-oral ve fekal-oral olmak üzere üç olası yolla gerçekleşebilir.

Gastro-oral bulaşma yoluyla *H. pylori*, özellikle çocukluk döneminde kusmanın bir sonucu olarak mide özsuyu ile edinilebilmektedir. Mide özsuyunun yanı sıra tükürük, *H. pylori*'nin bir başka olası kaynağıdır. *H. pylori*'nin dental plak ve tükürükten izole edildiği çalışmalar literatürde mevcuttur. Oral-oral bulaşma yolu özellikle anneden çocuğa bakteri geçişinde etkilidir. *H. pylori* DNA'sı insan dışkısında sıklıkla tespit edilebilmektedir, ancak *H. pylori*'nin dışkıdan kültürlenmesi girişimleri sınırlı bir başarı göstermiştir çünkü bakteri dışkıda ağırlıklı olarak kültürlenemeyen kokoid bir formda bulunmaktadır. Dışkıda bulunması fekal-oral yolla bulaşma ihtimalini ortaya koymaktadır [65, 68].

*H. pylori* kirli su ve gıdalar gibi araçlarla da bulaştığı bilinmektedir. Hijyenik olmayan çevre koşulları içme sularında kirliliğe yol açmaktadır. Bazı araştırmacılar, suyun hem çevresel bir enfeksiyon rezervuarı hem de *H. pylori* enfeksiyonunun fekal-oral iletiminde bir rol oynadığını varsaymaktadır. Kirli su kaynağı olan evlerde yaşayan veya genellikle arıtılmamış kanalizasyon suyu ile sulanan çiğ sebze tüketen çocukların *H. pylori* enfeksiyonu prevalansının daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Suda olduğu gibi, gıda ürünleri de kötü hijyenik koşullar altında taşınırken kontamine olabilir. *H. pylori*'nin süt ve sebzeler gibi yemeye hazır gıdalar gibi çiğ gıda ürünlerinde mevcut olabileceğini gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur. Buna ek olarak, inek ve koyun gibi bazı hayvanların, insanların yanı sıra bu patojenin rezervuarları olabileceği bilinmektedir. Bunlara bağlı olarak gıdaların da *H. pylori* için bulaşma yolu olduğu düşünülmektedir [65, 68, 71].

## **2.8 Helicobacter pylori Enfeksiyonu ve İlişkili Hastalıklar**

*H. pylori*'nin midedeki kolonizasyonu, birçok biyokimyosalın salgılanması ve immünolojik reaksiyon aracılığıyla enfeksiyona sebep olmakta ve klinik hastalıklara yol açmaktadır [47]. *H. pylori* enfeksiyonunun klinik seyri oldukça değişkendir ve hem mikrobiyal hem de konakçı faktörlerinden etkilenir. Gastritin paterni ve dağılımı, duodenal veya gastrik ülserler, mukozal atrofi, gastrik karsinom veya gastrik lenfoma gibi klinik sekeller ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [5].

*H. pylori*'nin enfeksiyonu sırasında lamina propriyayı istila edebildiği ve bazal membranı geçebilen düşük molekül ağırlıklı, suda çözünür antijenleri de serbest bıraktığı bilinmektedir. Bu antijenler, birincil enfeksiyonun karakteristiği olan PMN'ler için kemo-çekicidir. İnterlökin-8 (IL-8) ve kemokinler gibi mide epitel hücrelerinden gelen interlökinler üretilir ve PMN'lerin çekimine katkıda bulunur. Bazı proteinler bağışıklık tepkisi (Th1 / Th2) yönünde de rol oynar. B lenfositleri de antijen sunan hücreler tarafından aktive edildiğinde, IgM, IgA ve IgG antikorlarını da içeren *H. pylori*'ye yönelik humoral bir bağışıklık tepkisi başlatılır. CD4 T ve CD19 B hücre aracılı antikor yanıtı, sitotoksik T hücreler (Tc) ve CD8 T hücre yanıtı yerine *H. pylori* enfeksiyonuna verilen başlıca yanıttır. Buna ek olarak, üreaz, flagella, dış zar proteinleri, CagA ve VacA, *H. pylori*'de büyük humoral bağışıklık tepkilerine neden olan antijenlerin bazılarıdır [47, 72].

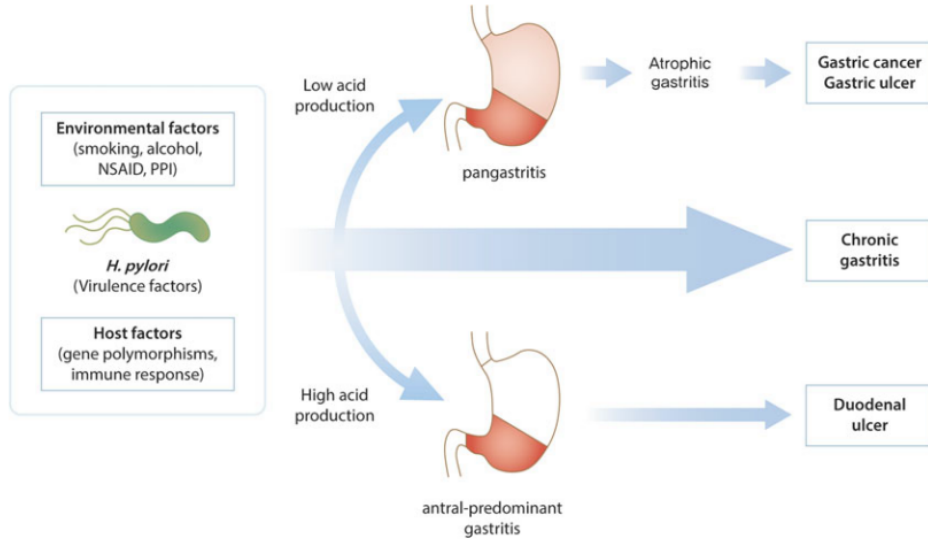
VacA ve CagA proteinleri gibi virülans faktörlerin mide mukoza yüzeyi ile hastalığın indüksiyonu arasındaki ilişkileri ortaya koyan birçok çalışma mevcuttur. *H. pylori*'nin çevresel ve konakçı faktörleri arasındaki ilişkiye bağlı olarak hastalıklar meydana gelmektedir. Ayrıca, konakçı ile sürekli etkileşimlerde, bakteriler mutasyonlara uğrayarak yeni genotipler oluşturabilmekte ve konakçı bağışıklık mekanizmasının üstesinden bu sayede gelebilmektedir. Bununla birlikte, antrum baskın gastrit ve korpus baskın pangastrit gibi *H. pylori* kolonizasyon paterninin hastalık sonucunu belirlediği de bilinmektedir [63].

### **2.8.1 Akut Enfeksiyon**

*H. pylori* akut enfeksiyonu, hastaların bir kısmında kusma, şişkinlik, ağrı gibi belirtiler görülse de çoğunlukla asemptomatiktir. Gastrik mukozal histoloji, lokal ve sistemik humoral bağışıklık yanıtı ve gastrik askorbik asit konsantrasyonundaki değişikliklerle birlikte açıklanmaktadır [73].

### **2.8.2 Gastrit**

Kronik aktif gastrit için *H. pylori* kolonizasyonu oldukça önemlidir. Bakterinin kolonizasyonu, çoğunlukla hem antrum hem de korpusta mide mukozasında, nötrofil ve mononükleer hücrelerle kronik olarak enflamatuar sürece neden olur. *H. pylori* ile ilişkili diğer bozukluklar da bu kronik enflamatuar süreç ile ilişkilidir. Kronik hasarlı sürecin intragastrik dağılımı ve şiddeti, kolonizasyona neden olan suşun özellikleri, konak genetik yapısı, bağışıklık tepkisi, diyet ve asit üretim seviyesi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. (Şekil 2.5) *H. pylori* kaynaklı ülser, mide kanseri ve MALT lenfoma gibi hastalıklar, gastrite bağlı kronik enflamatuar sürecin komplikasyonlarıdır. Ülser hastalığı ve mide kanseri özellikle bu bireylerde ve en şiddetli inflamasyona sahip bölgelerde görülmektedir [74, 75].



Şekil 2.5 *H. pylori* enfeksiyonunda mide patolojisine ve hastalık sonucuna katkıda bulunan faktörlerin şematik gösterimi [63]

### 2.8.3 Peptik Ülser

Steroid olmayan anti inflamatuvar ajanlar ve aspirin kullanımının yanı sıra *H. pylori* de hem mide hem de duodenum ülserlerinin ana risk faktörlerinden biridir. *H. pylori* ile ilişkili mide lezyonlarının patogenezi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak *H. pylori* virülans faktörleri ve konak bağışıklık tepkilerinin ülserlerin oluşumunu etkilediği düşünülmektedir [76].

Farklı sitokin genlerindeki fonksiyonel polimorfizmler, peptik ülser hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. IL1B tarafından kodlanan İnterlökin 1 $\beta$ , *H. pylori* enfeksiyonuna yönelik inflamatuvar yanıt oluşumu ve gastrik sekresyonun inhibisyonu ile ilişkili bir sitokindir. IL1B polimorfizmleri, çeşitli popülasyonlarda mukozal interlökin 1 $\beta$  üretimini etkiler. Bu polimorfizmler, peptik ülser hastalığı da dahil olmak üzere *H. pylori* ile ilişkili gastroduodenal hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır [77].

Gastrik ülser, ilerleyen atrofik cephede ortaya çıkma eğilimindedir ve bu nedenle bir *H. pylori* gastrik ülserinin yeri, gastrit, atrofi ve asit sekresyonunun boyutu ve şiddeti hakkında bilgi sağlamaktadır. Duodenal ülserler nasıl normal ila yüksek asit çıkışı olan atrofik olmayan korpus gastriti ile ilişkiliyse, midenin body kısmındaki bir mide ülseri de corpus gastritin varlığını göstermektedir. Ayrıca, ülser ne kadar proksimal olursa gastrit o kadar geniş ve şiddetlidir [78]. Çeşitli konakçı ve bakteriyel

faktörlerden etkilenen ülserleri oluşum bölgelerine göre gastrik ve duodenal ülserler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Asit sekresyonu azaldığında, korpus ve antrum arasındaki gastrik geçiş bölgelerinde gastrik ülser meydana gelebilmektedir. Asit sekresyonu normalden yükseğe çıktığında ise, en şiddetli inflamasyon genellikle distal mide ve proksimal duodenumda bulunur ve bu durumda duodenal ülserler görülmektedir [76, 79]. Gastrik ülserlerin %50'si, duodenum ülserlerinin ise %80'i *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkilidir [80].

#### 2.8.4 Gastrik Adenokarsinom

Mide kanseri, çevresel faktörler ve konakçı-patojen etkileşimini etkileyen faktörler ve bu faktörler arasındaki karmaşık etkileşimler gibi birçok farklı nedene bağlı olarak gelişebilen bir hastalıktır [81]. Gastrik adenokarsinom, dünya çapında kansere bağlı mortalitenin ikinci önde gelen nedenidir. *H. pylori*, 1994 yılında IARC çalışma grubu tarafından tip I kanserojen olarak sınıflandırılmıştır [82]. *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, gastrik adenokarsinom için bilinen en güçlü risk faktörüdür [83]. Gastrik adenokarsinomların bağırsak ve yaygın tip olmak üzere iki türü vardır. *H. pylori* enfeksiyonunun, bağırsak tipinin adenokarsinomuna yol açan kronik aktif gastritin başlamasına nedensel olarak bağlı olduğu düşünülmekle birlikte *H. pylori* ile enfekte hastaların % 1-3'ünde gastrik adenokarsinom gelişmektedir [81].

*H. pylori*, artan apoptosis ve proliferasyona sebep olup gastrik epitelial hücre döngüsünü değiştirerek gastrik karsinoma riskinin arttırdığı bilinmektedir. *H. pylori*'nin hücre döngüsüne etkisi aşağıdaki gibi sıralanmaktadır.

1. *H. pylori* kronik enflamasyonuna bağlı olarak artmış serbest oksijen radikalleri içeren ortamın sebebiyet verdiği DNA hasarı ve apoptoz
2. *H. pylori*-hücre etkileşimi sonucu apoptoz
3. *H. pylori* tarafından salgılanan toksinler aracılığıyla sonuçlanan doku hasarı ve apoptoz [84].

*H. pylori* ile kolonizasyonun ardından gastrik adenokarsinom gelişme riski, enfeksiyona neden olan *H. pylori* suşu ve bakteriyel virülans faktörlerine de bağlıdır. Cag patojenisite adası veya türleri ile tip1 vacA alelleri içeren suşlar, diğer suş tipleriyle kıyaslandığında gastrik adenokarsinom için daha fazla risk taşımaktadır [85]. *H. pylori*'nin CagA ve peptidoglikanı, onkojenik yolları tetikleyerek tümör

oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Siklooksijenaz2/prostaglandin E2 yolunu ve IL-1 $\beta$ 'yi içeren gastrik epitelde *H. pylori*'nin neden olduğu iltihaplanma, kronik aktif gastrit ve adenokarsinomu tetikleyen önemli bir faktördür. Ayrıca, *H. pylori* enfeksiyonunun neden olduğu oksidatif stres ve düzensiz E-cadherin/ $\beta$ -katenin/p120 etkileşimleri tümör oluşumunda etkilidir. Son çalışmalarda yüksek tuzlu diyet ve demir eksikliği gibi mikrobiyomun bileşenlerini etkileyen çevresel ve diyetle ilgili faktörler *H. pylori* kaynaklı karsinogenezi de etkileyebileceği öne sürülmektedir [81, 85].

İnsan IL1 $\beta$  gen promotöründeki IL-1 $\beta$  ekspresyonunun artmasıyla ilişkili polimorfizmler, atrofik gastrit ve gastrik adenokarsinom riskini arttırmaktadır. IL-1 $\beta$ 'ye ek olarak, bir pro-enflamatuar sitokin olan TNF $\alpha$ 'daki yüksek ekspresyonlu polimorfizmler de mide kanseri riskini arttırmaktadır [86].

Epitelyal dokularda uygun hücreyel yapının korunmasında önemli olan bir yapışma molekülü olan, ancak mide kanserinde fonksiyon kaybına uğradığı bilinen E-kaderin, p120'nin kaderin jukstamembran alanına bağlanmasıyla düzenlenir. Ayrıca, E-kaderin'in sitoplazmik alanı,  $\beta$ -katenin ve p120 ile etkileşir, bu da sitoskeletal bileşen aktin ile etkileşir.  $\beta$ -katenin, *H. pylori* ile birlikte kanserojen tepkileri etkileyebilecek spesifik konakçı molekül ve konakçı hücrelerde farklı fonksiyonlara sahip olan her yerde eksprese edilen bir proteindir. Hasar görmemiş gastrik mukoza ile kıyaslandığında mide adenokarsinom örneklerinin %50'sinde artmış  $\beta$ -katenin ekspresyonu görülmektedir. Ayrıca, *H. pylori* kolonize mukozada ve gastrik epitel hücreleri in vitro birlikte kültürleri sırasında  $\beta$ -katenin hedef genlerinin ekspresyonunu arttırdığı da belirlenmiştir. Bu nedenle,  $\beta$ -katenin sinyalleşme aktivasyonunun, epitelyal yanıtların düzenlenmesinde merkezi bir bileşen olduğu ve *H. pylori*'nin malign oluşumuna destek sağladığı düşünülmektedir [86, 87].

### **2.8.5 Mukoza İlişkili Lenfoid Doku Lenfoma**

Lenfoma, T ve B lenfositleri olan lenfoid hücrelerden kaynaklanan ve özellikle spesifik antijenik uyarılara yanıt olarak klonal çoğalan hematolojik malignitedir. Mukoza İlişkili Lenfoid Doku (MALT) lenfoma, mukoza kaynaklı lenfoid dokuların marjinal bölgesindeki B hücrelerinden kaynaklanan ekstra nodal düşük dereceli bir

lenfomadır [88]. Mide ektranodal lenfomaların en sık görülen bölgesidir. MALT lenfomaları akciğer, oküler adneks, tiroid bezi ve ince bağırsak gibi çeşitli ekstra nodal bölgelerde ortaya çıkabilse de yaklaşık %70'i, kronik olarak *H. pylori* enfekte kişilerin midelerinde görülmektedir. Ayrıca, her yıl yaklaşık 13.000 kişiye mide kaynaklı MALT lenfoma teşhisi konmaktadır [89].

Özellikle CagA-pozitif *Helicobacter pylori* suşlarının enfeksiyonu, gastrik karsinomlar ve gastrik mukozaya bağlı lenfoid doku lenfomaları ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [90]. *H. pylori*, bakteriyel proteini CagA'nın gastrik epitel hücrelerinin hücre içi sinyal yolları ile etkileşimi patogenezi başlatmaktadır. Bu sayede, B lenfositleri ile *H. pylori* doğrudan etkileşime girerek kalıcı enfeksiyon oluşumu ve MALT lenfomalarının gelişimine neden olmaktadır [91]. Wei-Cheng Lin ve ark. yaptığı çalışmada, CagA'nın *H. pylori* tarafından doğrudan B hücrelerine verildiği ve MALT lenfomalarının gelişimi ile ilişkili olduğunu kanıtlanmıştır. Bu çalışmada, CagA'nın *H. pylori* tarafından doğrudan insan B lenfoid hücrelerine transloke edilebildiği, translokasyona tabi tutulmuş CagA'nın tirozin fosforilasyona uğradığı ve hücre içi SH-2'ye bağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca, translokasyonlu CagA, insan B lenfoid hücrelerinde hücre dışı sinyal regüle edilmiş kinaz ve p38 mitojenle aktive edilen protein kinazın aktivasyonunu indüklediği ve apoptozu önleyen Bcl-2 ve Bcl-XL ekspresyonlarını düzenlediği de belirtilmiştir [92].

### **2.8.6 Gastro-özefagal Reflü Hastalığı**

Gastroözofageal reflü hastalığı (GÖRH), Avrupa ve ABD'de görülme oranı %10-20 olarak bildirilen en yaygın görülen bir kronik hastalıktır. Hastalık, mide özusunun geri akışını teşvik eden faktörler ve ortaya çıkan asitliği nötralize etmek için tasarlanmış savunma kuvvetlerinin başarısızlığı arasında bir etkileşim içermektedir. GÖRH, asit reflü, özofajit, özofagus ülseri gibi benign ve Barrett's özofagus ve özofagus adenokarsinoma gibi malign komplikasyonlara neden olabilmektedir [93].

Çeşitli patofizyolojik faktörler GÖRH gelişimini ve seyrini etkilemektedir, *H. pylori* enfeksiyonu ise bunlardan biridir. Ancak *H. pylori* ile GÖRH'ün karmaşık bir ilişkisi bulunmaktadır. *H. pylori*'nin neden olduğu enfeksiyona bağlı olarak GÖRH'e yönelik koruyucu veya arttırıcı bir etki göstermektedir. *H. pylori* enfeksiyonuna bağlı gelişen

gastritin tipi asit sekresyonunun artması veya azalmasını sağlamaktadır. Korpustaki gastrit hipoasite, antrum gastrit hiperasite yol açmaktadır. Gastrik asit sekresyonunun da, reflü özofajit patofizyolojisinde önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hiperaktivitesi olan antral gastrit ve duodenal ülser vakalarında, *H. pylori*'nin eradikasyonu ile önceden var olan reflü özofajitinde bir iyileşme beklenmektedir. Atrofik gastrit GÖRH'ye karşı koruma sağlayabilir. Gastrik atrofiye yol açan pangastrit, genellikle CagA pozitif *H. pylori* suşları ile ilişkilidir ve daha şiddetli gastrik inflamasyona neden olmaktadır. Midede, pangastritte ve atrofik gastritte *H. pylori* pozitif korpus gastrit durumunda, bakterinin yok edilmesinden sonra reflü özofajit sıklıkla görülmektedir [94].

### **2.8.7 Fonksiyonel Dispepsi**

Fonksiyonel dispepsi yaygın olarak görülen fonksiyonel gastrointestinal bozukluklardan biridir. Fonksiyonel dispepsi semptomları arasında bozulmuş mide motilitesi, mide hassasiyeti, mide ve duodenal inflamasyonu sayılabilmektedir. Fonksiyonel dispepsi nedenleri çok faktörlüdür ve bunlar arasında *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ve peptik ülser bulunmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonu, mide ve duodenumda kronik mukozal inflamasyona neden olmakta ve bu sayede gastroduodenal motilite ve duyarlılıkta anormallikler görülebilmektedir. Kronik gastrit, gastrointestinal hormonların ve nörotransmitterlerin somatostatin, gastrin ve grelin üretimi dahil olmak üzere midenin çeşitli endokrin fonksiyonlarını da etkilemektedir. Bu anormallikler fonksiyonel dispepsi olan bazı hastalarda semptomlar üretebilmektedir [95, 96].

### **2.8.8 Gastrointestinal Sistem Dışı Hastalıklar**

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *Helicobacter pylori*'nin nörolojik, dermatolojik, hematolojik, oküler, kardiyovasküler, metabolik, alerjik birçok ektragastrik hastalıkların patojenik mekanizmalarında potansiyel bir rol oynadığı anlaşılmıştır. *H. pylori* enfeksiyonu ile gastrik sistem dışındaki hastalıklar arasındaki ilişki ilk olarak Mendall ve ark. tarafından 1994 yılında gösterilmiştir. *H. pylori* enfeksiyonunun gastrointestinal sistem dışındaki hastalıklar ile ilişkisine yönelik klinik ekstra gastrik bulgular bulunmaktadır [4].

## **Nörolojik Hastalıklar ile İlişkisi**

*H. pylori* enfeksiyonunun yaşam boyu devam etmesi nedeniyle interlökin-8, makrofaj kemotaktik protein-1 gibi kemokinlerin ve IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  gibi sitokinlerin çeşitli enflamatuar mediatörlerin uzun süreli lokal sekresyonu gerçekleşmektedir. Bu mediatörler, dolaşıma katılabilmekte, sistemik etkilere neden olmakta ve nörolojik hastalıkları etkilediği de düşünülmektedir. *H. pylori* enfeksiyonunun sekresyonuna neden olduğu proenflamatuar faktörler beyin iltihabına ve nöronların ölümüne sebep olabilmektedir. Ayrıca, çoğu nörolojik hastalığın çoklu faktörlerin bir kombinasyonu sonucu oluştuğunun bilinmesi de *H. pylori* ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir [4, 97].

Parkinson, Alzheimer, Guillain-Barré sendromu, multipl skleroz ve iskemik gibi enflamatuar hastalıklarda *H. pylori* enfeksiyonunun neden olduğu inflamasyonun rolü olduğuna yönelik araştırmalar literatürde mevcuttur [97]. Huang ve ark. tarafından yapılan çalışmada, *H. pylori* ile enfekte kişilerde Alzheimer gelişme riski 1,6 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir [98]. Roubaud Baudron ve ark. *H. pylori* ile enfekte kişilerin 20 yıllık takip süresi boyunca enfekte olmayanlara kıyasla 1,5 kat daha fazla demans gelişme riskine sahip olduğunu belirlemişlerdir [99]. 2017 yılında yapılan bir araştırmada *Helicobacter pylori*'nin Vac A antijenine karşı antikolar, sekonder progresif MS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla daha sık tespit edilmiştir [100]. Parkinson hastaları ile yapılan bir çok vaka analiz çalışmasında *H. pylori* enfeksiyonunun hastalığın prevalansını arttırdığı belirlenmiştir. Huang ve ark. Tayvan nüfusa dayalı retrospektif bir kohortta, ortalama 4,2 yıllık takip ile 60 yaşın üzerindeki kişilerde enfeksiyon durumunda Parkinson hastalığının insidansında artış olduğunu bildirmişlerdir [101].

## **Kardiyovasküler Hastalıklar ile İlişkisi**

*H. pylori* enfeksiyonunun aterosklerotik kalp hastalığı, inme ve miyokard enfarktüsü gibi kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkisine yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. *H. pylori*'nin aterosklerotik hastalık ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada 38 aterosklerotik plağın 20'sinde *H. pylori* DNA'sı bulunmuştur. *H. pylori* DNA pozitif plaklarından on tanesinde ise *H. pylori* enfeksiyonu morfolojik ve immünohistokimyasal olarak da gösterilmiştir [102]. Matsuura ve ark., *H. pylori*

HSP60 proteininin, INF- $\gamma$  ve IL-12 üretmek için uyarılan Th1 lenfositlerinin uyarılması yoluyla koroner aterosklerotik hastalığının patogeneziyle ilişkili ve makrofajların aktivasyonu yoluyla aterosklerotik plakların oluşturulmasında etkili olabileceği öne sürmüştür [4]. İnterlökin-1 polimorfizmlerinin konak genetik faktörleri *H. pylori* enfeksiyonunun patojenik aktivitesini etkilemektedir. 2016 yılında yapılan çalışmada, *H. pylori* ile enfekte ve koroner arter hastalığına sahip kişiler kontrol grubu ile kıyaslandığında IL-1 polimorfizmleri olan *H. pylori*-pozitif hastalarda daha yüksek hs-CRP ve miyokard enfarktüs ile anlamlı korelasyon gösterdiği belirtilmiştir [103].

### **Metabolik Hastalıklar ile İlişkisi**

Tip II diabetes mellitus, insülin direncine ve pankreasın beta hücrelerinin bozulmasına bağlı olarak kan şekeri düzeylerindeki artışla ilişkili metabolik bir hastalıktır. DNA hasarı ve oksidatif stres, insüline bağımlı ve bağımsız her iki diabetes mellitus tipinin sonucudur. Diabetes mellitus ve *H. pylori* enfeksiyonu olan hastalarda yüksek düzeylerde 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG), reaktif oksijen (ROS) ve azot türleri bulunduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur [104]. Memeli midesinde üretimi gerçekleşen leptin ve grelin hormonlarının etkileşimleri obezite, insülin duyarlılığı ve glikoz homeostazını etkilemektedir. *H. pylori* enfeksiyonunun grelin ve leptin üretimini bozarak konakçının metabolik homeostazisinde rolü olduğu bilinmektedir. Chen ve ark. *H. pylori*'nin kan şekerini düzenlemeye yardımcı olan leptin ve grelin hormonlarının seviyesini etkileyebileceğini göstermişlerdir [105]. Ayrıca, Masayuki Kato ve ark. tarafından, araştırma sırasında veya geçmişte *H. pylori* enfeksiyonu öyküsü olan katılımcılar ile yapılan araştırmada mevcut *H. pylori* enfeksiyonunun artmış diyabet riski ile ilişkili olduğunu ve eradikasyon sonrası katılımcılar arasında artmış riskin gözlenmediği belirlenmiştir. *H. pylori* enfeksiyonunun diyabet riskini arttırdığı öne sürülmüştür [106].

### **Hematolojik Hastalıklar ile İlişkisi**

İdiyopatik trombositopenik purpura, otoantikörlerin veya bağışıklık komplekslerinin trombositleri tahrip ettiği ve mukokutanöz kanamanın karakteristik olarak meydana geldiği normal aralığın alt sınırının altına düşmesine

neden olan edinilmiş bir hematolojik bozuktur. Literatürde *H. pylori* eradikasyon tedavisinin, artmış trombosit sayısı ile ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Vanegas ve arkadaşları, anti-*H. pylori* tedavisine trombosit yanıtını değerlendiren çalışmaların yakın tarihli bir meta analizinde, %27 ila %69.2 arasında değişen ortalama toplam trombosit yanıtı ve %0 ila %65.4 arasında tam bir yanıt bildirmişlerdir [107].

*H. pylori* enfeksiyonunun mide ve plazma askorbik asidi düşürerek ve demir emilimini azaltarak bu sayede demir bağımlı anemiye neden olduğu da bilinmektedir. *H. pylori*, kronik enfeksiyonu demir homeostazını düzenleyen hepcidin hormonunun serum seviyelerini etkileyerek demirin düzensizleşmesine neden olmaktadır [108]. Hershko ve ark., demir bağımlı anemi ve *H. pylori* enfeksiyonları olan hastaların %64-75'inin *H. pylori* eradikasyonundan sonra demir bağımlı aneminin de tedavi edildiğini yaptıkları çalışmada göstermişlerdir [109].

B12 vitamini, insan vücudunda DNA sentezine yol açan birçok önemli enzimatik reaksiyonun koenzimidir. Lahner ve ark. 2454 hastayı kapsayan 17 çalışmayı değerlendiren sistematik bir derlemede düşük serum B12 vitamini düzeyleri ile *H. pylori* enfeksiyonu arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Homosistein, B12 vitamini metabolik yolunun bir bileşenidir ve bazı araştırmacılar, *H. pylori* enfeksiyonuna bağlı olarak düşük serum B12 vitamini seviyeleri ile serum homosisteinindeki artışlar arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. *H. pylori* eradikasyonundan sonra serum B12 vitamini seviyelerinde artış ve homosistein serum seviyelerinde azalma bildirilmiştir [4].

### **Solunum Yolu Hastalıkları ile İlişkisi**

Kronik bronşit ve *H. pylori* arasındaki ilişki ile ilgili *H. pylori* antikoru araştırılmaktadır. İki enfeksiyon arasındaki bağlantı belirsiz olmasına rağmen bronşit gelişiminde *H. pylori* enfeksiyonunun salımına neden olduğu sitokinlerin etkili olduğu öne sürülmektedir. Seroloji çalışmaları bronşektazi hastalarında *H. pylori* için yüksek seviyelerde IgG antikoru bulunmasının kontrol grubundan daha yüksek seviyelerde olduğu ortaya koymuştur [110].

*Mycobacterium tuberculosis*'in neden olduğu kronik enfeksiyon olan tüberkülozun, *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkisi de incelenmiştir. Kanıtlar, bu ilişkinin bu enfeksiyonlar arasındaki sitokin profilinin benzerliğine dayandığını göstermektedir. Artan INF- $\gamma$  ve IL-10 seviyeleri hem tüberküloz hastalarında hem de *H. pylori* enfeksiyonunda görölmektedir. Bunun yanı sıra, tüberküloz ve/veya *H. pylori* ile enfekte kişilerde görölen IL-8'in 251T/A pozisyonundaki polimorfizmi iki enfeksiyon arasında bağlantı olduğunu ortaya koymaktadır [4, 111].

### **Dermatolojik Hastalıklarla İlişkisi**

*H. pylori* neden olduğu kronik inflamasyon nedeniyle enflamasyon ve alerji ile ilişkili cilt problemlerine neden olmaktadır. Rosacea (Göl Hastalığı), *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkili en yaygın dermatolojik hastalıktır. Telanjiektazi adı verilen çok genişlemiş kırmızı yüzeysel kılcal damarlarla karakterize eritem ve kutanöz lezyonlar olarak ortaya çıkan kronik bir yüz dermatitidir. Rosacea hastalarında yaygın olarak gastrointestinal bozuklukların varlığı tespit edilmekle birlikte birçok çalışmada *H. pylori* enfeksiyonu ile potansiyel bir ilişki olduğunu gösterilmiştir. Gravina A ve ark. *H. pylori* ile enfekte ve aynı zamanda Rosacea hastalığına sahip kişilerin *H. pylori* tedavisinin ardından %96,9'unda rosacea deri lezyonlarının kısmi veya toplam regresyonu ile düzelme gösterdiği raporlanmıştır [112].

Psoriasis, urticaria, sjogren sendromu, sistemik skleroz, alopesi areata ve kutanöz pruritus gibi dermatolojik hastalıkların *H. pylori* enfeksiyonu ile ilişkileri hala araştırılmaktadır. Çoğunlukla, bu çalışmalar *H. pylori* enfeksiyonunun bir sonucu olarak sistemik enflamatuvar yanıtla bağlantılıdır [104].

### **2.9 Helicobacter pylori Tanı Yöntemleri**

*H. pylori* tanısında kullanılan testler endoskopi kullanılmasına bağlı olarak invaziv ve invaziv olmayan olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır. Endoskopi sırasında elde edilen biyopsi örneklerinin incelendiği invaziv teknikler; histolojik değerlendirme, kültür, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve hızlı üreaz testini içermektedir. Üre nefes testi, seroloji ve dışkı antijen testi ise tanıda yararlanılan invaziv olmayan test yöntemleridir [113].

*H. pylori* enfeksiyonunun doğru teşhisi için %90'ı aşan yüksek duyarlılık ve özgüllük tanı testleri gereklidir. Günümüzde kullanılan birçok tanı testi mevcut olmasına rağmen, her yöntemin kendine özgü avantajları, dezavantajları ve sınırlamaları vardır. Bir yöntemin veya başka bir yöntemin seçimi, tanı testlerinin mevcudiyetine, erişilebilirliğine, laboratuvarların seviyesine, hastaların klinik koşullarına ve farklı klinik durumlar üzerindeki pozitif ve negatif testlerin olasılık oranına bağlı olabilir [114]. Dışkı antijen testi, üre nefes testi, hızlı üreaz testi, seroloji ve histoloji tanı yöntemlerinin geçerliliklerinin birbiriyle kıyaslanması tablo 2.1'de verilmiştir [115].

**Tablo 2.1** Hızlı üreaz ve üre nefes testlerinin karşılaştırılması [115]

Result	Test	Histology	RUT <sup>§</sup>	Serology	Stool Antigen Test	UBT <sup>¶</sup>
Sensitivity		89%	93%	50%	96%	89%
Specificity		78%	75%	54%	83%	73%
PPV <sup>†</sup>		93%	95%	46%	98%	92%
NPV <sup>‡</sup>		91%	94%	61%	96%	90%
Accuracy		85%	86%	52%	91%	82%
area under the ROC curve		0.839 (0.748-0.930)*	0.843 (0.752-0.935)*	0.525 (0.405-0.645)*	0.901 (0.826-0.977)*	0.812 (0.715-0.909)*

§ Rapid Urease Test

¶ Urea Breath Test

† Positive Predictive Value

‡ Negative Predictive Value

\* 95% confidence interval

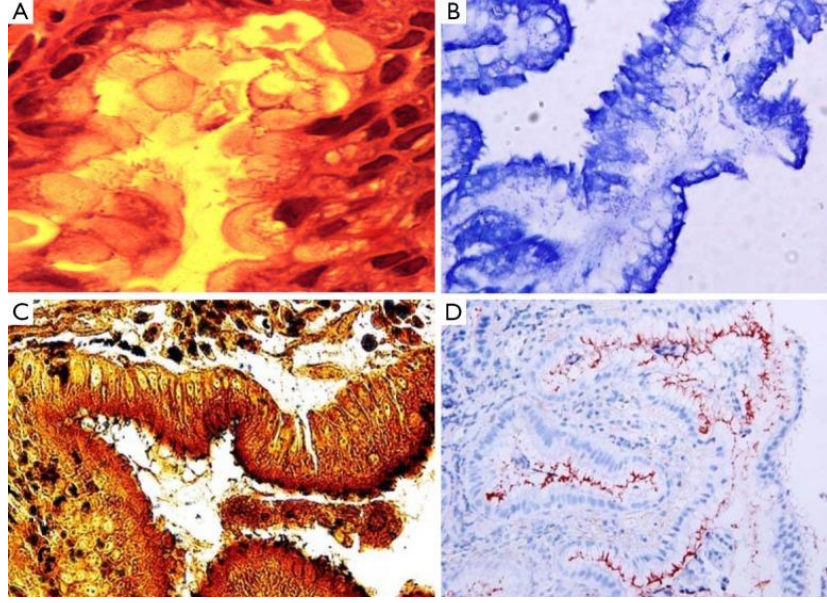
## 2.9.1 İnvaziv Yöntemler

### Histolojik Değerlendirme

*H. pylori*'nin teşhisinde ilk kullanılan ve aynı zamanda standart yöntem histolojik incelemedir. Histolojik değerlendirme, *H. pylori* tanısının yanında inflamasyon varlığı ve şiddeti, bağırsak metaplazisi, glandüler atrofi, displazi ve neoplazi hakkında mukoza ile ilgili önemli bilgilere ulaşmayı sağlar. Histolojinin yüksek duyarlılığı genellikle toplanan biyopsi örneklerinin yeri, sayısı ve büyüklüğünden etkilenmektedir. Düzensiz kolonizasyon bazen yanlış tanıya da neden olabilmektedir. Hem antrum hem de corpus biyopsi örneklerinin toplanması önerilmekle birlikte gastrik biyopsi toplama için altın standart, 5 biyopsi bölgesinden örnekleme içeren güncellenmiş Sydney sınıflandırma sistemidir [113,

116]. Gastrik mukozadaki *H. pylori*'nin düzensiz dağılımı, kolonizasyon yoğunluğu ve pataloğun deneyimine bağlı olarak *H. pylori* tanısı için histolojinin duyarlılığı ve özgüllüğü %53 ila %90 arasında değişmektedir. Biyopsilerin sayısının arttırılması ve spesifik lekelerin kullanılması histolojinin duyarlılığını artırabileceği düşünülmektedir [117].

*H. pylori*'nin histolojik değerlendirilmesinde mümkünse, teşhis için en az iki çeşit boyama yöntemi önerilmektedir. Biyopsi örneklerinde *H. pylori*'yi belirlemek için genellikle hematoksilin ve eozin boyası yeterli olmaktadır. Giemsa boyası ise uygulama kolaylığı nedeniyle diğer boyalara göre avantajlı olduğu görülmektedir. Hematoksilin ve eozin boyasının duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %69-93 ve %87-90 olarak bildirilmiştir [118]. Warthin-Starry, Giemsa, toluidin mavisi, akridin turuncu, McMullen, Genta, Dieterle ve Romanouski boyları veya immünokimyasal yöntemler gibi özel boyların kullanılması ile özgüllük ve duyarlılık %90-100 oranında iyileştirilebilir. Laine ve ark. hematoksilin ve eozin, Giemsa ve Genta boyama yöntemlerini düşük ve yüksek *H. pylori* yoğunluğunda duyarlılık ve hassaslıklarını karşılaştırmışlardır. Düşük *H. pylori* yoğunluğunda duyarlılık hematoksilin ve eozin için %70, Giemsa için %64, Genta için %66, yüksek *H. pylori* yoğunluğunda duyarlılık hematoksilin ve eozin için %98, Giemsa için %96; Genta için %97 olarak belirlenmiştir. Hem düşük hem de yüksek *H. pylori* yoğunluğunda Genta ve Giemsa boyları ve yüksek yoğunlukta hematoksilin ve eozin boyası için özgüllük %98-100 olarak tespit edilmiştir. Ancak, düşük yoğunluklu *H. pylori*'de H&E boyası için özgüllük %90'dır [119]. İmmünohistokimyasal boyama hematoksilin ve eozin, Giemsa ve Genta gibi geleneksel boylara göre yorumlanması kolay ve *H. pylori* teşhisi için oldukça hassas bir yöntem olmasına rağmen her mide biyopsi örneği immünohistokimyasal boyama yapmak için uygun değildir. Şekil 2.6'da spiral şekilli *H. pylori* mikroorganizmalarının (A) hematoksilin ve eozin boyama (x1000), (B) Giemsa boyama (x400), (C) Warthin-Starry silver boyama (x100) ve (D) immünohistokimyasal boyama (x400) teknikleri ile boyanmış halleri gösterilmiştir.



**Şekil 2.6** *Helicobacter pylori*'nin farklı boyama yöntemleriyle görüntülenmesi [118]

Histolojik yöntemlerle en erken tanı 2-3 gün sürmektedir ve tespit oranı kesinlikle patalogların uzmanlığına göre değişmektedir. Ayrıca, kullanılan antibiyotikler ve PPI, *H. pylori*'nin rutin mikroskopi tekniği ile saptanamayan spiral formdan kokoid forma dönüşmesine sebep olabilmektedir. Bununla birlikte, floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi histolojik preparatlarda *H. pylori*'nin spesifik tespiti, bakteri şeklinden bağımsız olarak yapılabilmesini sağlamaktadır. Bu yöntem en hızlı yöntemdir ve *H. pylori*'yi tespit etmek 3 saat sürmektedir [113, 116]. FISH, histolojik preparatlarda, *H. pylori*'ye ek olarak klaritromisin direnci gibi belirli bir bakteri faktörünün veya özelliğinin saptanmasına izin veren yeni bir yöntemdir [120]. FISH, belirli bir geni hedefleyen bir dizi floresan protein etiketli oligonükleotid prob kullanır; kullanılan yaygın proplar 16S ve 23S ribozomal RNA genleridir. İn situ hibridizasyon ve immünokimyasal yöntemler, virülans faktörlerini ve suşların mide mukozasındaki yerini saptamak için de kullanılabilir. Bu yöntemin morfolojik tanımlamadan bağımsız olması genellikle bireysel yanlılığa sahip değildir [116].

### **Kültür**

Gastrik biyopsi örneğinden *H. pylori* kültürü oldukça spesifik ancak spesifikliğine kıyasla daha az duyarlılığa sahip bir yöntemdir. Optimum koşullarda kültür işlemi gerçekleştirildiğinde %100 özgülüğe sahiptir. Ancak, kültürün duyarlılığı %85-%95 arasında farklılıklar göstermektedir [114]. Sudraba A. ve ark. atrofisi olan

hastalarda kültür metodunun duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPV), negatif prediktif değer (NPV) ve genel doğruluğu sırasıyla %96, %100, %100, %80 ve %97 olarak belirlemişlerdir [121].

*H. pylori*'nin oldukça hassas bir bakteri olmasına bağlı olarak, biyopsi örneklerinin en kısa süre kültürlenmesi gerekmektedir. Bu sebeple özel taşıma ve kültür ortamı şartları gerektirir. Biyopsi örnekleri, 4 °C'de 24 saate kadar Portagerm pylori veya Stuart taşıma ortamı gibi bir taşıma ortamında tutulabilir. Ayrıca izole edildikten sonra *H. pylori* %15 ila %20 arasında değişen miktarlarda gliserol içeren Brucella broth gibi sıvı besiyerlerinde -80 °C'de veya -196 °C'de azot tankında daha uzun süre dondurularak saklanabilmektedir [122]. *H. pylori* kültürü için kommensal bakterileri inhibe eden spesifik antibiyotikleri (vankomisin, 10mg/L; amfoterisin B, 10mg/L ve sefsulodin veya trimetoprim, 5mg/L) içeren ve koyun veya at kanı ilave edilmiş seçici agarlar kullanılmaktadır. Bu agarlar; Pylori agar, Skirrow agar, Columbia kan agar, Brucella agar, Beyin kalp infüzyonu agar veya Trypticase soy agar olabilir. Biyopsi örneklerinden ekim gerçekleştirilen agarlar mikroaerofilik koşullar altında (%85 N<sub>2</sub>, %10 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub>) 37 °C'de en az 7 gün inkübe edilmelidir. İnkübasyonun ardından kültür ortamında *H. pylori* tanısı, morfolojik özelliklere ve pozitif üreaz, katalaz ve oksidaz reaksiyonlarına bakılarak koyulur [60, 113].

Koch'un postülatlarına göre kültür *H. pylori* enfeksiyonunu oluşturmanın en spesifik yolu olarak kabul edilir. Ancak deneyimli laboratuvarlar bile organizmayı enfekte olmuş biyopsilerin sadece %50 ila %70'inden izole edebilmektedir. Bu nedenle kültür ortamında büyümesini engelleyen diğer organizmaları içermeleri nedeniyle dışkı, tükürük, kusmuk ve diş plaklarından *H. pylori*'nin izole edilmesi oldukça zordur [116].

*H. pylori* kültürü, tanının yanı sıra bakterinin antibiyotik duyarlılığının ve eradikasyon için uygun ajanların seçilmesi için de kullanılmaktadır. Kültür tarafından sağlanan *H. pylori*'nin antibiyotik duyarlılık testi klinik uygulamada avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, Maastricht IV Konsensus Raporu, klaritromisine birincil direnç belirli bir coğrafi bölgede veya ikinci basamak tedavi başarısızlığından sonra %20'den yüksekse *H. pylori* kültürü ve antibiyotik duyarlılık testi yapılmasını önermektedir [123]. *H. pylori*'nin izolasyonu ve kültürü bakterinin

daha iyi anlaşılmasına, in vitro ortamda olanak sağlayarak aşı ve ilaç geliştirme çalışmalarına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, detaylı fenotipik ve genotipik karakterizasyon *H. pylori*'ye yönelik epidemiyolojik özelliklerin anlaşılmasını da kolaylaştırmaktadır [113, 114].

Allahverdiyev, Adil M. ve ark. *H. pylori*'nin tanısı için mikro kültür yöntemini geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, dünyada ilk kez, mikrokültür yöntemi *H. pylori* tanısı için kullanılmış olup yöntemin duyarlılığı %80, özgüllüğü %80 PPV değeri %83, NPV değeri %95 olarak belirlenmiştir. Mikrokültür yönteminin klasik kültür yöntemine kıyasla birçok avantajı bulunmaktadır. Bunlar;

- Mikroaerofilik ortam koşullarını sağlamak için kit gerektirmemesi,
- Az miktarda bakteri içeren örneklerden tanının gerçekleştirilebilmesi,
- *H. pylori* için seçici ortam oluşturması nedeniyle kontaminasyon risklerini azaltabilmesidir [124].

### **Moleküler Tanı Yöntemleri**

Gastrik biyopsi örneklerinde Polimeraz zincir reaksiyonu gibi moleküler yöntemler kullanılarak patojenlerin varlığı saptanabilmektedir. PCR hem invaziv hem de noninvaziv yöntemlerle elde edilen ve bakteri miktarı az olan örneklerde bile *H. pylori*'nin teşhisini sağlayabilmektedir. Ancak PCR'ın önemli bir dezavantajı, tedaviden sonra hastaların mide mukozasındaki ölü bakterilerin DNA segmentlerinin de tespit edilebilmesidir. Bu durum yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. *H. pylori* enfeksiyonunu tespit etmek için gastrik biyopsi örnekleri, tükürük, dışkı, mide öz suyu gibi örnekler kullanılarak PCR gerçekleştirilmektedir. PCR, diğer konvansiyonel testlere kıyasla %95'ten daha fazla hassasiyet ve özgüllük sağlamaktadır [113, 125].

*H. pylori*'nin tanısına yönelik PCR temelli testlerde değişken tanısal doğruluk değerlerine sahip UreA, glmM, UreC, 16S rRNA, 23S rRNA, Hsp60 ve VacA gibi farklı hedef genler kullanılmaktadır [114, 116, 125]. Hsp60 gibi korunmuş genleri hedef alan nested ve semi-nested PCR teknikleri, duyarlılığı ve özgüllüğü %100'e çıkarmaktadır [126]. Biyopsi temelli kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile aynı zamanda patojenetik genlerin ve klaritromisine veya

florkinolona dirençli suşlarda olduğu gibi antimikrobiyal dirençle ilişkili spesifik mutasyonlar belirlenebilmektedir. Fosfoglukosamin mutasyonunu kodlayan glmM (üreC) geni, PCR ile *H. pylori* tespiti için üstün sonuçlar vermiştir. Varsayılan virülans faktörünü, vakuolating sitotoksini kodlayan vacA geni, %99'u aşan PCR saptama hassasiyeti ile mükemmel sonuçlar verdiği de belirlenmiştir [127, 128]. Gastrik biyopsi örneklerinin dışında, diş plağı, tükürük, idrar, dışkı veya mide suyu gibi noninvaziv olarak elde edilen numunelerde de *H. pylori* DNA'sının saptanması PCR yöntemi ile sağlanmaktadır. Farklı hedef gen sekansları karşılaştırıldığında farklı pozitif ve negatif prediktif değerler elde edilmektedir. Bu sebeple, testin özgünlüğünü artırmak için özellikle noninvasiv örneklerde iki farklı gen bölgesi de birlikte değerlendirilmekte ve bu da yanlış pozitif sonucu önlemektedir. Daha az bakteri yükü içeren örneklerde *H. pylori* tanımlanmasını ve daha hızlı sonuçlar elde edilmesi ile klinisyenlerin hastanın tedavisi hakkında daha hızlı ve daha doğru karar vermesini sağlaması PCR'nin diğer avantajlarını oluşturmaktadır. Ayrıca RT-PCR ile antibiyotik direncine neden olan nokta mutasyonlarını saptanabilir, genotip-fenotip ilişkileri üzerine epidemiyolojik çalışmalar ve moleküler araştırmalar için ek bilgi sağlanabilir [114, 126, 127].

### **Hızlı Üreaz Testi**

Hızlı üreaz testi *H. pylori*'nin sahip olduğu üreaz enzimi tarafından gerçekleştirilen reaksiyona dayanmaktadır. Endoskopi sırasında alınan antral biyopsi örneklerinde uygulanan test *H. pylori* üreaz aktivitesinin tespiti prensibine dayanmaktadır. *H. pylori* üreaz enzimi üreyi hidrolize ederek CO<sub>2</sub> ve NH<sub>3</sub> açığa çıkmasını sağlar. Amonyak salımı test ortamının pH değerini arttırarak ve ortamın renginin pembeye dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu renk değişimi ile ortamda *H. pylori* varlığı tespit edilebilmektedir [129]. Biyopsi örneklerinden *H. pylori* tanısında kullanılmak üzere geliştirilmiş jel bazlı (CLOtest, HpFast), kağıt bazlı (PyloriTek, ProntoDry) ve sıvı bazlı (UFT300, EndoscHp) olarak bir çok ticari üreaz testi mevcuttur. Ticari hızlı üreaz testlerinin sonuç sağlamak için farklı reaksiyon süreleri vardır. CLOtest ile doğru sonuç almak genellikle 24 saat sürerken, PyloriTek ile 1 saatte, UFT300 hızlı üreaz testi ile ise 5 dakikada sonuç almak mümkündür. Biyopsi örneğinde bulunan bakteri yoğunluğu hızlı üreaz testi ile sonuç alma süresini ve tanısal doğruluğu

etkilemektedir. Pozitif bir hızlı üreaz testi sonucu için genellikle en az 10000 organizma gereklidir [114]. Hızlı üreaz testlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü bakteri miktarına bağlı olarak değişmektedir. Antibiyotik, PPI gibi ilaçların kullanımı bakteri yoğunluğunu azaltacağından yanlış negatif sonuçlar hızlı üreaz testi ile alınabilmektedir. Kağıt temelli iki ticari kit ile yapılan çalışmada; tedavi öncesi bakteri yoğunluğu fazla iken kitlerin %90'ın üzerinde duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu ancak terapi sonrası bakteri yoğunluğu azaldığından, kitin duyarlılığının %60'a düştüğü belirlenmiştir [130]. Genel olarak bakıldığında hızlı üreaz testlerinin duyarlılığı %80 ile %100 arasında, özgüllüğü ise %97 ile %100 arasında değişmektedir [113, 129, 131].

Üreaz testlerinin tanısal doğruluğunu etkileyen antibiyotik, PPI gibi ilaçların yanı sıra H<sub>2</sub> reseptör antagonistleri, bizmut bileşikleri, aklorhidri ve kan varlığını da yanlış negatif sonuç olasılığını artırmaktadır. Bakterinin spiral ya da kokoid formda olması da tanısal doğruluğu etkilemektedir. Biyopsi örneklerinin formalin kontaminasyonu da hızlı üreaz testlerinin duyarlılığını azaltmaktadır. Ayrıca, hastada aklorhidri durumunda *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pnömoni*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae* gibi diğer üreaz pozitif bakterilerin varlığı da yanlış pozitif sonuçlara sebep olabilir. Ancak *H. pylori* enfeksiyonunun tanısındaki düşük maliyeti, kolaylığı ve hızı hızlı üreaz testine kültür ve histoloji konusunda üstünlük sağlamaktadır [129-131].

## 2.9.2 İnvaziv olmayan yöntemler

### Üre Nefes Testi

Endoskopi yapılmasını gerektirmeyen bir yöntem olan üre nefes testi, aktif enfeksiyonların teşhisinde ve devam eden tedavilerde takip amaçlı kullanılan basit ve yüksek tanısal doğruluk göstermektedir [129]. Bu test birçok uzman tarafından en güvenilir non-invaziv test olarak kabul edilmektedir. Test uygulanacak kişilere stabil <sup>13</sup>C veya radyoaktif <sup>14</sup>C karbon izotopu içeren bir miktar üre verilmektedir. Eğer *H. pylori* varsa, bakterinin sahip olduğu üreaz ile üre <sup>13</sup>C işaretli veya <sup>14</sup>C işaretli CO<sub>2</sub> ve NH<sub>3</sub>'e hidrolize olur. İşaretli izotopları içeren CO<sub>2</sub> molekülleri kana difüze olur ve akciğerlerden ekshalasyonu yapılır. İzotop kütle oranı veya kızılötesi spektrometrisi kullanılarak ekshale edilen havadan tanı koyulmaktadır [129, 132].

*H. pylori* tanısı için üre nefes testi uygulanan çalışmalarda % 95'e yakın oranlarda yüksek duyarlılık ve özgüllük tespit edilmiştir [133]. Best ve arkadaşları, *H. pylori*'nin teşhisinde kullanılan noninvasiv testler olan üre nefes testi seroloji ve dışkı antijen testlerinin tanısal doğruluğunu incelemişlerdir. *H. pylori* için duyarlılıkları 13C-üre nefes testi, 14 C-üre nefes testi, seroloji ve dışkı antijen testi için sırasıyla %94, %92, %84 ve %83 olarak belirlenmiştir. Bu test karşılaştırma çalışmasına bağlı olarak, araştırmacılar gastrektomi öyküsü olmayan ve yakın zamanda antibiyotik veya PPI almayan kişiler için üre nefes testlerinin seroloji ve dışkı antijen testine kıyasla daha yüksek tanısal doğruluk oranlarına sahip olduklarını öne sürmüşlerdir [134].

### **Serolojik Yöntemler**

Serolojik testler, doğruluğu, düşük maliyeti ve kullanılabilirliği nedeniyle *H. pylori* enfeksiyonu tanısı için rutin uygulamada en sık kullanılan testlerdir. Serolojik testlerin tedavi alan (proton pompa inhibitörleri ve antibiyotikler) veya akut kanama gösteren hastalarda yanlış negatif sonuçlar üretmemeleri gibi avantajları da vardır. Serolojik testler hastanın serumundaki anti-*H. pylori* IgG'lerin varlığının saptanmasına dayanmaktadır. Ayrıca, serolojik testler ile tükürükte IgA veya idrarda IgG varlığını da tespit edilebilmektedir. Testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü kullanılan antijene, klinik ortama, karşılaştırıcı olarak kullanılan altın standarda ve toplumda *H. pylori* prevalansına bağlıdır. Genel olarak, duyarlılık (çoğunlukla ELISA tabanlı format için) %90 ile %97 arasında ve özgüllük %50 ile %96 arasında bildirilmiştir [135].

Günümüzde seroloji ilk tarama için ve tedaviden önce histoloji ve/veya kültür yöntemleri ile onaylanması önerilmektedir [136]. Serolojik testlerin en önemli dezavantajı, aktif enfeksiyon ile daha önce *H. pylori*'ye maruz kalma arasında ayırım yapamamalarıdır. Uzun süreler boyunca *H. pylori* enfeksiyonuna sahip fakat tedavi edilen kişilerin kanında yüksek antikor seviyeleri görülmeye devam edebilir. Bu nedenle, bir popülasyonda *H. pylori* için başarıyla tedavi edilen hasta sayısı arttıkça, seroloji ile yanlış pozitif testlerin yaygınlığı da artmaktadır [135]. Ayrıca, *H. pylori* antikor seviyeleri önemli ölçüde kalıtsaldır. Böylece, insan konağın bireysel genetik farklılıkları *H. pylori* antikor düzeylerini önemli ölçüde etkilemektedir [136].

*H. pylori*'nin tespiti için antikor bazlı testler kolayca üretilebilmektedir, ancak aynı zamanda yüksek negatif prediktif değerler sunmaktadırlar. Bunun nedeni serolojik testlerin doğruluğunun, ticari kitte kullanılan antijene ve antijen kaynağı olarak kullanılan spesifik *H. pylori* suşlarının testin uygulandığı popülasyondaki yaygınlık oranına bağlı olmasıdır. Bu durumun üstesinden gelebilmek için *H. pylori* suşlarında korunan yüksek moleküler ağırlıklı hücre ile ilişkili antijenler testlerde kullanılmaktadır. Enfeksiyonu tespit etmek için aday olarak CagA, VacA, UreA, Omp, Omp18, FlidD, HcpC ve GroEL gibi çeşitli immünojenik proteinler kullanılmıştır [114, 135, 137]. *H. pylori* enfeksiyonunun serolojik tanısı için altı yüksek derecede immünojenik virülans faktörü (CagA, VacA, GroEL, gGT, HcpC ve UreA) içeren, recomLine *H. pylori* IgG testi histoloji ile karşılaştırıldığında, sırasıyla %97,6 ve %96,2 duyarlılık ve özgüllük gösterdiği belirlenmiştir [138]. Fonksiyonel flagella'nın bir araya getirilmesinde önemli bir element olan *H. pylori* FliD proteini serolojik testlerde kullanılmak amacıyla incelenmiş ve %99 duyarlılığa ve %97 özgüllüğe sahip olduğu belirlenmiştir [139].

### **Dışkı Antijen Testi**

Dışkı antijen testi, genellikle üre nefes testi mevcut olmadığında *H. pylori*'yi saptamak için önerilen noninvaziv bir yöntemdir. *H. pylori* enfeksiyonunun tanısında yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip enzim immünoanalizine ve immünokromatografiye dayanan iki tür dışkı antijen testi vardır [140]. Ancak yapılan son çalışmalarda enzim immünoanalizine dayanan testlerin immünokromatografi temelli testlere göre daha güvenilir sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, immünokromatografi temelli testlerin yapılması daha kolaydır ve özel ekipman gerektirmemesi sebebiyle *H. pylori* enfeksiyonunun hızlı tanısı için avantajlıdır [141]. Dışkı antijen testleri ayrıca çocuklarda ve gastrik cerrahi sonrası hastalarda *H. pylori* enfeksiyonu tanısında da faydalıdır. Dışkı örnekleri şekilsiz veya sulu olduğunda *H. pylori*'ye özgü antijenlerin örnekte seyrelmesi nedeniyle testlerin doğruluğu düşmektedir. Sıcaklık ve dışkı örneği toplanması ile ölçümü arasındaki aralık da dışkı antijen testinin sonuçlarını etkilemektedir [116, 141]. Buna rağmen global incelenen bir meta-analizde *H. pylori*

enfeksiyonunun tanısında dışkı antijen testlerinin duyarlılığı %94 ve özgüllüğü %97 olarak belirlenmiştir [142].

İlk geliştirilen dışkı antijen testleri poliklonal antikorlara dayanmaktaydı. Poliklonal testler *H. pylori* enfeksiyonu tanısı için güvenilir sonuçlar sağlamaktadır. Ancak, bazı çalışmalarda eradikasyon sonrası değerlendirmede yanlış pozitif sonuçlar gözlemlenmiştir. Monoklonal dışkı antijen test kitlerinin duyarlılığı poliklonal testlere göre daha yüksektir [113, 140, 143]. Gisbert JP ve ark. meta-analizde monoklonal antikorlara dayanan dışkı antijen testlerinin özgüllüğünün 0.97 (%95 CI: 0.96-0.98) olduğunu göstermiştir [142].

### **2.10 *Helicobacter pylori*'nin Tedavisi**

*H. pylori*'nin mevcut tedavisi amoksisilin, klaritromisin, metronidazol ve levofloksasin gibi antimikrobiyal ajanların ve proton pompası inhibitörleri gibi antisekretuar ajanların kombinasyonuna dayanmaktadır [8]. Bununla birlikte antibiyotik dirençliliği gibi nedenlerden ötürü *Helicobacter pylori*'nin ortadan kaldırılması oldukça zordur. Bu nedenle, tedavide genellikle iki veya daha fazla antibiyotik, bir PPI ve/veya bizmut içeren bileşiklerle birlikte kullanılmaktadır [80]. Mevcut klinikte kullanılan antibiyotik rejimleri arasında klaritromisin bazlı üçlü tedavi, bizmut bazlı dördümlü tedavi, eşzamanlı tedavi, ardışık tedavi, ve levofloksasin bazlı tedaviler yer almaktadır.

#### **2.10.1 Tedavide Kullanılan İlaçlar**

*Helicobacter pylori* enfeksiyonunun tedavisinde klaritromisin ve eritromisin gibi makrolidler; metronidazol ve tinidazol gibi nitroimidazoller; amoksisilin ve ampisilin gibi penisilin türevleri; tetrasiklinler tercih edilmektedir. Antibiyotiklerin, özellikle antibiyotik dirençliliği nedeniyle tedavide tek başına kullanımlarında eradikasyon oldukça düşüktür. Bu nedenle antibiyotikler çoklu, bizmut tuzlarıyla ve proton pompa inhibitörleriyle birlikte kullanılmaktadır.

**Klaritromisin:** Klaritromisin, yarı sentetik, aside dayanıklı ve yapısal olarak eritromisine benzer bir makrolid antimikrobiyal ilaçtır. Makrolidler, 23S ribozomal RNA'nın V bölgesinin peptidil transferaz döngüsüne bağlanarak etki eder, böylece aminoasil transfer-RNA'nın translokasyonunu ve ardından protein sentezini inhibe

ederek etki gösterir. Klaritromisin iki şekere bağlı 14 üyeli bir lakton halkasından oluşur ve lakton halkasının 6. pozisyonunda O-metil varlığı ile eritromisinden yapısal olarak farklıdır. Bu durum asit stabilitesi ve geliştirilmiş antimikrobiyal ve farmakokinetik özellikler sağlamaktadır. Klaritromisin, gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmaları, atipik patojenleri ve anaerobları inhibe edebilmektedir [144].

**Amoksisilin:** *Helicobacter pylori*, hem in vivo hem de in vitro olarak amoksisiline oldukça duyarlıdır. Penisilin türevi olan amoksisilin, bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakteri ölümüne yol açar. Ayrıca amoksisilin, mide mukozası seviyesinde topikal intralüminal aktiviteye ve sistemik aktiviteye sahiptir [145].

**Tetrasiklin:** Tetrasiklin, *H. pylori*'nin birinci basamak tedavisinde diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Düşük pH'ta stabildir ve amoksisilin gibi topikal bir ajan olarak *H. pylori*'ye karşı aktiviteye sahiptir. Tek başına kullanıldığında tetrasiklin, *H. pylori* enfeksiyonunu ortadan kaldıramaz; ancak *H. pylori* direnç gelişimi nadirdir. Bu sebeple çoklu antibiyotik tedavilerinde tercih edilmektedir [145].

**Metronidazol:** Metronidazol, esas olarak anaerobik ve parazitik enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir nitroimidazoldür. Ancak metronidazol, *H. pylori*'ye karşı da aktiftir ve biyoyararlanımı asit baskılamasından etkilenmemektedir. Avrupa *Helicobacter* Çalışma Grubu, her bölgedeki özgül direnç oranına göre *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisinde seçenek olarak metronidazol bazlı üçlü bir terapi kullanılmasını tavsiye etmiştir [146].

**Bizmut Tuzları:** Bizmut tuzları, 200 yıldan uzun süredir tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır. Bizmut, organizmanın hücre duvarını bozarak topikal olarak ve *H. pylori*'ye karşı antimikrobiyal bir ajan olarak hareket eder. Ek olarak, bizmut, *H. pylori*'nin mide epiteline yapışmasına müdahale etmenin yanı sıra organizmanın üreazını, fosfolipazını ve proteolitik aktivitesini inhibe edebilmektedir [145].

## **2.10.2 Birinci Basamak *Helicobacter pylori* Tedavisi**

### **2.10.2.1 Klaritromisin Bazlı Üçlü Tedavi**

Klaritromisin, amoksisilin (veya penisilin alerjisinde metronidazol) ve PPI içeren klaritromisine dayalı 14 günlük üçlü tedavi birinci basamak tedavi olarak adlandırılmaktadır. Ancak artan antibiyotik direncine bağlı olarak bu tedavi önerisi revize edilerek günümüzde sadece <%15 bilinen direnç prevalans oranına sahip bölgelerde ve daha önce makrolid kullanmamış hastalarda birinci basamak tedavi olarak kullanılması önerilmektedir [147]. Klaritromisine dayalı üçlü tedavi, Avrupa *Helicobacter* ve Mikrobiota Çalışma Grubu'nun (EHMSG) yayınlanmış uluslararası kılavuzlarında düşük klaritromisin direncinin olduğu bölgelerde standart tedavi olmaya devam etmektedir [148].

### **2.10.2.2 Bizmut Bazlı Dörtlü Tedavisi**

Bizmut, metronidazol, tetrasiklin ve bir PPI'dan oluşan bizmut dörtlü tedavi halihazırda ACG and Maastricht V/Florence konsensüs kılavuzlarına göre 10-14 gün boyunca birinci basamak ampirik tedavi olarak önerilmektedir. Bu tedavi rejimi, özellikle klaritromisin direncinin tedavi açısından elverişsiz oranlarının olduğu bölgelerde tercih edilmektedir [147]. Geçmişte bu rejim ikinci basamak tedavi olarak öneriliyordu. Ancak klaritromisin direncinden etkilenmediği için dirençli bölgelerde tedavi seçenekleri arasında belirgin bir avantaja sahiptir. Bu nedenle, bizmut dörtlü tedavi ve eşzamanlı tedavi, klaritromisine yüksek dirençli bölgelerde ve antibiyotik tedavisi öyküsü olan kişilerde birinci basamak ampirik tedavi olarak önerilmektedir. Düşük klaritromisin direncinin olduğu bölgelerde, bunun yerine 14 günlük klaritromisin üçlü tedavisi kullanılabilir [149].

### **2.10.2.3 Ardışık Tedavi**

Ardışık tedavi, 5 günlük ikili terapi (PPI ve amoksisilin) ve ardından 5 günlük üçlü terapiden (PPI, klaritromisin ve tinidazol) oluşan 10 günlük bir eradikasyon rejimi olarak tanımlanmaktadır [150]. İtalya'da Zullo ve ark. tarafından yürütülen prospektif kontrollü bir çalışmanın sonuçlarında, ardışık tedavinin hem tedavi amaçlı (ITT; % 92'ye karşı % 74, P <0.0001) hem de protokol başına (PP; %95'e karşı %77, P <0.0001) standart rejimden önemli ölçüde daha yüksek eradikasyon

oranlarına ulaştığı belirtilmiştir. Sıralı tedavinin klaritromisine dirençli *H. pylori* suşları olan hastalarda daha etkili olduğu da kanıtlanmıştır [151]. Sıralı terapi, birinci basamak *H. pylori* olarak mevcut ana akım PPI tabanlı üçlü tedavinin yerini alacak güçlü bir rakip gibi görünmektedir. Bununla birlikte, sıralı tedavinin karmaşık dozajının kötü uyumla sonuçlanabileceği de düşünülmektedir.

#### **2.10.2.4 Eş Zamanlı Tedavi**

Bizmut dışı dörtlü rejim veya eş zamanlı rejim kavramı olarak adlandırılan tedavi yöntemi geleneksel standart üçlü terapiye (PPI-klaritromisin-amoksisilin) amoksisilin, metronidazol veya tinidazol ilavesiyle kolayca eş zamanlı tedaviye dönüştürülebilmektedir. Üçlü rejimin tedavideki başarısı bakteri yükü ile ters orantılıdır ve midede düşük bakteri yoğunluğu olan hastalarda daha yüksek eradikasyon oranları elde edilmektedir. Eş zamanlı tedavide amoksisilin üçlü tedaviyle birlikte kullanılmasının midede bakteri yükünü azalttığı ve bunun sonucunda kısa süreli üçlü tedavinin etkinliğinde iyileşme sağlandığı bilinmektedir [152].

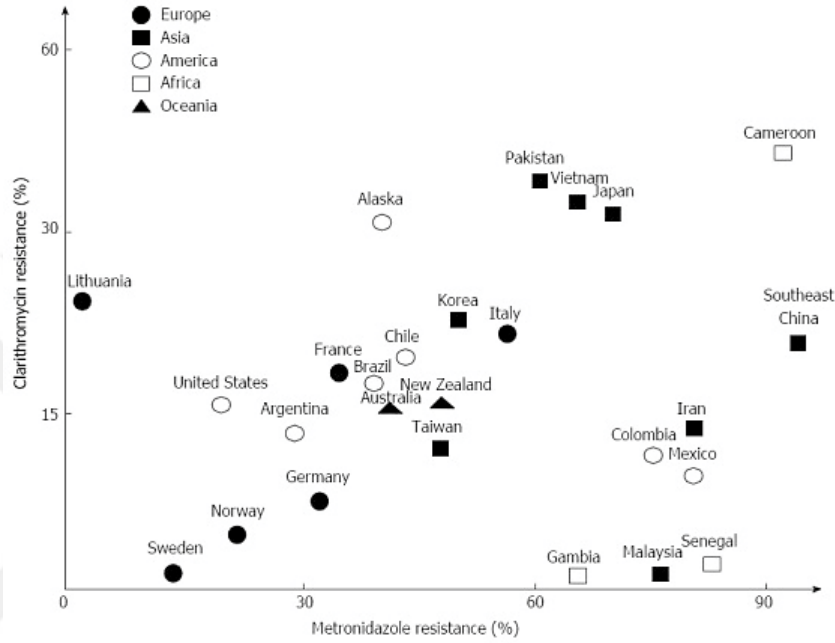
#### **2.10.3 İkinci Basamak *Helicobacter pylori* Tedavisi**

Birinci basamak tedavinin başarısızlıkla sonuçlandığı durumlarda ikinci basamak tedavinin, ilk tedavide kullanılan antibiyotikleri içermemesi beklenir. Geniş spektrumlu kinolon türevi bir antibiyotik olan levofloksasin üçlü tedaviden bir sonraki tedavi seçeneği olarak düşünülmüştür. PPI + levofloksasin ve amoksisilinden oluşan üçlü levofloksasin tedavisi bizmut dörtlü tedavi başarısızlığından sonra önerilmektedir [149]. İkincil kinolon direncinin hızlı gelişmesi nedeniyle, levofloksasinin birinci basamak kullanımı genellikle tavsiye edilmez ve ilaç, klaritromisin ve/veya metronidazol bazlı rejimlerin başarısızlığından sonra ikinci basamak rejimlerde kullanılmaktadır [153].

#### **2.11 Antibiyotik Dirençliliği**

Özellikle 2000 yılından bu yana, *H. pylori* eradikasyon oranları, bir veya daha fazla antibiyotiğe karşı artan direnç nedeniyle düşmektedir [154]. *H. pylori*'de antibiyotik direnci gelişiminin ana mekanizmaları; antibiyotiklerin ribozomlara bağlanmalarını engelleyen ve DNA replikasyonunu, transkripsiyonunu etkileyen, peptidoglikan

biyosentezinde rol alan penisilin bağlayıcı proteinleri modifiye eden protein sentezine müdahale etme kapasitesini bozan mutasyonlardır [155]. *H. pylori* tedavisinde en önemli antibiyotikler klaritromisin, metronidazol ve amoksisilindir. Şekil 2.7, dünya çapında yakın zamanda bildirilen klaritromisin ve metronidazole direnç oranlarını göstermektedir. Bu antibiyotiklere direncin eradikasyon başarısızlığının ana nedeni olduğu düşünülmektedir [11].



Şekil 2.7 Klaritromisin ve metronidazolun dünya çapında direnç oranları [11]

*H. pylori*'nin antibiyotik direncini etkileyen, yaş ve cinsiyetin yanı sıra konakçı hastalık durumu ve patojenlerin taşıdığı virülans faktörleri gibi birçok faktör vardır. *H. pylori* tarafından salgılanan virülans faktörlerinin mide hastalıklarında farklı klinik sonuçlarla yakından ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Sitotoksin ile ilişkili gen A, *H. pylori*'nin en yaygın virülans faktörüdür. Bazı çalışmalarda cagA+ olan hastalarda klaritromisin direnç oranının cagA- hastalardan daha yüksek olduğunu gösterilmiştir, ancak farklı çalışmalarda ise cagA+ hastalarında eradikasyon oranının cagA- olanlardan anlamlı derecede daha yüksek olduğu da gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu faktörlerin *H. pylori*'nin antibiyotik direnci ile ilişkisini net olarak açıklayan çalışmalar yetersizdir [156].

Klaritromisin, bakteriyel ribozoma bağlanarak ve bunların etkilerini yavaşlatarak protein sentezini inhibe eden bir makrolid antibiyotiktir. Klaritromisin direnci, 23s

rRNA genindeki A2142C, A2142G ve A2143G'deki üç nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Klaritromisin direnci bölgeye göre farklılık göstermektedir. Japonya'da yayınlanan bir çalışmada, 2002'de klaritromisine direnç oranı %18,9 iken, 2006 yılında klaritromisine direnç oranının %27,2'ye yükseldiği belirtilmiştir [157]. Üçüncü basamak eradikasyon tedavisi ile bile, Japonya'da klaritromisine direnç oranları %86,4 olarak bildirilmiştir [158]. Özellikle klaritromisin direnci birçok ülkede hızla artarak Çin'de %50'ye kadar yükseldiğini gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur [156]. Bununla birlikte, *H. pylori*'nin klaritromisine direncinin dünya çapında yaygınlığı oldukça değişkendir. Asya'da %85,5; Avrupa'da %72,4; Amerika'da %70,6; Afrika'da %29; ve Okyanusya'da %9'a kadar direnç oranları belirtilmiştir. Batı Asya'da klaritromisine direnç İran'da %10 ve üzeri, Türkiye'de ise %20 ve üzeri olarak bildirilmiştir. Bir çalışmada, Türkiye'deki dispepsi hastalarının %47,5'inde klaritromisin direnci bildirilmiştir [11]. Bazı bölgelerde, klaritromisine direnç oranının oldukça yüksek olduğu ve zamanla arttığı bilinmektedir. Direnç oranlarının %15'in üzerinde olduğu tüm bu bölgelerde klaritromisin üçlü tedavisi yerine ya bizmut dördütlü tedavi ya da eş zamanlı tedavi kullanılması önerilmektedir [149].

Metronidazol ve tinidazol, nitro radikal anyonlarının oluşumu yoluyla bakteriyel DNA'ya zarar veren bakterisidal nitroimidazol antibiyotiklerdir. *H. pylori*'nin metronidazole karşı birincil direnç mekanizması, elektron taşıma proteinlerinin azalmış aktivitesinin neden olduğu imidazol azalmasındandır [159]. Metronidazol direnci, standart üçlü rejimin tedavi etkinliğini de büyük ölçüde azaltması sebebiyle önemlidir. Genel olarak, metronidazol direnç oranları birçok Avrupa ülkesinde artmaktadır. Avrupa'da direnç %14 ila %33 arasında değişmektedir. *H. pylori*'de birinci basamak antibiyotiklere karşı artan direnci artırmaya yönelik genel eğilim, tedavi eden doktorları PPI ve bizmut tuzu içeren tetrasiklin veya levofloksasin veya rifabutin bazlı tedavi rejimleri gibi alternatif tedavi rejimleri reçetelemeye teşvik etmiştir [12].

Florokinolon direncinin yaygınlığı kapsamlı bir şekilde çalışılmamış olsa da *H. pylori*'de levofloksasin direnci zamanla arttığı bilinmektedir. Levofloksasin dahil florokinolonlar, bakteriyel DNA replikasyonunu inhibe eden bakterisidal

antibiyotiklerdir. *H. pylori* izolatlarının çoğu başlangıçta florokinolonlara duyarlı olmasına rağmen, *H. pylori*'deki florokinolonlara direnç nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır [159]. *H. pylori*'de levofloksasin direnci dünya çapındaki yaygınlığı klaritromisin ve metronidazole kıyasla düşüktür (%0-20) [12].

Amoksisilin, orta spektrumlu bir bakterisidal penisilin türevi antibiyotiktir. *H. pylori*'deki amoksisilin direncinin birincil mekanizmaları, penisilin bağlayıcı proteinlerin değişmesi veya hücre zarı geçirgenliğinin azalmasıdır. *H. pylori* amoksisilin direncinin dünya çapında yaygınlığının, bu antibiyotiğin reçetesiz elde edilebildiği coğrafi bölgelerde daha yüksek seviyelerde olmasına rağmen, oldukça değişken (% 0-30) olduğu bildirilmiştir [159].

Tetrasiklin, protein sentezini ve bakteri büyümesini engelleyen bakteriyostatik bir antibiyotiktir. *H. pylori*'de, tetrasikline karşı birincil direnç mekanizmasını, tetrasiklinin birincil bağlanma bölgesindeki gen mutasyonları oluşturmaktadır [159]. *H. pylori*'de tetrasiklin direncinin dünya çapında yaygınlığı fazla değildir. Tetrasiklin, Doğu Avrupa ve Asya ülkelerinde %5 ile %19 arasında değişen direnç oranlarına sahiptir. Asya'da %32,4'e ve Amerika'da ise %3,9'a varan oranlarda dirençlilik tespit edilmiştir [12].

*Helicobacter pylori*'nin klaritromisin, metronidazol veya levofloksasin antibiyotik dirençliliğinin çoğu ülkede yaygın olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, amoksisilin ve tetrasiklin karşı dirençlilik daha düşüktür. Ancak, tedavide tek başına kullanımda etkili olmadıkları bilinmektedir. Bu nedenle, *H. pylori*'ye yönelik klaritromisin, metronidazol veya levofloksasine *H. pylori* direnci çoğu ülkede yüksek kaldığından, *H. pylori*'yi ortadan kaldırmak için etkili bir rejimin seçimi kritiktir [10].

### **2.12 *Helicobacter pylori*'ye Yönelik Alternatif Tedavi Yaklaşımları**

*H. pylori* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan başlıca ajanlar antibiyotikler iken, direnç gelişimi antibiyotiklerin uygulamalarını sınırlamaktadır. Ayrıca antibiyotik kullanımı, insan mide-bağırsak yolunda kolonileşen mikroorganizmaların oluşturduğu mikrobiyotayı bozmakta ve böylece ishal gibi yan etkilere neden olmaktadır [160]. Antimikrobiyal direncin yanı sıra tedavideki başarısızlığın bir diğer nedeni de hastanın tedaviye uyumsuzluğudur. Hastanın tedaviye uyum

göstermemesi, düşük bakteri eradikasyon oranlarını açıklayan temel bir faktördür. Uzun süre tekrarlayan dozlarda uygulanan en az üç ilacı içeren tedavinin karmaşıklığının hastanın tedaviye uyum göstermemesinin nedeni olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, *H. pylori* enfeksiyonunun başarılı bir şekilde ortadan kaldırıldıktan sonra nüksetmesi, tedavilerin etkinliği açısından bir sorun teşkil etmektedir [21]. Bu sorunlar dikkate alındığında antibakteriyel aktiviteye sahip yeni moleküller ve hastaların tedavilere uyum saplamasına yardımcı olan adjuvanlar bulmak için yeni terapötik yaklaşımların gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisi için probiyotikler, bitkisel ekstraktları ve fraksiyonlarını içeren fitoterapi gibi alternatif tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir.

### 2.12.1 Probiyotikler

Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, probiyotikler "yeterli miktarlarda alındıklarında konakçıya yarar sağlayan canlı mikroorganizmalardır" [21]. *H. pylori*'nin tedavisinde probiyotiklerin monoterapi olarak veya antibiyotiklerle kombinasyon halinde kullanılması aktif bir araştırma alanıdır. Probiyotiklerin *H. pylori* ile enfekte kişilerde kullanımı ya bağışıklık tepkisini uyularak ya da patojenik bakterilerle doğrudan rekabet ederek patojenik bakteri enfeksiyonunu önleyebilir. Ayrıca, probiyotikler antibiyotiklerin neden olduğu yan etkileri önleyebileceğine ve eradikasyon oranlarını artırabileceğine yönelik çalışmalar literatürde mevcuttur.

Mide, *H. pylori* enfeksiyonuna enflamatuar yanıt, kemokinler ve sitokinler gibi çeşitli enflamatuar aracılardan salınımı ile karakterize edilir. Probiyotikler, anti-enflamatuar sitokin sekresyonunun modülasyonu yoluyla immünolojik yanıtı değiştirebilir, bu da mide aktivitesinin ve inflamasyonun azalmasına neden olur [161]. Probiyotiklerin, bakterilere karşı ilk savunma hattı olan mide asiditesi ve mide mukozası bariyerinde adezyon reseptörleri için *H. pylori* ile rakabete girmesi nedeniyle müsin üretimini uyarabileceği ve bağırsak mukozal bariyerini stabilize edebileceği de düşünülmektedir. *H. pylori*'nin insan mide hücre hattında MUC1 ve MUC5 gen ekspresyonunu baskıladığı bilinmektedir [162]. *L. plantarum* ve *L. rhamnosus* gibi probiyotiklerle yapılan çalışmalarda, probiyotiklerin MUC2 ve MUC3 genlerinin ekspresyonunun arttırdığı ve kolon hücre kültürleri tarafından müsinin

hücre dışı salgılanmasının patojenik bakterilerin yapışmasını inhibe edebileceği in vitro gösterilmiştir. Bu türlerin bu yeteneği, mide mukozasının mukozal geçirgenliğini geri kazandırarak *H. pylori* gibi patojenik bakterilerin yapışmasını engellemektedir. Ayrıca, probiyotikler salgıladıkları laktik asit ve bakteriyosinler ile de *H. pylori*'nin yapışmasını engelleyebilir [163]. Probiyotikler, kısa zincirli yağ asitleri ve antibakteriyel maddeler salgılayarak *H. pylori* büyümesini de engelleyebilirler. Asetik, propiyonik ve laktik asitler gibi kısa zincirli yağ asitleri, probiyotikler tarafından karbonhidrat metabolizması sırasında üretilir ve bunun sonucunda bir pH düşüşüne neden olurlar. *H. pylori*'nin aktivitesi üreaza ve dolayısıyla pH'a bağlı olduğundan pH düşüşü *H. pylori*'nin çoğalmasını engeller [164]. 1989'da Bhatia ve ark., bir *Lactobacillus* suşunun, kısa zincirli yağ asitlerine bağlı olarak *H. pylori*'ye karşı antagonistik etkisini gözlemleyen ilk gruptur. Bazı *Lactobacillus* türleri, bakteriyosin sınıflarıyla ilgili antimikrobiyal bileşikler sentezler. Bakteriyosinler, potansiyel anti-*H. pylori* aktivitesi içeren antimikrobiyal aktiviteye sahip küçük ve diyalize edilebilir peptit yapılarıdır [165].

Farklı probiyotiklerin *H. pylori*'ye karşı olumlu etkisini göstermek için in vitro ve in vivo olarak hayvan modellerinde ve ayrıca klinik deneylerde yapılan çeşitli çalışmalar mevcuttur. *H. pylori* enfeksiyonunun hayvan modellerinde çeşitli probiyotiklerin antibiyotik kullanımını azaltma veya yan etkilerini azaltma potansiyeli ile antibiyotiklere alternatif veya tamamlayıcı olabilecek olumlu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir [166]. Patel ve arkadaşları, yakın zamanda probiyotiklerin *H. pylori* enfeksiyonu üzerindeki etkisini inceleyen in vivo klinik çalışmaları gözden geçirdiler. Antibiyotik ve probiyotik kombinasyonlarının etkinliğini araştıran 12 insan çalışması ve enfeksiyon tedavisi için antibiyotiklere alternatif olarak tek başına probiyotik kullanan 16 çalışma bildirdiler. Sonuçlar, vakaların çoğunda, *H. pylori* gastritinde bir iyileşme ve bakteriyel kolonizasyonda bir azalmanın probiyotik uygulamasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, probiyotik kullanımının antibiyotiklerle ilişkili yan etkileri azaltmaya yardımcı olduğu da yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [167].

Ayrıca probiyotikler, *H. pylori* ile ilgili hastalıkların iyileştirilmesine de yardımcı olabilir. *H. pylori* enfeksiyonunun klinik sonucu, *H. pylori* suşunun tipi, enflamasyon

derecesi ve *H. pylori* kolonizasyonunun yoğunluğu gibi çeşitli faktörlerle belirlenir. Artan enfeksiyon düzeyi ile peptik ülser hastalığı ve mide kanseri gelişme riskinin arttığı bildirilmiştir. Bu nedenle, *H. pylori*'nin kalıcı veya uzun vadeli baskılanması, *H. pylori* ile ilişkili hastalıkların gelişme riskini azaltabilir [160].

### 2.12.2 Bitkiler

Bitkisel ekstraktlar ve yağlar, antik çağlardan beri tedavi edici bileşenler olarak kullanılmış ve kullanımları nesilden nesile aktarılmıştır. Günümüzde de *H. pylori* enfeksiyonu dahil olmak üzere birçok enfeksiyon, kanser vb. hastalıklar için bitkilerin tedavi edici etkinlikleri incelenmektedir [21]. Bitki ekstraktlarının veya bileşiklerinin *H. pylori* üzerindeki etkinliğini inceleyen de birçok çalışma bulunmaktadır. Cogo ve ark., gastrointestinal hastalıkların tedavisinde kullanılan geleneksel olarak kullanılan bitkilerden elde edilen ekstraktların *H. pylori* üzerinde etkinliğini incelemişlerdir. Bu amaçla, *Bixa orellana* L., *Chamomilla recutita* L., *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., *Malva sylvestris* L., *Plantago major* L. (Plantaginaceae) ve *Rheum rhaponticum* L. standart (ATCC) ve klinik suşlara karşı anti-Helicobacteriyal etkisi açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlarda, *B. orellana* L., *C. recutita* L. *I. paraguariensis* A. St.-Hil ve *M. sylvestris* L.'den elde edilen ekstraktların, *H. pylori*'nin büyümesini in vitro şartlarda engellediğini gösterilmiştir [168]. Ohno ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise 13 uçucu yağın klinik ve standart orijinli (ATCC) *H. pylori* suşlarına karşı etkisi bildirilmiştir. Çalışmada incelenen bitkilerden *Cupressus sempervirens*, *Juniperus communis*, *Melaleuca alternifolia*, *Lippia citriodora*, *Ocimum basilicum*, *Mentha piperita*, *Origanum majorana*, *Eucalyptus globulus*'tan elde edilen yağların test edilen tüm suşlara karşı antibakteriyel aktivitesi olduğu belirtilmiştir [169].

Fenolik bileşikler, bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Yapılan birçok çalışmada fenolikler, polifenoller, flavonoidler, kinonlar, kumarinler, terpenoidler, alkaloidler gibi bitkisel bileşenlerin antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir [22]. Polifenoller kimyasal yapılarına göre flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olarak iki sınıfa ayrılır. Flavonoidlerin ortak yapısı, difenil propanlardan oluşan bir karbon iskeleti ve doğrusal üç karbonlu bir zincirle birleştirilen iki benzen halkasıdır. Piran halkası (C halkası), bir A benzen halkası ve merkezi bir üç karbon zinciri tarafından

oluşturulur. Flavonoidler, merkezi piran halkasının oksidasyon derecesine bağlı olarak birçok alt sınıfa ayrılır. Bugüne kadar 8000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır. Moleküler yapısı nedeniyle flavonoidler şu gruplara ayrılabilir: flavonoller, flavonlar, flavanoller, flavanonlar, antosiyanidinler ve izoflavonoidler. Flavonoid olmayanlar gallik veya protokatekuik asit gibi benzoik asit türevlerine, kafeik, ferullik veya kumarik asit gibi sinnamik asit türevlerine ve resveratrol gibi stilbenler olarak ikiye ayrılır [170].

Fenolik bileşiklerdeki yüksek protein bağlanma afinitesine sahip fenolik hidroksil gruplarının varlığı, mikrobiyal enzimleri inhibe edebilir ve aynı anda sitoplazmik membranlara afiniteyi artırabilir, böylece antibakteriyel aktiviteyi arttırabilmektedir [171]. Ayrıca flavanonların B-halkasının 2' ve 4' veya 2' ve 6' pozisyonlarında ve A halkasının 5' ve 7' pozisyonlarında hidroksil varlığının bileşenin antibakteriyel aktivitesini önemli ölçüde artırdığı metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşunda kanıtlanmıştır [172]. Flavonoidlerin ise C halkasının 3' karbonunda hidroksil grubunun varlığının antibakteriyel aktiviteyi arttırdığı bilinmektedir. Ek olarak, yukarı pozisyondaki O-asil veya O-alkil zincirleri de özellikle flavonollerin ve flavanollerin antibakteriyel aktivitesini arttırmaktadır [173]. Antibakteriyel aktivitenin artışı, flavonoidlerin uzun alifatik zincir ikamesi artışı ile doğru orantılıdır. Bu artış, bakteriyel sitoplazmik membran ile etkileşimleri kolaylaştırır ve böylece bu bileşiklerin antibakteriyel aktivitesini artırır. Dahası, proteinlere yüksek afinitesi olan fenolik hidroksil gruplarının varlığı ve mikrobiyal enzim inhibisyonu, flavonoidlerin antibakteriyel etkilerini başka bir mekanizma yoluyla artırabilir [171]. Birçok fenolik bileşenin *H. pylori* için antibakteriyel etkinliği incelenmiş ve oldukça düşük MİK ve MBK değerleri belirlenmiştir. *Rubus ulmifolius* yapraklarından elde edilen bir flavonol olan kaempferolun etkinliği *H. pylori* üzerinde incelenmiş ve MBK değeri 6 µg/mL olarak belirlenmiştir [174]. Ek olarak, *Myroxylon peruiferum*'dan bir izoflavon türeviden olan cabreuvinin *H. pylori* için MİK değeri 7,8 µg/mL olarak bulunmuştur [175].

Kinonlar, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan bileşiklerin önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Bu bileşikler, elektron taşıma inhibitörleri ve oksidatif fosforilasyonun ayırıcıları olarak hareket ederler ve çok

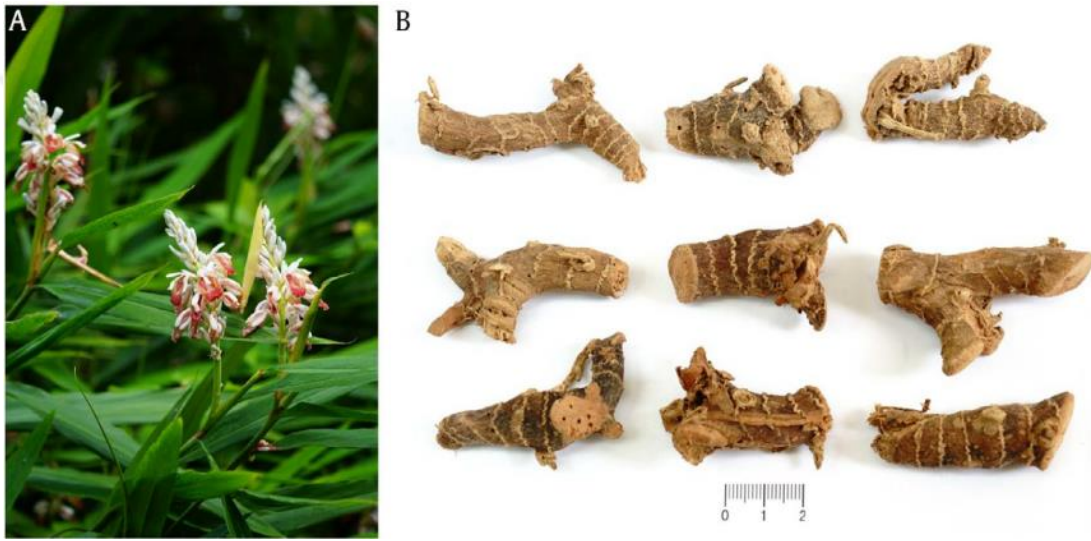
çeşitli sitostatik ve antiproliferatif aktivitelere neden olmaktadır [176]. Kinon alt grubu olan 1,4-Naftokinonlar, hidrofobik ve sterik faktörleri sayesinde (juglon, plumbagin ve lawone) hücre hasarına yol açmaktadır. Yuan-Chuen Wang ve ark. tarafından *Impatiens balsamina L.* tohumunda % 4,39 oranında bulunan ve bir naftokinon türevi olan MeONQ'nun oldukça güçlü antibakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, antibiyotiğe (klaritromisin, metronidazol ve levofloksasin) karşı dirençli *H. pylori* suşlarında, MeONQ için minimum inhibitör konsantrasyonları ve minimum bakterisidal konsantrasyonları sırasıyla 0,156-0,625 ve 0,313-0,625 µg/mL olarak belirlenmiştir [177].

Terpenler, temel yapı taşları olarak 5 karbonlu izopren (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) birimlerinden oluşan büyük hidrokarbon gruplarıdır. Terpenoidler ise fonksiyonel grupların eklenmesi veya çıkarılması ile terpenlerin modifikasyonu sonucu meydana gelen terpen türevleridir. Terpenoidlerin antimikrobiyal aktivitesini sahip olduğu fonksiyonel gruplar belirler. Terpenlerin antibakteriyel etki mekanizmaları büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, Griffin ve ark. yaptığı çalışmada, çoğu terpenoidin mikrobiyal hayatta kalma için gerekli olan oksijen alımı ve oksidatif fosforilasyonu inhibe edebildiğini bildirmiştir [178].

Alkaloidler, güçlü farmakolojik aktivitelere sahip oldukları bildirilen bitki ikincil metabolitleridir. Alkaloidler, bir veya daha fazla nitrojen atomu ve fonksiyonel gruplar içeren heterosiklik yapılardır. Alkaloidler, fonksiyonel gruplara ek olarak bir proton kabul eden nitrojen atomuna ve bir veya daha fazla proton veren amin hidrojen atomuna sahip oldukları için enzimler, reseptörler ve proteinlerle hidrojen bağları oluşturabilirler. Alkaloidlerin hem geleneksel hem de modern tıpta çeşitli farmakolojik aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Alkaloidler, merkezi sinir sistemi uyarıcıları (brusin), antikolinergik ajanlar (atropin), oksitosik ve vazokonstriktör aktivite (ergometrin) ve antimalaryal aktivite gibi birçok farmakolojik özelliğe sahiptir. Ayrıca alkaloidler, hücre bölünmesini etkileyerek, oksijen alışverişini engelleyerek, enzim inhibisyonuyla, bakteriyel membran bütünlüğünü bozarak ve virülans genleri etkileyerek antimikrobiyal aktivite gösterebilirler [179].

### 2.12.2.1 *Alpinia officinarum*

Ülkemizde havlıcan olarak da bilinen *Alpinia officinarum*, zencefilgiller familyasındandır. Kalın, kırmızımsı kahverengi rizomları, çizgisel aküminat süs yaprakları ve salkımlarda gösterişli beyaz çiçekleri olan çok yıllık bir bitkidir [180]. 1000 yılı aşkın süredir Avrupa'da ve Çin'de baharat olarak yaygın kullanılmaktadır. Ayrıca, rizomları, Çin'de mide ağrısını iyileştirmek, soğuk algınlığı tedavisi, dolaşım sistemi rahatsızlıklarında kullanılmaktadır [23]. Yapılan bilimsel araştırmalarda da *Alpinia officinarum*un anti-enflamatuvar, antioksidan, anti-emetik, antibakteriyel ve antikanserojen özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [24].



**Şekil 2.8** *Alpinia officinarum*un morfolojik özellikleri (A: Süs yaprakları ve çiçekleri, B: Rizomları) [24]

Geleneksel tedavide, havlıcan rizomları kaynatılarak, Vietnam'da sindirimi teşvik etmek, mide ağrısı ve sıtmayı tedavi etmek için kullanılmaktadır [181]. Doğu'da soğuk algınlığı enfeksiyonları ve öksürüğün tedavisinde havlıcan ve limon suyu karışımı kullanılmaktadır. Hindistan'da ise havlıcan, parfüm ve deodorantlarda kullanımı nedeniyle değerlidir. Ayrıca, Tayland'da, ezilmiş taze rizomlar %25 alkol ile, saçkıranın ve deri enfeksiyonlarının tedavisinde topikal olarak kullanılmaktadır [182].

*Alpinia officinarum*, uçucu yağlar, flavonoidler, diarilheptanoidler, fenilpropanoidler, glikozitler gibi birçok biyoaktif bileşenlere sahiptir. Uçucu yağlar, tüm bitkinin %1,5'ini oluşturan rizomların ana bileşenlerinden biridir [23]. A.

*officinarum* rizomundaki uçucu yağlar, kan serumundaki nitrik oksit seviyesini ve mide mukozasının mikrosirkülasyonunu iyileştirebilmektedir. 2016'da yapılan bir çalışmada *A. officinarum* uçucu yağlarının nitrik oksit aktivitesini indükleyerek oksijensiz radikalleri ortadan kaldırılmasına fayda sağladığı ve bu sayede mukoza bariyerini güçlendirerek gastrik dokuda ülser oluşumunu engellediği gösterilmiştir [183].

Flavonoidler, flavonoid aglikonları ve glikozitler dahil olmak üzere havlıcanın ana kimyasal bileşenlerindedir. Flavonoidlerden galangin ve 3-O-metil galanginin biyoaktif bir bileşen olduğu yapılan birçok çalışmada kanıtlanmıştır. *A. officinarum*'da yüksek konsantrasyonlarda bulunan flavonoid sınıfının bir üyesi olan galangin, anti-klastojenik, anti-mutajenik, anti-oksidatif ve metabolik enzim düzenleyici biyolojik aktivitelere sahiptir. 3-O-metil galangin ise pankreas lipazı inhibisyonu nedeniyle hipolipidemik bir ajan olarak etkili olabilmektedir [184]. Ayrıca, *A. officinarum*'da bulunan flavonoidler nükleik asit sentezini, hücre membranı geçirgenliğini, ATPaz ve fosfolipaz enzim bağlarını inhibe ederek antibakteriyel etki göstermektedir [185].

Diarilheptanoidler ise havlıcanın ana karakteristik bileşenlerinden biridir. Şimdiye kadar, 43 doğrusal diarilheptanoid, üç siklik diarilheptanoid ve bir diarilheptanoid taşıyan flavonol parçası olmak üzere 48 diarilheptanoid bileşiği havlıcan rizomundan izole edilmiştir [24]. Diarilheptanoidler, antiinflamatuvar, antitümör, kanser önleyici, antiviral, antiemetik ve anti-*H. pylori* etkileri dahil olmak üzere birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir. Haeng-Byung Lee ve ark. *A. officinarum*dan diarilheptanoid 5-hidroksi-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-3-heptanon izolasyonunu gerçekleştirerek anti *H. pylori* aktivitesini incelemiştir. Diarilheptanoidin *H. pylori* ATCC 43504, ATCC 700392 ve ATCC 700824'e karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu sırasıyla 48, 24 ve 24 µg/mL olarak belirlenmiştir [25].

### 2.12.3 Nanopartiküller

Nanoteknoloji, geçen yüzyıldan beri bilinen kısmen yeni sayılabilecek bir araştırma alanıdır. "Nanoteknoloji", Nobel ödüllü Richard P. Feynman tarafından 1959'daki ünlü "There's Plenty of Room at the Bottom" dersinde sunulduğundan beri, bu alanda çeşitli devrim niteliğinde gelişmeler yaşanmıştır. Nanoteknoloji, nano ölçekte çeşitli türlerde malzemeleri içermektedir. Nanopartiküller ise, bir boyutu en az 100 nm'den küçük olan maddeleri içeren 0D, 1D, 2D veya 3D boyutlu geniş bir malzeme sınıfıdır [186].

Nanopartiküller çok çeşitli uygulama alanlarına sahip olmakla birlikte en önemli uygulama alanlarından biri biyoteknolojik uygulamalardır. İşlevselleştirilmiş nanopartiküller, ikili ve hatta üçlü modal görüntüleme için kontrast ajanları olarak hastalıkların tanısında ve hedeflendirilerek ilaç taşıyıcı olarak tedavide kullanılmaktadır. Teranostik nanopartiküller ise hem hastalıkların teşhisi hem de tedavileri için geliştirilmektedir. Ayrıca, tasarlanmış nanopartiküller, kanser immünoterapisindeki uygulamaları dahil olmak üzere farklı aşı formülasyonlarının dağıtımında ve verimliliğinin artırılması için de kullanılmaktadır [187].

Nanopartikül türleri, organik ve inorganik olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Miseller, dendrimerler, lipozomlar, hibrit ve kompakt polimerikler organik; fullerenler, kuantum noktaları, silika ve altın nanopartikülleri ise inorganik nanopartiküllerdir [188]. Miseller, amfifilik moleküllerden oluşan tanısal görüntüleme, ilaç ve gen dağıtımı gibi çeşitli uygulamalarda kullanılan nano yapılarıdır. Miseller, sulu ortamlarda hidrofobik gruplarını yapı içinde gizleyerek hidrofilik grupları açığa çıkarırlar. Suda çözünürlüğü düşük ilaçlar misellerin hidrofobik çekirdeğine yüklenebilirken, amfifilik ilaçlar misel hidrofilik gruplarının yakınındaki ilaç polar gruplarıyla misel amfifilik yapısıyla hizalanırlar. Ayrıca miseller, biyoyumlu, uzun ömürlü, in vitro ve in vivo'da yüksek stabiliteye sahiptirler [189].

Dendrimerler, tipik olarak simetrik bir çekirdek, bir iç kabuk ve bir dış kabuktan oluşan homojen ve tek dağılımlı yapıya sahip nano boyutlu, radyal olarak simetrik moleküllerdir. Çeşitli dendrimerler mevcuttur ve her biri çok değerlik, kendi kendine birleşme, elektrostatik etkileşimler, kimyasal stabilite, düşük sitotoksisite

ve çözünürlük gibi biyolojik özelliklere sahiptir. Dendrimerlerin sentezleri oldukça zaman alıcı olduğundan, ilaç yüklenmesi ve salınması açısından zorluklar ortaya çıkarmaktadır [190].

Lipozomlar, kolesterolden ve toksik olmayan doğal fosfolipidlerden oluşturulabilen küresel şekilli küçük yapay veziküllerdir. Biyouyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, düşük toksisite ve hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçları yakalama ve tümör dokularına bölgeye özgü ilaç verilmesini sağlama gibi özellikleri nedeniyle lipozomlar, araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Lipozomların toksik ve immünojenik olmamaları da biyolojik sistemlerde kullanımları açısından önemli avantaj sağlamaktadır [191].

Kompakt polimerik nanopartiküller, tamamen doğal veya sentetik polimerlerden üretilmiş nanopartiküllerdir. Genellikle lipozomlardan daha stabildirler ve daha az ilaç sızıntısı ile haftalarca sürekli lokalize ilaç dağıtımına izin vermektedirler. Bu polimerik nano yapılarda, terapötik ajanlar yukarıda bahsedilen nanopartiküllerden farklı olarak kovalent olarak bağlanabilmektedir. Ayrıca, terapötik ajanlar nanopartiküllerin yüzeyinde adsorbe edilebilir veya içerisine kapsüllenebilir [188].

Altın, gümüş, platin ve silika gibi inorganik malzemelerden üretilen nanopartiküller de bulunmaktadır. İnorganik nanopartiküller, metalik veya kovalent olarak bağlanmış atomlarla oldukça düzenli, sert ve üç boyutlu bir yapıya sahiptir. İnorganik nanopartiküllerin organik nanopartiküllerden farklı olarak boyut ve şekil gibi özelliklerinin biyolojik koşullara göre değişmemesi biyoteknolojik uygulamalarda avantaj sağlamaktadır. Buna rağmen, inorganik nanopartiküllerin önemli dezavantajları da bulunmaktadır. Birçoğunun biyouyumluluğu, organik nanopartiküllere kıyasla zayıftır, toksisiteye neden olabilmektedirler. Özellikle metalik nanopartiküllere yapısı nedeniyle terapötik ajanların yüklemesi yapılamamaktadır [192, 193].

### **2.12.3.1 Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler**

Nanopartiküller, vücudun çeşitli bölgelerine ve aynı zamanda uzun süreli ilaç sunma kabiliyetine sahip oldukları için ilaç taşınımı için önemli bir araştırma alanı haline

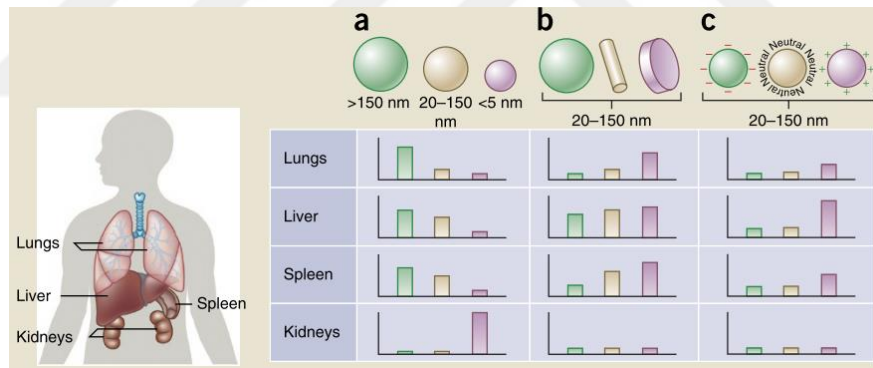
gelmiştir [14]. Biyoyumlu, biyobozunur, non-toksik ve immünojenik olmayan nişasta, dekstran, pektin, aljinat, kitosan, hyaluronik asit, kolajen, jelatin, albümin gibi doğal ve polietilen glikol (PEG), polilaktik asit (PLA), polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA), polikaprolakton (PCL) gibi sentetik polimerler, modern farmasötik ilaç nanoformülasyonları için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır [194]. Doğal polimerler (proteinler veya polisakkaritler), saflık açısından değişiklik gösterdiklerinden ve genellikle enkapsüle ilacı denatüre edebilecek çapraz bağlanmayı gerektirdiklerinden kullanımları kısıtlanmaktadır. Bu sebeple sentetik polimerler kullanım kolaylığı sebebiyle ön plana çıkmaktadır. Günümüze kadar sentetik nanopartiküllerden en yaygın olarak kullanılan polimerler, polilaktik asit, poliglikolik asit ve bunların kopolimerleri; polilaktit-ko-glikolik asit olmuştur [14].

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile, terapötik ajanın spesifik olarak verilmesi, istenilen bölgeye maksimum olarak ulaşması ve böylece diğer organlarda veya hücrelerde istenmeyen birikim sonucu ortaya çıkabilecek yan etkilerin azaltılması amaçlanmaktadır [195]. İlaç taşınımında kullanılan nanopartiküllerin boyutu, şekli, yüzey yükü, dayanıklılığı ve bozunma süresi oldukça önemlidir. Nanopartiküllerin boyutu, canlı ortamdaki partikül dağılımını yönlendirmek için uyarlanabilen önemli bir tasarım parametresidir. Partikül boyutu; dolaşım yarı ömrünü, vaskülariteye sızmayı, makrofajlar tarafından tutulmayı ve partikülün ekstravazasyonunu belirlemektedir [196]. Nanopartiküller ile kan damarları içerisinde kolayca etken madde taşınımı yapılabilmektedir. Nanopartiküller, 5–6 µm çapındaki en küçük kılcal olan kan damarlarında bile kolayca hareket edebildikleri için intravenöz iletim için oldukça avantajlıdırlar [194]. Ancak, kan damarlarında partiküller ile ilaç taşınımı sırasında emboli oluşumunu engellemek için dolaşıma dağılan partiküllerin boyutu, 5 µm'den önemli ölçüde küçük olmalıdır. Çapı 5 nm'den büyük olan nanopartiküller ise intravenöz uygulama sonrasında hızla renal klirens uğramaktadır [197]. 2-5 µm boyut aralığında bulunan nanopartiküllerin akciğerlerin kılcal damarlarında birikmeye sebep olduğu da bilinmektedir. Ayrıca bu boyutlardaki nanopartiküller karaciğer, dalak ve akciğerlerde bulunan makrofajlar tarafından tutulabilmektedir [198]. Genel olarak bakıldığında 100 nm civarındaki nanopartiküller dolaşımında uzun süre varlığını sürdürebilmektedir.

Nanopartiküllerin şekli, nanopartikülün hedef bölgeye bağlanmasını, makrofajlar tarafından tutulmasını, partikülün hücre içerisine alınımı ve dolaşımında kalma süresini önemli ölçüde etkilemektedir [196]. Küresel bir nanopartikülün dalaktan geçmesi için, çapı 200 nm'den az olmalıdır [188]. Diskoidal partiküller, küresel partiküllerle kıyaslandığında, küresel partiküllerden farklı olarak damar içinde bir duvardan diğerine doğru dönme ve sallanma hareketleri gösterdiklerinden hedef dokuya tutunma açısından avantajlıdır [199].

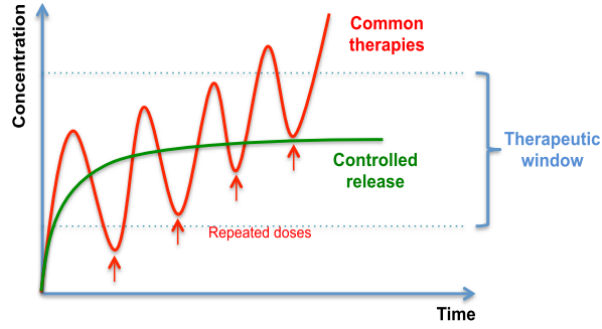
Nanopartikülün yüzey yükü, partikülün dolaşım ömrünü uzatmak ve hedef bölgede birikimini arttırmak açısından oldukça önemlidir. Nötr ve negatif yüzey yüklü nanopartiküller serum proteinlerinin adsorpsiyonunu azaltarak daha uzun süre kan damarları içerisinde sirkülasyonunu devam ettirebilmektedir [200].

Nanopartikülün bozunma süresi de özellikle hedef bölgede birikim sağlayıp uzun süreli salım yapabilmesi açısından oldukça önemlidir. Şekil 2.9'da nanopartiküllerin boyutuna(a), şekline(b) ve yüzey yüküne(c) bağlı olarak, akciğer, karaciğer, dalak ve böbrekteki biyo-dağılımı gösterilmiştir [196].



**Şekil 2.9** Nanopartikül boyutu, şekli ve yüzey yüküne bağlı olarak akciğer, karaciğer, dalak ve böbrekteki biyo-dağılımı [196]

Nanotaşıyıcı sistemler, farmasötik ajanların stabilitesini arttırarak, biyolojik ortamda ilaç biyoaktivitesinin korunmasını sağlamaktadır. Bu durum daha düşük miktarlarda ilaç kullanımına ve doz sayısının azalmasına neden olmaktadır. Şekil 2.10'da da görüldüğü gibi standart terapilerde vücuttaki ilaç miktarını istenen düzeyde tutabilmek için tekrarlı uygulamalar gerekmektedir. Ancak nanopartiküllerin kontrollü salım yapabilme yeteneği bu uygulamalara gereksinimi ortadan kaldırmaktadır [188].



**Şekil 2.10** Standart tedavilerin konsantrasyon profili (kırmızı çizgi) ve zaman boyunca kontrollü salım (yeşil çizgi) [188]

Nanopartiküller ile transdermal, inhalasyon, intravenöz ve oral yolla ilaç taşınımı yapılabilmektedir [15]. Oral yolla ilaç uygulaması kolay uygulanabilirliği ve yüksek düzeyde hasta uyumluluğu nedeniyle tercih edilmektedir. Bununla birlikte, oral yolla uygulanan peptit ve proteinler midedeki asidik ortam ve gastrointestinal sistemdeki enzimler nedeniyle degrade olmakta ve terapötik etkinlikleri azalmaktadır [201]. Nanotaşıyıcı sistemler ile terapötik ajanlar, gastrointestinal sistemdeki enzimlerden korunarak biyoaktivitesi arttırılabilmektedir. Nanopartiküller ilaç özellikle oral ilaç dağıtımında suda çözünürlüğü düşük ilaçların verilmesi, ilaçların gastrointestinal sistemin belirli bir kısmına hedeflenmesi ve ilaçların sıkı bağırsak bariyeri boyunca transitozunun sağlanması açısından önemli avantajlara sahiptir [15].

Gastrointestinal sistemde ve özellikle midede kolonize olan *H. pylori*'nin tedavisinde kullanılan ilaçlar da oral yolla uygulanmaktadır. Ancak özellikle mukus katmanı içerisinde kolonize olan *H. pylori*'ye antimikrobiyal ilaçların erişimi kısıtlanmaktadır. Ayrıca, *H. pylori* yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı da direnç kazanmıştır. Geleneksel ilaç uygulama sistemleri midede uzun süreli birikme gösteremediğinden antibiyotiklerin etkili konsantrasyonlarda ve tamamen aktif formlarda enfeksiyon bölgesine ulaşmasını sağlayamamaktadır. Ayrıca, penisilin ve eritromisin gibi birçok antimikrobiyal ajan da asidik ortamda bozunmaktadır. Bu nedenle, nanopartiküllerin *H. pylori*'nin tedavisinde ilaç taşıyıcı olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Min Luo ve ark. *H. pylori* üzerinde ifade edilen UreI kanal proteinine spesifik olarak hedeflendirilmiş pH'a duyarlı ve amoksisilin antibiyotiğini taşıyan AMX-PLGA/UCCs-2 nanopartiküllerini

sentezlemişlerdir. Sentezlenen nanopartiküllerin in vitro ve in vivo'da *H. pylori*'nin eradikasyonunda etkili olduğu belirtilmiştir [202].

### 2.12.3.2 Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, boyutları 10 nm – 1 µm arasında değişen ve doğası gereği katı olan koloidal partiküllerdir [17]. Polimerik nanopartiküller, kapsülleme veya kovalent bağlanma yoluyla yüklenen ve yüklü terapötik içeriklerin kontrollü salınımı için uyarılara yanıt verecek şekilde ayarlanmış mükemmel nanotaşıyıcılarıdır [16]. Polimerik nanopartiküllerin, yüksek endositoz yeteneği, aktif veya pasif hedeflendirilebilmesi, ilaçların ve diğer terapötik ajanların yüksek kapsülleme kapasitesi ilaç hedefleyici sistemlerde kullanımları açısından avantaj sağlamaktadır [9]. Ayrıca, polimerik nanopartiküller, biyolojik olarak uyumlu ve toksik olmayan, biyobozunur ve immünojenik değildir [203]. Günümüzde *H. pylori*'nin tedavisinde kitosan, gliadin ve PLGA gibi polimerik nanopartiküllerin kullanımına yönelik çalışmalar sürdürülmektedir.

Kitosan, pozitif yüklü bir polimer olduğundan negatif yüklü hücre yüzeyleri ve mukus tabakası ile arasında elektrostatik etkileşim bulunmaktadır. Bu durum kitosana mukoadesiv özellik sağlayarak midede kalma süresini uzatmaktadır. Ayrıca kitosanın katyonik bir polimer olması ve nötr pH'de çözünmeyip midenin asiditesi altında çözünmesi oral yolla ilaç taşınımı açısından avantaj sağlamaktadır [204]. Lin YH ve ark. amoksisilin ile yüklenmiş fukoz ile genipin çapraz bağlı kitosan/heparin nanopartiküllerini sentezlemişlerdir. Sentezlenen nanopartiküller direkt *H. pylori*'yi hedefleyerek amoksisilinin mikroorganizmanın kolonize olduğu mukuzal bölgede salınımı sağlamıştır. Amoksisilin yüklü kompleks nanopartiküllerin bakterinin eradikasyonunda tek başına amoksisilin uygulamasına kıyasla yaklaşık 4 kat daha fazla etkili olduğu deneysel sonuçlarda gösterilmiştir [18].

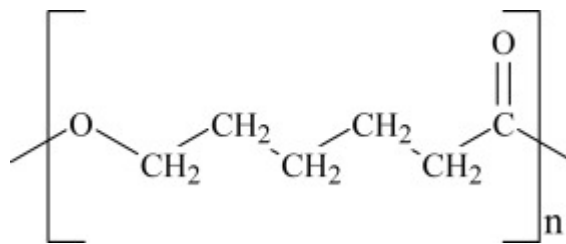
Gliadin, buğday glutenininin bir fraksiyonu olarak türetilen bitkisel bir proteindir. Kitosan gibi mukozadesiv özelliğe sahip olması nedeniyle *H. pylori*'nin tedavisinde ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabilir. R.B. Umamaheshwari ve ark. lektin konjuge gliadin nanopartiküllerinin *H. pylori* tedavisinde etkinliğini incelemişlerdir. In situ yapılan deneylerde lektin konjuge gliadin nanopartiküllerinin *H. pylori*'nin

yapışmasını inhibe ettiği gösterilerek *H. pylori*'nin tedavisinde ilaç taşınımı için potansiyel bir nanopartikül olduğunu belirtmişlerdir [19].

PLGA, ilaç endüstrisinde insan uygulamaları için FDA onayı almış sentetik, biyolojik olarak parçalanabilir ve biyoyumlu bir polimerdir. Rifampisin, azitromisin, klindamisin, siprofloksasin ve klaritromisin yüklü PLGA nanopartikülleri test edildikleri mikroorganizmalara karşı tek başına ilaç uygulamalarından daha etkili olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [205]. F Lotfipour ve ark. klaritromisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin etkinliğini hasta biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşları üzerinde incelemişlerdir. Klaritromisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin kapsüle edilmemiş klaritromisine kıyasla azalmış MİK değerleri gösterdiği bildirilmiştir [20].

### 2.12.3.3 Polikaprolakton Nanopartikülleri

Polikaprolakton (PCL), düşük bir erime noktasına (60°C) ve -60°C'lik bir camsı geçiş sıcaklığına sahip, kısmen kristal yapıda olan sentetik bir polyesterdir. PCL'nin polimerizasyonu ε-kaprolaktonun halka açılması ile gerçekleşmektedir [206]. Şekil 2.11 'de polikaprolaktonun kimyasal yapısı görülmektedir. PCL, insan vücudu gibi fizyolojik koşullarda ester bağlarının hidrolizi ile bozulmaktadır. Bu sayede, polikaprolakton implante edilebilir biyomalzemelerin ve ilaç taşıyıcı nanopartiküllerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır [207]. PCL nanopartikülleri, mikroorganizmaların lipazları ve esterazları tarafından kolaylıkla parçalanabilmesi sebebiyle mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların tedavisinde ilaç taşınımı açısından da avantaj sağlamaktadır [208].



Şekil 2.11 Polikaprolaktonun yapısı [208]

Polikaprolakton, çeşitli ilaçlara karşı yüksek geçirgenliği, mükemmel biyoyumluluğu sayesinde ilaçların taşınımında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ayrıca, biyolojik olarak absorbe edildikten sonra vücuttan tamamen atılabilme özelliğine sahiptir. Polikaprolakton kullanılarak sentezlenen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, kontrollü ve hedeflenmiş ilaç dağıtımı, çeşitli fizyolojik engelleri aşma kapasitesi ve azaltılmış sistemik yan etkiler göstermiştir [209]. Alex ve arkadaşları, karboplatin yüklü polikaprolakton nanopartikülleri sentezleyerek nazal yoldan uygulama ile gliomun tedavisindeki etkinliğini incelemişlerdir. Karboplatin yüklü polikaprolakton nanopartiküllerinin karboplatinin nazal absorpsiyonunu etkili bir şekilde geliştirdiği ve gelişmiş beyin iletimi için karboplatinin intranazal uygulaması için kullanılabileceğini bildirmişlerdir [210].



### 3.1 Gereç

#### 3.1.1 Ekipman ve Sarf Malzemeler

- Hava akımlı kabinler (Faster BH-EN 2000 S/D, Thermo Scientific Hera safe)
- Karbondioksitli inkübatör (New Brunswick scientific CO-150)
- İnkübatör (Innova/CO-170)
- Ters mikroskop (Olympus CKX41)
- Işık mikroskobu (Olympus)
- Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- pH metre (HANNA instruments)
- Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)
- Pastör fırını (Memmert)
- UV-spektrofotometre (Jasco V-530)
- ELISA çoklu plak okuyucusu (Thermo)
- Buz Üretim Cihazı (Scotsman AF100)
- Çalkalamalı su banyosu (GFL 1086)
- Vortex (Laboratuvary Medical Supplies VTX-3000L)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph instruments)
- Dondurucular (Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4,-20°C), GFL(-40°C))
- Azot tankı ve azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- Ultra saf su sistemleri (GFL2104)
- Mikropipetler (10, 100 ve 1000 µl'lik, Thermo, Pippetman)
- Pipet uçları (1-10, 20-200, 100-1000 µl'lik tek kullanımlık, Isolab)
- Santrifüj tüpleri 15 ve 50 ml (Nest)
- ELISA 96 kuyulu plakları (TPP)
- Hücre kültür flakları 25 ve 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Corning)
- Serolojik pipet tabancası (Thermo)
- Serolojik pipetler 5, 10, 25 ml (Blau Brand Germany)
- Kriyotüpler (TPP)
- Otoklavlanabilir cam tüpler 50 ml'lik (ISOLAB)
- Thoma lamı (Menzel superior)
- Enjektörler 1, 5, 10 ve 50 cc'lik (Ayset)
- Şırınga filtreleri 0,22 µm ve 0,45 µm'lik (MILLIPORE, TPP)
- Mikroaerofilik Gas pack (Oxoid)

- Pastör pipeti (LP)
- Lam (Isolab)
- Lamel (Isolab)
- Petri kutuları (Isolab)
- Taramalı elektron mikroskobu (ArelPOTKAM FEI QUANTA 450 FEG)
- Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (SHIMADZU)
- Sonikatör (Bandelin)
- Liyofilizatör (Telstar Croyodos)

### 3.1.2 Kimyasal Maddeler

- Etil alkol (%96) (Labkim)
- Metanol (Merck)
- İmmersiyon yağı (Merck)
- Kristal viyolet (Merck)
- Asit-fenik kristali (fenol kristali) (Merck)
- Bazik fuksin (Sigma Aldrich)
- I (Sigma Aldrich)
- KI (Sigma Aldrich)
- Tripan mavisi (Biological Industry)
- EDTA (AppliChem)
- L-Glutamin (PAN Biotech)
- RPMI-1640 (GIBCO Invitrogen)
- DMEM-F12 (Sigma Aldrich)
- FBS-fetal bovine serum (GIBCO Invitrogen)
- Gentamisin (GIBCO)
- Penisillin-streptomisin (PAN Biotech)
- Polivinilalkol (Sigma Aldrich)
- Polikaprolakton (Sigma Aldrich)
- Diklorometan (Sigma Aldrich)
- Brucella Broth (Sigma Aldrich)
- Bakteriyolojik agar (Merck)
- Üre agar (Merck)
- Gliserol (Merck)
- Dimetil Sülfoksit (SIGMA)
- Giemsa Boya (Merck)

### 3.1.3 DeneYlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

#### 3.1.3.1 Tamponlar

##### PBS Tamponu (pH: 7,4)

NaCl (Ma: 58.4 g/mol)	8 g
-----------------------	-----

KCl (Ma: 58.4 g/mol)	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Ma: 141.96 g/mol)	1.44 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Ma: 136.086 g/mol)	0,24 g
Distile su	1 L

Kimyasallar hassas terazide tartıldı. Üzerine 900 mL distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. pH'ı 7,4'e ayarlandı ve distile su ile hacmi 1 litreye tamamlandı. Ardından 121°C sıcaklıkta 20 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi.

### **3.1.3.2 Besiyerleri**

#### **RPMI 1640 Medyumun Hazırlanması**

Stok besiyeri, 500 ml RPMI 1640 içerisine 5 mL penisilin streptomisin ve 5 mL L-glutamin eklenerek hazırlandı ve +4°C'de kullanıma hazır olarak muhafaza edildi. Kullanılacağı zaman %10 FBS eklenerek hazırlandı.

#### **DMEM/F12 Medyumun Hazırlanması**

Stok besiyeri, 500 ml DMEM/F12 içerisine 5 mL penisilin streptomisin ve 5 mL L-glutamin eklenerek hazırlandı ve +4°C'de kullanıma hazır olarak muhafaza edildi. Kullanılacağı zaman %10 FBS eklenerek hazırlandı.

#### **Hücre Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması**

Hücre hatlarının kriyoprezervasyonunda kullanılan dondurma solüsyonları %80 FBS ve %20 DMSO olacak şekilde hazırlandı. 15 ml'lik falkonlarda -20°C'de muhafaza edildi.

#### ***Helicobacter pylori* Besiyerinin Hazırlanması**

Kazein pepton	10 g
Dekstroz	1 g
Et peptonu	10 g
Maya ekstresi	2 g
Sodyum klorür	5 g

Sodyum bisülfid 0,1 g (Final pH; 7,0± 0,2)

Yukarıdaki maddeleri içeren, ticari olarak satın alınmış Brucella Broth besiyeri tozundan 28,1 g tartılarak üzerine 1 L distile su ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 121°C'de 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril sıvı besiyeri hazırlandı. Otoklavlanmış sıvı besiyeri soğuduktan sonra 5 mg/L sefsulodin, 5 mg/L trimetoprim, 10 mg/L vankomisin, 10 mg/L amfoterisin B antibiyotikleri eklenerek kullanıma kadar +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi.

Brucella Broth katı besiyeri hazırlarken ise 28,1 g besiyeri tozuna ek olarak 15 g bakteriyolojik agar tartıldı, 1 L distile su ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ardından otoklavlanarak steril hale getirildi. 45-50 °C'ye soğuyana kadar bekletildi. Filtreden geçirilmiş antibiyotik solüsyonları ve %5-7 FBS eklendi. Steril petri kaplarına dökülerek katılaşması bekledi. Hazırlanan petriler çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi.

#### ***Helicobacter pylori* Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması**

%10 FBS ve %10 gliserol içeren Sıvı Brucella Broth besiyeri ile dondurma solüsyonu hazırlandı. Kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

#### **Üre Besiyerinin Hazırlanması**

Ticari olarak temin edilen Urea Agar Base'den 21 gram tartıldı ve üzerine 950 mL distile su ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve otoklav ile steril hale getirildi. Soğuduktan sonra filtreden geçirilerek steril hale getirilmiş %40'luk üreden 50 mL üre agarın üzerine eklendi. 1'er mL alınarak eppendorf tüplere eğik olacak şekilde koyuldu ve katılaşması bekledi. Hazırlanan eppendorflar, çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi.

#### **3.1.3.3 Kimyasallar**

##### **Tripsin Solüsyonu**

%0,25 tripsin solüsyonu hazırlamak için 2,5 g tripsin ve 0,2 g EDTA hassas terazide tartıldı, üzerine 1 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözdürüldü ve steril hale getirildi.

### **MTT Solüsyonu**

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide tuzu 10 mg/ml olacak şekilde PBS ile hazırlandı. Alüminyum folyo ile sarılarak karanlıkta vortekslendi. Önce 0,45 µm'lik filtreden daha sonra 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril hale getirildi. -20°C'de muhafaza edildi.

### **PCL Çözeltisinin Hazırlanması**

% 3 PCL çözeltisi hazırlanırken 3 mg PCL (Ma:14000) tartıldı. 100 mL diklorometan içerisinde çözdürüldü.

### **PVA Çözeltisinin Hazırlanması**

1 mg PVA tartılarak 100 mL distile su içerisinde 50 °C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözdürüldü.

#### **3.1.3.4 Boyalar**

##### **Kristal viyole**

Kristal viyole	1 g
Asit-fenik kristali (fenol kristali)	2 g
Etil alkol (%96)	10 mL
Distile su	100 mL

##### **Fuksin**

Bazik fuksin (stok)	10 mL
Distile su	100 mL

#### **3.1.3.5 Antibiyotikler**

Klaritromisin (KLACİD)

#### **3.1.4 Deneylerde Kullanılan Hücre Hatları**

J774 Makrofaj hücre hattı

AGS ATCC CRL-1739 hücre hattı

### 3.1.5 Mikroorganizmalar

*Helicobacter pylori* ATCC 700824 standart suşu

## 3.2 Metod

### 3.2.1 *Helicobacter pylori* Kültürü ve Karakterizasyonu

Deneylerde Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü “Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği” laboratuvarındaki sıvı azot tankında bulunan ATCC 700824 *Helicobacter pylori* standart suşu kullanıldı.

#### 3.2.1.1 *Helicobacter pylori* Suşunun Kriyobanktan Çıkarılması ve Kültürü

Kriyobanktan çıkarılan, *Helicobacter pylori* bulunan kriyotüplerin ekimi, daha önce hazırladığımız %5 FBS içeren Brucella Broth katı besiyerlerine gerçekleştirildi ve mikroaerofilik koşullarda 37°C’de 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından üreme görülen petriyelerden alınan örnekler ışık mikroskopunda incelendi.

Sıvı makrodilüsyon deneyleri için *H. pylori*’nin sıvı ortamda kültürü gerçekleştirildi. Bu amaçla petriden alınan şeffaf bir kolonilerin %5 FBS içeren sıvı besiyerine ekimi gerçekleştirildi ve 48 saat boyunca 120 rpm hızında çalkalanarak 37°C’de mikroaerofilik koşullarda inkübe edildi.

Bakteriler, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edilmek için donduruldu. Sıvı besiyerinde çoğaltılan bakteriler 15000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine dondurma solüsyonu eklenerek kriyotüplere aktarıldı. 1 saat -40 °C’de dondurucuda muhafaza edildikten sonra -196 °C olan azot tankına yerleştirildi.

#### 3.2.1.2 Gram Boyama

Gram boyama için lam alevden 3 kere geçirildikten sonra üzerine 10 µl PBS damlatıldı. Daha sonra katı kültürden metal öze ile koloni alındı ve lama yayıldı. Ardından kuruyana kadar bekletildi ve fiksasyon için 3 kere daha ateşten geçirildi. Boyama işlemi için öncelikle lama kristal viyole damlatıldı, 2 dakika bekletildi ve distile su ile yıkandı. Daha sonra lügol damlatıldı, 2 dakika beklenerek önce distile su ile ardından %95’lik etil alkol ile yıkandı. Üzerine sulu fuksin damlatıldı, 3 dakika

bekletildi, distile su ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Lama immersiyon yağı damlatılarak 100 X büyütmede ışık mikroskobunda incelendi.

### 3.2.1.3 Katalaz Deneyi

Kültürde üreyen kolonilerden öze ile alınarak lam üzerine transfer edildi ve üzerine %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatıldı. Hidrojen peroksit damlatıldıktan 10-20 saniye içinde baloncuk oluşumu varsa katalaz pozitif olarak değerlendirildi.

### 3.2.1.4 Üreaz Deneyi

Üreaz aktivitesinin incelenmesi için kültürden alınan tek koloni, daha önce eppendorflara hazırlanmış üreaz besiyerlerine ekildi. Ardından, mikroaerofilik koşullarda 37°C'de, 24 saat inkübe edildi. Besiyerinde renk değişimi gözlemlendi ve sarıdan pembeye renk değişimi varsa üreaz pozitif olarak değerlendirildi.

### 3.2.1.5 Bakteri Sayımı

Bakteri sayımı spektrofotometre kullanılarak yapıldı. Ölçüm alınırken sıvı besiyerinden 20 µL örnek alındı ve üzerine 980 mL sıvı besiyeri eklendi. UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak 600 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. 1 OD değeri 1x10<sup>9</sup> bakteriye karşılık gelmektedir. Absorbans değerine bağlı olarak aşağıdaki denklem kullanılarak bakteri sayımı gerçekleştirildi.

$$\text{Bakteri Sayısı (kob/mL)} = \frac{1 \times 10^9 \times \text{Absorbans Değeri}}{0,02}$$

### 3.2.2 Bitki Ekstraktlarının Elde Edilmesi

Klaritromisin antibiyotiğiyle birlikte ve tek başına polikaprolakton nanopartiküllerine enkapsüle edilecek ekstraktın belirlenmesi amacıyla daha önce gastrointestinal hastalıkların tedavisinde etkinliği incelenen *Rosmarinus Officinalis*, *Alpinia officinarum*, *Artemisia absinthium L.* bitkileri metanol ile ekstrakte edildi.

- ***Rosmarinus Officinalis* Ekstraktının Eldesi**

*Rosmarinus Officinalis* (Biberiye) kuru yaprakları blenderdan geçirildi. 20 gram bitki örneği %95'lik (95 ml metanol + 5 ml distile su) 100 mL metanol içerisinde 3 gün oda sıcaklığında ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işleminin ardından ekstrakt filtre

kağıdından süzöldü. Çözücü ise indirgenmiş basınç altında evaporatör kullanılarak buharlaştırıldı ve +4°C'de stoklandı.

- ***Alpinia officinarum* Ekstraktının Eldesi**

*Alpinia officinarum* (Havlıcan) kuru köklerinden 20 gram tartıldı ve 70 mL %95'lik (66.5 ml metanol + 3.5 ml distile su) metanol içerisinde 3 gün 37°C'de ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Filtre kağıdından ekstrakt süzöldü ve evaporatör ile çözücü buharlaştırıldı. +4°C'de muhafaza edildi.

- ***Artemisia absinthium L.* Ekstraktının Eldesi**

*Artemisia absinthium L.* (Pelin otu) kuru dal yaprak ve çiçekleriyle beraber küçük parçalara ayrıldı. 60 gram bitki örneği tartıldı ve %70'lik (142.5 ml metanol+7.5 ml distile su) 150 ml metanol içerisinde 72 saat 37°C'de ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işleminin ardından ekstrakt filtre kağıdından süzöldü. Çözücü ise indirgenmiş basınç altında evaporatör kullanılarak buharlaştırıldı ve +4°C'de muhafaza edildi.

### **3.2.3 Bitki Ekstraktlarının Antibakteriyel Etkisinin *Helicobacter pylori* Kültüründe İncelenmesi**

Ekstrakte edilen bitki ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile *H. pylori* Üzerinde antibakteriyel etkinliği incelenerek daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan bitki ekstraktı belirlendi. Bu yöntem için öncelikle *H. pylori* ATCC 700824 suşu %5 FBS içeren sıvı Brucella Broth besiyerinde pasajlanarak mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Daha önce hazırlanan katı besiyerlerine 1x10<sup>7</sup> kob/mL sayıda hazırlanan bakteri süspansiyonundan 10 µL ekim yapıldı. *Rosmarinus oficinalis*, *Alpinia officinarum* ve *Artemisia absinthium L.* Ekstraktları 5; 2,5; 1,25 ve 0,625 mg/mL konsantrasyonları hazırlandı. Diskler hazırlanan konsantrasyonlara batırılıp bakteri ekimi yapılan petrilere aralıklarla yerleştirildi. Petrilere mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 48 saat inkübe edildi ve oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçöldü. Zon çapları karşılaştırılarak ilerleyen çalışmalarda kullanılacak bitki ekstraktı belirlendi.

### **3.2.4 *Alpinia officinarum* Ekstraktının Karakterizasyonu**

*Alpinia officinarum* ekstraktının karakterizasyonu için toplam fenolik madde tayini yapıldı, UV-Vis spektrofotometre ile 200-800 nm dalga boyu arasında spektrumu

çıkarıldı ve FT-IR spektrumu alınarak ekstrakta spesifik titreşimlerin oluşturduğu bantlar belirlendi.

#### **3.2.4.1 *Alpinia officinarum* Ekstraktının Toplam Fenolik Madde Tayini**

Fenoller esas olarak strese karşı koruma için bitkiler tarafından üretilen bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren aromatik benzen halka bileşikleridir. Fenolik bileşikler, bitki gelişiminde, özellikle lignin ve pigment biyosentezinde önemli rol oynamakla birlikte bitkilere yapısal bütünlük ve iskele desteği sağlarlar. Ayrıca bitkiler tarafından salgılanan fitoaleksinler, fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve tanenler gibi bitki fenolikler bakteriler, mantarlar ve protozoa dahil olmak üzere birçok mikroorganizmanın büyümesini ve aktivitesini engellediği bilinmektedir.

*Alpinia officinarum* ekstraktının toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi için distile su ile %10'luk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ve 10 kat seyreltilmiş fenol reaktifi hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi oluşturmak için gallik asit kullanıldı. Gallik asidin farklı konsantrasyonları (1-0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125 mg/mL) metanol ile hazırlandı. Her konsantrasyondan 50 µL alındı üzerine 680 µL distile, 400 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ve 400 mL fenol reaktifi ilave edilerek 2 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 750 nm'de UV-Vis spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapıldı. Elde edilen veriler kullanılarak gallik asit kalibrasyon grafiği oluşturuldu ve kalibrasyon eğri denklemi oluşturuldu.

*Alpinia officinarum* ekstraktının metanol ile 5 mg/mL, 2 mg/mL ve 1 mg/mL olmak üzere farklı konsantrasyonları hazırlandı. Gallik asitte olduğu gibi her konsantrasyondan 50 µL alındı üzerine 680 µL distile, 400 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ve 400 mL fenol reaktifi ilave edilerek 2 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 750 nm'de UV-Vis spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapıldı. Ölçülen absorbans değerleri gallik asit kalibrasyon denkleminde yerine koyularak ekstraktın gallik asit karşılığı toplam fenolik madde miktarları hesaplandı.

#### **3.2.5 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Sentezlenmesi**

*H. pylori* üzerinde antibakteriyel etkinlikleri, j774 makrofaj ve ATCC CRL-1739 AGS hücre hatlarında sitotoksiteleri incelenecek olan klaritromisin ve/veya *Alpinia*

*officinarum* ekstraktı yüklü ve boş polikaprolakton nanopartikülleri emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlendi.

### **3.2.5.1 Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Hazırlanması**

Boş PCL nanopartikülleri tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı. Daha önce hazırlanan %1 PVA çözeltisinden 15 mL behere alındı ve manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm hızında karıştırılırken üzerine şırınga ile 5 mL %3 PCL çözeltisi damlatıldı. Damlatma işleminin ardından karışım 5 dakika sonike edildi. Diklorometanı uzaklaştırmak için çeker ocağın altında 4 saat karıştırıldı. Diklorometan uçurulduktan sonra 14000 rpm'de 45 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Süpernatantlar enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesinde kullanılmak üzere bir falkona toplandı. Son yıkama işleminin ardından zeta-sizer ile boyut ve zeta potansiyel analizi yapıldı. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatör ile 48 saat kurutuldu ve deneylerde kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edildi.

### **3.2.5.2 Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Klaritromisin Yüklü Polikaprolakton Nanopartiküllerin Hazırlanması**

Klaritromisin yüklü PCL nanopartikülleri tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı. 10 mg klaritromisin hassas terazi ile tartıldı, daha önceden hazırlanmış %3'lük 5 mL PCL çözeltisinin içerisine eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Ardından 3 dakika sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha önce hazırlanan %1 PVA çözeltisinden 15 mL behere alındı ve manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm hızında karıştırılırken üzerine şırınga ile sonike edilen 5 mL %3 PCL çözeltisi damlatıldı. Damlatma işleminin ardından karışım 5 dakika daha sonike edildi. Diklorometanı uzaklaştırmak için çeker ocağın altında 4 saat karıştırıldı. Diklorometan uçurulduktan sonra 14000 rpm'de 45 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Süpernatantlar enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesinde kullanılmak üzere bir falkona toplandı. Son yıkama işleminin ardından zeta-sizer ile boyut ve zeta potansiyel analizi yapıldı. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatör ile 48 saat kurutuldu ve deneylerde kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edildi.

### **3.2.5.3 Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile *Alpinia officinarum* Ekstraktı Yüklü Polikaprolakton Nanopartiküllerin Hazırlanması**

*Alpinia officinarum* ekstraktı yüklü PCL nanopartikülleri tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı. 10 mg ekstrakt hassas terazi ile tartıldı, daha önceden hazırlanmış %3'lük 5 mL PCL çözeltisinin içerisine eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Ardından 3 dakika sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha önce hazırlanan %1 PVA çözeltisinden 15 mL behere alındı ve manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm hızında karıştırılırken üzerine şırınga ile sonike edilen 5 mL %3 PCL çözeltisi damlatıldı. Damlatma işleminin ardından karışım 5 dakika daha sonike edildi. Diklorometanı uzaklaştırmak için çeker ocağın altında 4 saat karıştırıldı. Diklorometan uçurulduktan sonra 14000 rpm'de 45 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Süpernatantlar enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesinde kullanılmak üzere bir falkona toplandı. Son yıkama işleminin ardından zeta-sizer ile boyut ve zeta potansiyel analizi yapıldı. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatör ile 48 saat kurutuldu ve deneylerde kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edildi.

### **3.2.5.4 Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* Ekstraktı Yüklü Polikaprolakton Nanopartiküllerin Hazırlanması**

Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı yüklü PCL nanopartikülleri tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı. 5 mg kuru ekstrakt ve 5 mg antibiyotik hassas terazi ile tartıldı, daha önceden hazırlanmış %3'lük 5 mL PCL çözeltisinin içerisine eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Ardından 3 dakika sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha önce hazırlanan %1 PVA çözeltisinden 15 mL behere alındı ve manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm hızında karıştırılırken üzerine şırınga ile sonike edilen 5 mL %3 PCL çözeltisi damlatıldı. Damlatma işleminin ardından karışım 5 dakika daha sonike edildi. Diklorometanı uzaklaştırmak için çeker ocağın altında 4 saat karıştırıldı. Diklorometan uçurulduktan sonra 14000 rpm'de 45 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Yıkama işlemi 3 kez tekrar edildi. Süpernatantlar enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesinde kullanılmak üzere bir falkona toplandı. Son yıkama işleminin ardından zeta-sizer ile boyut ve zeta potansiyel analizi yapıldı. Elde edilen

nanopartiküller liyofilizatör ile 48 saat kurutuldu ve deneylerde kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edildi.

### **3.2.6 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu**

Klaritromisin yüklü PCL nanopartikülleri (PCL-CLR), *Alpinia officinarum* yüklü PCL nanopartikülleri (PCL-ALP), Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* yüklü PCL nanopartikülleri (PCL-CLR-ALP) ve boş PCL nanopartiküllerinin karakterizasyonu farklı yöntemler ve cihazlar kullanılarak gerçekleştirildi. Boyut ve zeta potansiyel ölçümleri Zeta-Sizer cihazı, görüntülemeleri ise taramalı elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. Klaritromisin ve *Alpinia officinarum*un PCL nanopartiküllerine enkapsülasyonu ise Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi kullanılarak nanopartiküllerin belirli dalga boyları aralığında spektrumları alınarak ve bağ titreşimleri karşılaştırılarak analiz edildi. Ayrıca sentezlenen PCL nanopartiküllerinin reaksiyon verimi ve enkapsülasyon etkinliği de belirlendi. Bütün bu yöntemlerle karakterize edilen nanopartiküllerin, UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak salım profilleri de çıkarıldı.

#### **3.2.6.1 Zeta Sizer ile Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi**

Nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel ölçümü Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü KMC-306 nolu laboratuvarında bulunan Malvern Instruments ZetaSizer cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir ölçüm için 995 µl distile su ve 5 µl nanopartikül içeren örnek 1 mL'lik eppendorflarda hazırlanarak ZetaSizer ile boyut ve zeta potansiyelleri 3 tekrarlı olarak ölçüldü.

#### **3.2.6.2 Nanopartiküllerin Liyofilizasyonu**

Boyut analizi ardından 15 mL'lik falkonlarda dondurulan nanopartiküller 48 saat boyunca liyofilizatörde -60 °C'de vakumlu alanda yüksek basınç altında kurutuldu.

#### **3.2.6.3 Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi**

Nanopartiküllerin yüzey özellikleri, şekil ve boyutları ArelPOTKAM'da FEI QUANTA 450 FEG Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelendi. Yalıtkan numunelerin SEM görüntülemesi yapılabilmesi için altın-paladyum gibi iletken maddelerle kaplanması gerekmektedir. Vakumlu ortamda, yüksek voltaj argon gazının iyonize

olmasını sağlar, bu iyonlar altın-paladyum atomlarını koparır ve bu kopan atomlar numuneleri homojen bir şekilde kaplanmasını sağlamaktadır. Bu amaçla, karbon bant üzerine, liyofilize edilmiş nanopartiküller yerleştirildi, yüksek vakum altında altın ile kaplandı ve 5 ve 7 kV'da farklı büyütmelemlerde nanopartiküllerin görüntülenmesi gerçekleştirildi.

#### **3.2.6.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi**

Etken maddelerin nanopartiküllere enkapsülasyonunun incelenmesi amacıyla *Alpinia officinarum* ekstraktı, klaritromisin, boş PCL ve etken madde yüklü PCL nanopartikülleri FT-IR spektrofotometre cihazında 4000-1200 cm<sup>-1</sup> aralığında ölçümler alınarak belirlendi.

#### **3.2.6.5 Reaksiyon Veriminin Belirlenmesi**

Reaksiyon verimi aşağıda verilen denklem kullanılarak, liyofilizasyon işleminin ardından elde edilen nanopartikül miktarının reaksiyona giren toplam etken madde (polikaprolakton, klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı) miktarına oranıyla belirlendi.

$$\text{Reaksiyon Verimi (\%)} = \frac{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı}}{\text{Başlangıçta kullanılan etken madde miktarı}} \times 100$$

#### **3.2.6.6 Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi**

Klaritromisin ve/veya *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği aşağıdaki denklem kullanılarak belirlendi. Enkapsüle edilen etken madde miktarını belirlemek için öncelikle her bir etken madde için absorpsiyon, madde miktarı ilişkisini gösteren kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Ardından nanopartiküllerin yıkama işlemleri sırasında toplanan süpernatantlardan 1 ml alınıp 20 dakika 1400 rpm hızında santrifüj edildi ve UV cihazında uygun dalga boylarında ölçümler alınarak enkapsüle edilen etken madde miktarları belirlendi.

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Enkapsüle edilen etken madde miktarı}}{\text{Başlangıçta kullanılan etken madde miktarı}} \times 100$$

### **3.2.6.7 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin In Vitro Salımı**

Enkapsüle edilmiş *Alpinia officinarum* ekstraktı ve klaritromisinin PCL nanopartiküllerinden salım profillerini incelemek amacıyla 15 mg nanopartikül tartıldı ve 3 mL PBS içerisinde 37 °C'de 130 rpm karıştırma hızında çalkalamalı inkübatörde 200 saat boyunca bırakıldı. Belirlenen zaman aralıklarında 1'er mL örnek alındı. 14000 rpm hızında 20 dakika santirifüj edildi ve süpernatant UV-Vis spektrofotometre ile uygun dalga boyunda absorpsiyon değeri belirlendi. Her alınan 1 mL örnek için inkübatördeki örneğe 1 mL yeni PBS eklendi. *Alpinia officinarum* ekstraktı ve klaritromisin için çıkarılan kalibrasyon eğrileri kullanılarak salım profilleri oluşturuldu.

### **3.2.7 Klaritromisinin *Alpinia officinarum* Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin *Helicobacter pylori* Üzerinde Antibakteriyel Etkinliklerinin İncelenmesi**

PCL nanopartiküllerinin hangi konsantrasyon aralığında antibakteriyel etkinliğinin inceleneceğine karar vermek amacıyla öncelikle klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktının tek başına anti-*Helicobacter pylori* bakteriyel etkinlikleri sıvı makrodilüsyon yöntemiyle incelenerek minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri belirlendi. Bu değerlere bağlı olarak klaritromisin ve/veya bitkisel ekstrakt yüklü PCL nanopartiküllerinin konsantrasyon aralıkları belirlenerek sıvı makrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri ile antibakteriyel etkinlikleri ve toksisiteleri incelendi.

#### **3.2.7.1 Sıvı Makrodilüsyon Yöntemi**

#### **Klaritromisinin ve *Alpinia officinarum* Ekstraktının Sıvı Makrodilüsyon Yöntemi ile Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Tayini**

Sıvı makrodilüsyon yöntemi steril, kapaklı cam tüpler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntem için öncelikle *H. pylori* ATCC 700824 suşu %5 FBS içeren sıvı Brucella Broth besiyerinde pasajlanarak mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Klaritromisin (128-2 µg/mL) ve *Alpinia officinarum* ekstraktı (512-2 µg/mL), sıvı Brucella Broth besiyerinde istenilen konsantrasyonlarda hazırlandıktan sonra

cam tüplere yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru 5 mL olacak şekilde seyreltilerek hazırlandı. Sadece besiyeri ve sadece hücre ekimi yapılacak iki kontrol grubu da hazırlandı. Daha sonra her bir cam tüpe  $1 \times 10^7$  kob/mL sayıda bakteri ekimi gerçekleştirildi ve 48 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de mikroaerofilik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Üremenin gözle görülmediği konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi.

### **Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* Ekstraktının Minimum Bakterisidal Konsantrasyonunun Tayini**

Antibiyotik ve ekstrakt için inhibisyon konsantrasyonları belirlendikten sonra bakterisidal konsantrasyonun belirlenebilmesi için inhibisyon konsantrasyonu ve bir üst konsantrasyondan 10  $\mu\text{L}$  alınarak petrilere damlatıldı.  $37^\circ\text{C}$ 'de mikroaerofilik koşullarda bir gece inkübe edildi. Üremenin olmadığı konsantrasyon MBK olarak belirlendi.

### **Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Sıvı Makrodilüsyon Yöntemi ile Antibakteriyel Etkinliklerinin Tayini**

PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-ALP-CLR nanopartiküllerinin antimikrobiyal etkinliklerinin tayini steril, kapaklı cam tüpler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntem için öncelikle *H. pylori* ATCC 700824 suşu %5 FBS içeren sıvı Brucella Broth besiyerinde pasajlanarak mikroaerofilik koşullarda  $37^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edildi. PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-ALP-CLR (1024-64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sıvı Brucella Broth besiyerinde istenilen konsantrasyonlarda hazırlandıktan sonra cam tüplere yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru 5 mL olacak şekilde seyreltilerek hazırlandı. Sadece besiyeri ve sadece hücre ekimi yapılacak iki kontrol grubu da hazırlandı. Daha sonra her bir cam tüpe  $1 \times 10^7$  kob/mL sayıda bakteri ekimi gerçekleştirildi ve 48 saat  $37^\circ\text{C}$ 'de mikroaerofilik koşullarda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 96'lık mikro kuyucuklara her konsantrasyondan 3 tekrar olacak şekilde 100  $\mu\text{L}$  konuldu ve 600 nm'de ELISA reader ile ölçüm alındı. Kontrol gruplarına bağlı olarak bakteri yüzdeleri belirlendi. Buna ek olarak gram boyama yapıldı.

### 3.2.7.2 Antibiyogram Testleri

Sıvı makrodilüsyon yöntemiyle antibakteriyel etkinlikleri incelenen klaritromisin, *Alpinia officinarum* ekstraktı, PCL nanopartiküllerinin disk difüzyon yöntemi ile de inhibisyon zon çapları belirlendi.

### **Klaritromisinin *Alpinia officinarum* Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Disk Difüzyon Yöntemi ile İnhibisyon Zonlarının Belirlenmesi**

Bu yöntem için öncelikle *H. pylori* ATCC 700824 suşu %5 FBS içeren sıvı Brucella Broth besiyerinde pasajlanarak mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Daha önce hazırlanan katı besiyerlerine  $1 \times 10^7$  kob/mL sayıda hazırlanan bakteri süspansiyonundan 10 µL ekim yapıldı. Klaritromisin, *Alpinia officinarum* Ekstraktı, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-ALP-CLR için 1024, 512, 256, 128 ve 64 µg/mL konsantrasyonları hazırlandı. Diskler hazırlanan konsantrasyonlara batırılıp bakteri ekimi yapılan petrilere aralıklarla yerleştirildi. Petrilere mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 48 saat inkübe edildi ve oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçüldü.

### **3.2.8 Klaritromisinin *Alpinia officinarum* Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin J774 ve AGS Hücre hatlarında Sitotoksosite Analizleri**

Antibakteriyel etkinlikleri *H. pylori* üzerinde incelenen klaritromisinin, *Alpinia officinarum* ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-ALP-CLR nanopartiküllerinin toksisiteleri j774 normal fare makrofaj ve ATCC CRL-1739 AGS insan mide kanseri hücre hatlarında incelendi. Sitotoksosite analizleri için vücuttaki sağlıklı hücrelerle nanopartiküllerin etkileşimi incelemek için makrofaj hücre hattı seçildi. Ayrıca, *H. pylori*'nin tedavisinde kullanılması amaçlanan nanopartiküllerin, *H. pylori* enfeksiyonunun da neden olduğu bilinen mide kanseriyle etkileşimini de incelemek amacıyla sitotoksosite çalışmalarında mide kanseri hücre hattı kullanıldı.

### **3.2.8.1 Klaritromisin *Alpinia officinarum* Ekstraktı ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattında Toksisitelerinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi**

#### **J774 Hücre Hattının Kültürü ve Karakterizasyonu**

Sitotoksosite deneylerinde Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü “Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği” laboratuvarındaki sıvı azot tankında bulunan J774 Makrofaj Hücre Hattı kullanıldı.

#### **J774 Hücre Hattının Kriyobanktan Çıkarılması ve Kültürü**

Kriyobanktan çıkarılan hücreler kriyotüpler içerisinde 37°C’de su banyosunda çözdürüldü. %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyerine aktarıldı, 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin yer aldığı pelletin üzerine 5 mL %10 FBS içeren RPMI 1640 besiyeri eklendi ve T25’lik flasklara hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Hücreler invert mikroskopta 24 saatte bir incelendi.

Yarı süspanse J774 hücrelerinin pasajı için flaskın duvarlarına hafifçe vurarak hücreler kaldırıldı ve falkona alınarak 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi. Ardından Thoma lamında deneyler için hücre sayımı yapıldı.

#### **J774 Makrofaj Hücrelerinin Sayımı**

Sayım için öncelikle J774 makrofaj hücreleri flasktan kaldırıldı ve 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 1 mL besiyeri eklenerek hücreler kaldırıldı. Eppendorf tüpüne 48 µl PBS, 50 µl tripan mavisi boyası ve 2 µl hücre alındı ve pipetaj yapıldı. Thoma lamının iki tarafına hazırlanan süspansiyondan 10’ar µl konuldu ve mikroskopta sayım gerçekleştirildi. 1 mL içerisindeki hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanıldı.

Hücre Sayısı = Ortalama canlı hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x Thoma lamı sabiti

Ortalama hücre sayısı: Thoma lamının alt ve üst kısımlarında bulunan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalaması

Sulandırma katsayısı: Pelletten alınan hücrelerin sayımı için yapılmış sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10.000

### **J774 Makrofaj Hücrelerin Kriyoprezervasyonu**

J774 hücrelerin kriyoprezervasyonu için %20 DMSO içeren FBS ile dondurma solüsyonu hazırlandı. 1 mL'lik kriyotüplere 1.000.000 hücre içeren 500 mL besiyeri konuldu. Üzerine damla damla 500 mL kriyoprotektan eklenerek yavaş dondurma yöntemi ile donduruldu. Bu amaçla kriyotüpler öncelikle 1 saat +4 °C'de, 2 saat -20°C'de, bir gece boyunca -40°C'de bekletildi ve ardından -196°C'deki azot tankına yerleştirildi.

Klaritromisin, *Alpinia officinarum* ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-ALP-CLR nanopartiküllerinin (1024 – 32 µg/mL) sitotoksiteleri J774 makrofaj hücreleri üzerinde incelendi. Öncelikle 96'lık well platede her bir kuyuda 100 µl besiyeri içerisinde 10<sup>4</sup> sayıda hücre olacak şekilde makrofajların ekimi gerçekleştirildi ve 1 gün 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. 24 saatin ardından kuyucuklardaki hücreler invert mikroskopta incelendi, belirtilen formülasyonlar hücrelere verildi ve 48 saat inkübe edildi. Daha sonra MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 4 saat 37°C etüvde inkübe edildi. Mikroskopta formazan kristallerinin oluşumu incelendi. Her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi ve oluşan kristallerin çözünmesi için 30 dakika karanlık ortamda plate bekletildi. ELISA reader ile 570 nm'de ölçüm alındı.

### **3.2.8.2 Klaritromisinin *Alpinia officinarum* Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin ATCC CRL-1739 AGS Hücre Hattı Üzerinde Etkinliklerinin İncelenmesi**

#### **AGS Hücre Hattının Kültürü ve Karakterizasyonu**

Sitotoksite deneylerinde Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü "Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği" laboratuvarındaki sıvı azot tankında bulunan AGS kanser hücre hattı kullanıldı.

### **AGS Hücre Hattının Kriyobanktan Çıkarılması ve Kültürü**

Kriyobanktan çıkarılan hücreler kriyotüpler içerisinde 37°C'de su banyosunda çözdürüldü. %10 FBS içeren DMEM F-12 besiyerine aktarıldı, 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücrelerin yer aldığı pelletin üzerine 5 mL %10 FBS içeren DMEM F-12 besiyeri eklendi ve T25'lik flasklara hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Hücreler invert mikroskopta 24 saatte bir incelendi.

AGS hücrelerinin pasajı besiyeri flasktan uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama yapıldı. Flaska 1 mL tripsin solüsyonu eklendi ve 5 dakika etüvde inkübe edildi. Mikroskopta hücrelerin flasktan ayrılması görüntülendi. Flaska 4 mL DMEM-F12 besiyerini ilave edildi ve pipetaj yapılarak hücreler flasktan alınarak falkona aktarıldı ve 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi. Ardından Thoma lamında deneyler için hücre sayımı yapıldı.

### **AGS Hücrelerinin Sayımı**

Sayım için öncelikle kanser hücreleri flasktan kaldırıldı ve 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve falkonda kalan pelletin üzerine 1 mL DMEM-F12 besiyeri eklenerek hücreler kaldırıldı. Eppendorf tüpüne 48 µl PBS, 50 µl tripan mavisi boyası alındı ve 2 µl hücre ilave edilerek pipetaj yapıldı. Thoma lamının iki tarafına hazırlanan süspansiyondan 10'ar µl konuldu ve mikroskopta sayım gerçekleştirildi. 1 mL içerisindeki hücre sayısını hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanıldı.

Hücre Sayısı = Ortalama canlı hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x Thoma lamı sabiti

Ortalama hücre sayısı: Thoma lamının alt ve üst kısımlarında bulunan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalaması

Sulandırma katsayısı: Pelletten alınan hücrelerin sayımı için yapılmış sulandırma katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10.000

## **AGS Hücrelerin Kriyoprezervasyonu**

AGS hücrelerin kriyoprezervasyonu için %20 DMSO içeren FBS ile dondurma solüsyonu hazırlandı. 1 mL'lik kriyotüplere 1.000.000 hücre içeren 500 mL besiyeri konuldu. Üzerine damla damla 500 mL kriyoprotektan eklenerek yavaş dondurma yöntemi ile donduruldu. Bu amaçla kriyotüpler öncelikle 1 saat +4 °C'de, 2 saat -20°C'de, bir gece boyunca -40°C'de bekletildi ve ardından -196°C'deki azot tankına yerleştirildi.

*Alpinia officinarum* ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-ALP-CLR nanopartiküllerinin antikansorejen etkinliklerinin ve *H. pylori* tedavisinde kullanılan bir antibiyotik olan klaritromisin'in mide kanseri hücreleri üzerindeki etkinliğinin incelenmesi için MTT yöntemi uygulandı. Öncelikle her bir etken için 1024 – 32 µg/mL arasında konsantrasyona sahip formülasyonlar hazırlandı. 96'lık well platede her bir kuyuda 100 µl besiyeri içerisinde 10<sup>4</sup> sayıda hücre olacak şekilde hücrelerim ekimi gerçekleştirildi ve 1 gün 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. 24 saatin ardından kuyucuklardaki hücreler invert mikroskopta incelendi, belirtilen formülasyonlar hücrelere verildi ve 48 saat inkübe edildi. Daha sonra MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 4 saat 37°C etüvde inkübe edildi. Mikroskopta formazan kristallerinin oluşumu incelendi. Her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi ve oluşan kristallerin çözünmesi için plate, 30 dakika karanlık ortamda bekletildi. ELISA reader ile 570 nm'de ölçüm alındı.

#### 4.1 *Helicobacter pylori*'nin Morfolojik Değerlendirilmesi ve Biyokimyasal Özellikleri

*H. pylori*'nin morfolojik değerlendirilmesi ışık mikroskobu kullanılarak ve gram boyama uygulanarak yapıldı. Kriyobanktan çıkarılan bakterilerin inkübasyonunun ardından alınan örnekler lam üzerine yayılarak ışık mikroskobu altında 40X büyütme ile incelendi. Bakteriye özgü hareketler ışık mikroskobunda gözlemlendi.

Gram boyama yapılan örneklerde ise bakterilerin pembe renge boyanması *H. pylori*'nin gram pozitif bir bakteri olduğunu doğrulamaktadır. Gram boyama yapılmış örneklerin bulunduğu lama immersiyon yağı damlatılarak 100X büyütme altında ışık mikroskobunda inceleme gerçekleştirildi. *H. pylori* bakterilerinin spiral formları gram boyama yöntemi ile de görüntülendi (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1** *Helicobacter pylori* gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü (100X büyütme)

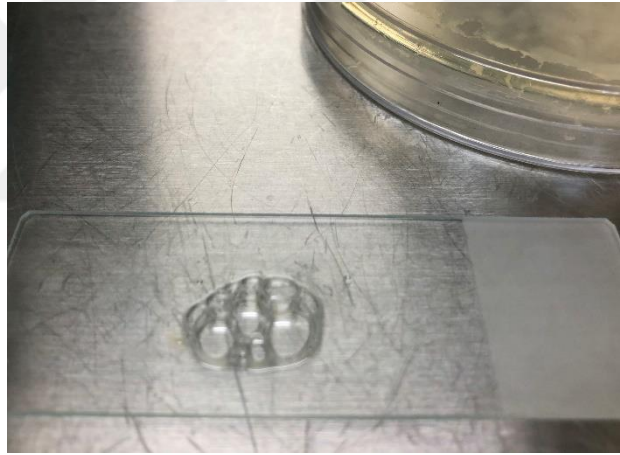
Üreme görülen petrilerden alınan bir koloni eppendorflara daha önce hazırlanmış olan üre besiyerinin üzerine yayıldı ve 37 °C'de etüve kaldırıldı. 10 dakikanın

ardından *H. pylori*'nin üreaz pozitif olmasından kaynaklı olarak besiyerinde pembe renk oluşumu görüldü (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 *Helicobacter pylori*'nin üreaz aktivitesi

Katalaz testi için de katı ve sıvı besiyerinden alınan bakteri örnekleri lama yayıldı ve üzerine %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatıldı. Kabarcık oluşumunun görülmesi (Şekil 4.3) ile bakteri katalaz pozitif olarak kabul edildi.

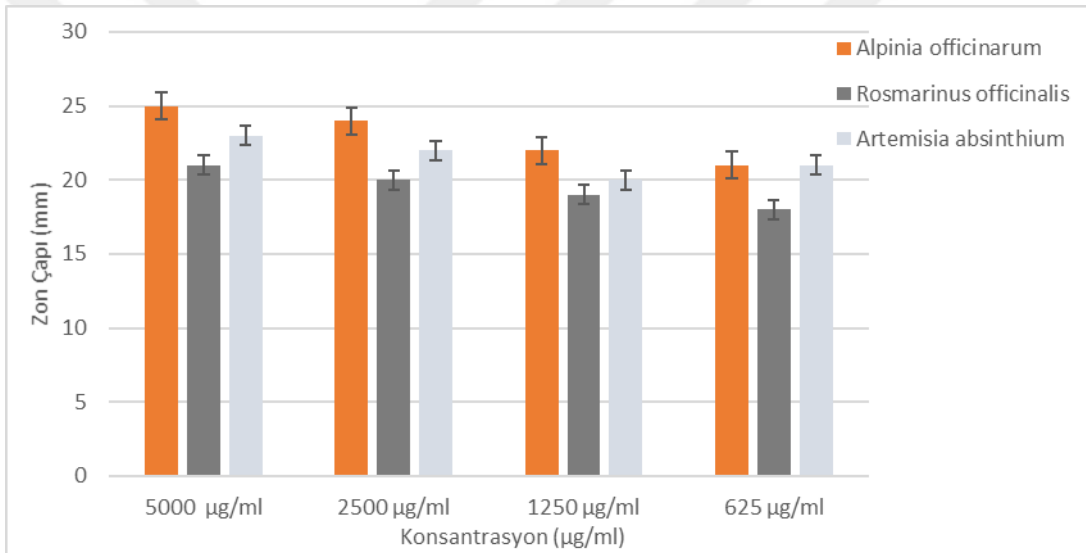


Şekil 4.3 *Helicobacter pylori*'nin katalaz aktivitesi

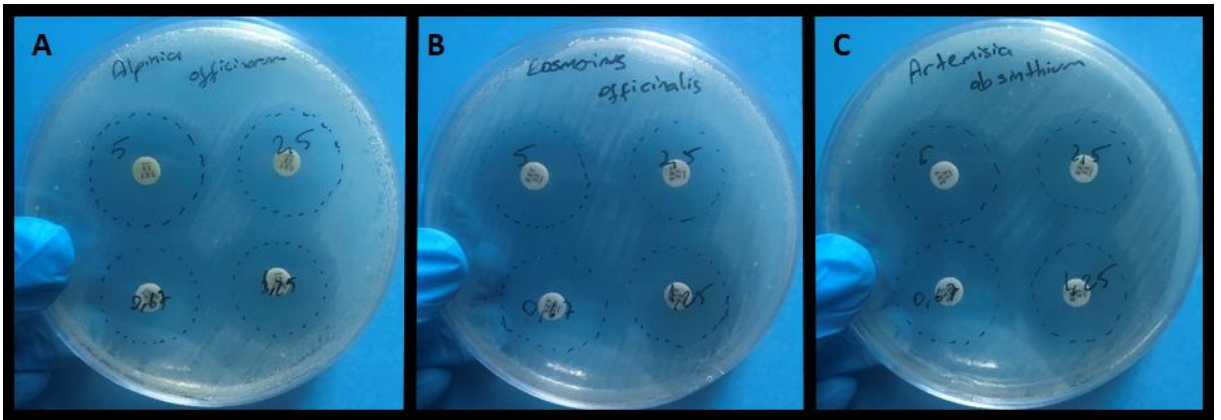
#### 4.2 Bitki Ekstraktlarının Antibakteriyel Etkisinin *Helicobacter pylori* Kültüründe Disk Difüzyon Yöntemi ile Analizi

Bitki örneklerinin (*Rosmarinus Officinalis*, *Artemisia absinthium L.*, *Alpinia officinarum*) metanol içersinde ekstrakte edilmesinin ardından karışımların alkol bileşeni 40 °C'de basınç altında evaporatör ile buharlaştırıldı. Daha sonra örnekler liyofilize edildi.

Bitki ekstraktlarının sıvı Brucella Broth besiyeri ile farklı konsantrasyonları (5-2,5-1,25 ve 0,625 mg/mL) hazırlandı. Disk difüzyon yöntemi ile *H. pylori* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkinliği incelendi ve şekil 4.4'de verilen inhibisyon zon çapları belirlendi. Bitki ekstraktlarının incelenen konsantrasyonlarda ATCC 700824 *H. pylori* suşuna karşı antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu belirlendi. İncelenen bitkisel ekstraktlardan *Alpinia officinarum* ekstraktının 5, 25, ve 1,25 mg/mL konsantrasyonlarında diğer bitkisel ekstraktlara kıyasla daha büyük inhibisyon zonu oluşturduğu ve en düşük konsantrasyon olan 0,625 mg/mL'de ise *Artemisia absinthium* ekstraktıyla aynı çapta inhibisyon zonu oluşturduğu belirlendi. Bu nedenle nanopartikül ile yapılacak çalışmalarda *Alpinia officinarum* ekstraktı ile çalışılmasına karar verildi.



Şekil 4.4 Bitki ekstraktlarının inhibisyon zonları



Şekil 4.5 Bitki ekstraktlarının *H. pylori* üzerinde etkinliği (Disk difüzyon yöntemi)

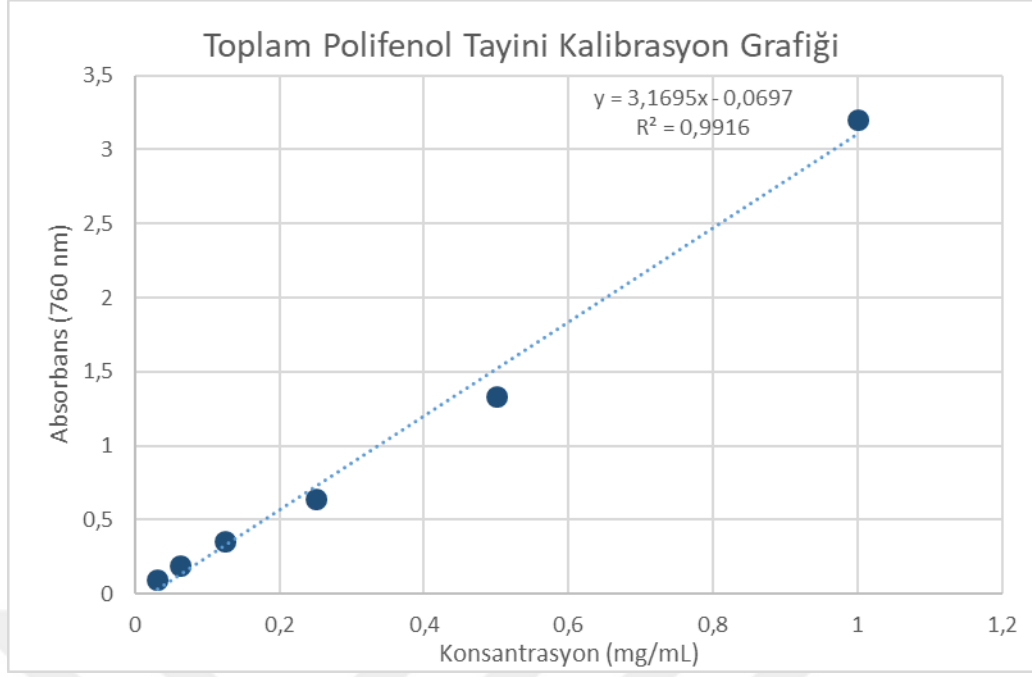
### 4.3 *Alpinia officinarum* Ekstraktının Toplam Fenolik Madde Tayini

Kalibrasyon grafiğinin hazırlanmasında, fenolik bir bileşik olan gallik asit standart olarak kullanıldı. Gallik asidin farklı konsantrasyonları (1-0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125 mg/mL) metanol ile hazırlandı. Konsantrasyonlar, %10'luk Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve Fenol reaktifi ile 2 saat inkübe edildi ve ardından 760 nm'de UV spektrofotometre ile absorbansları okunarak şekil 4.7'de verilen konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi.

Toplam fenolik madde tayini redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Fenolik bileşikler bazik ortamda Folin-Ciocalteu ayırıcını indirgeyip oksitlenmiş forma dönüşerek maddenin fenol içeriğine bağlı olarak mavi renk oluşturmaktadır. Oluşan kompleksin renk şiddeti fenolik maddelerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Şekil 4.6'da 2 saatlik inkübasyonun ardından farklı konsantrasyonlarda gallik asit ile hazırlanan örneklerin azalan konsantrasyonla doğru orantılı olarak azalan mavi renk şiddeti görülmektedir.

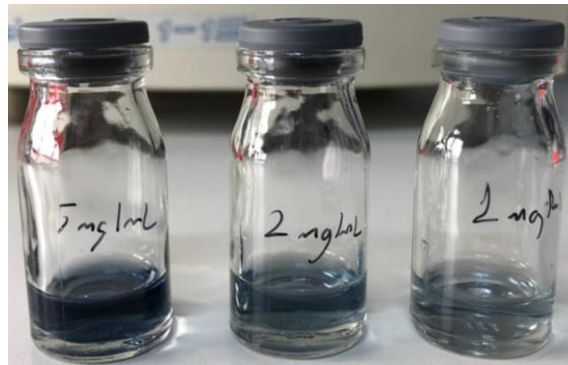


Şekil 4.6 2 saatlik inkübasyonun ardından gallik asitin farklı konsantrasyonlarının mavi renk şiddeti



**Şekil 4.7** Gallik asitin standart grafiği

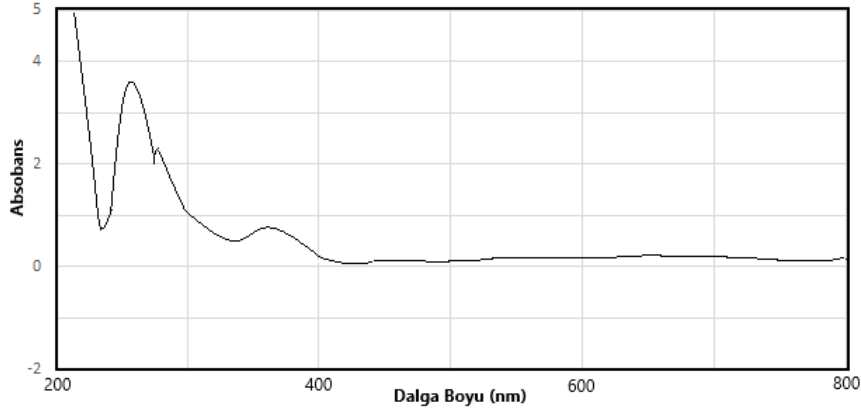
Çizilen kalibrasyon grafiğine bağlı olarak *Alpinia officinarum* ekstraktlarının farklı konsantrasyonlardaki (5, 2 ve 1 mg/mL) fenolik madde miktarları hesaplandı. *Alpinia officinarum*un 5, 2 ve 1 mg/mL olarak metanol ile hazırlanan farklı konsantrasyonları için gallik asit eşdeğeri fenolik madde miktarları sırasıyla; 0,5644, 0,2732 ve 0,1468 mg olarak belirlendi. Buna bağlı olarak ekstraktın 1 gramındaki gallik asit eşdeğeri [mg GAE (Gallik Asit Eşdeğeri) / g *Alpinia officinarum* ekstraktı] fenolik madde miktarı 102,75 mg olarak hesaplandı.



**Şekil 4.8** 2 saatlik inkübasyonun ardından *Alpinia officinarum* ekstraktının farklı konsantrasyonlarının mavi renk şiddeti

*Alpinia officinarum* metanolik ekstraktının UV-Vis spektrofotometre cihazı ile 200 nm ile 800 nm arası spektrumu alındı. Ekstraktın spektrumunda 268 nm 280 nm ve

358 nm'de absorpsiyon pikleri görüldü. *Alpinia officinarum*un ekstraktının spektrumunda 280 nm'de absorbans görülmesi fenolik, 254-280 nm ve 340-360 nm'de absorbans görülmesi ise flavonoidlerin varlığını göstermektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 *Alpinia officinarum*un metanolik ekstraktının UV-Vis spektrumu

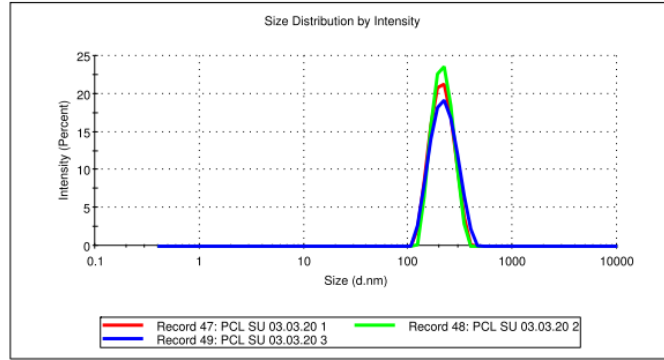
## 4.4 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

### 4.4.1 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Boyut Analizi

Boş PCL, klaritromisin enkapsüle PCL, *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL ve klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL nanopartiküllerinin dinamik ışık saçılması yöntemi ile ölçülen boyut dağılım grafikleri Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de verildi. Sentezlenen nanopartiküllerin boyutlarının ortalamaları boş PCL nanopartikülleri için 208,5 nm; klaritromisin enkapsüle PCL nanopartikülleri için 216,5 nm; *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL nanopartikülleri için 213,7 nm ve klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL nanopartikülleri için 213,9 nm olarak ölçüldü. Boş PCL, klaritromisin enkapsüle PCL, *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL ve klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL nanopartiküllerinin çoklu dağılım indisi değerleri ise sırasıyla ortalama 0,076; 0,114; 0,066 ve 0,034 olarak saptandı.

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 208,5	<b>Peak 1:</b> 225,1	100,0	62,89
<b>Pdl:</b> 0,076	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,959	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

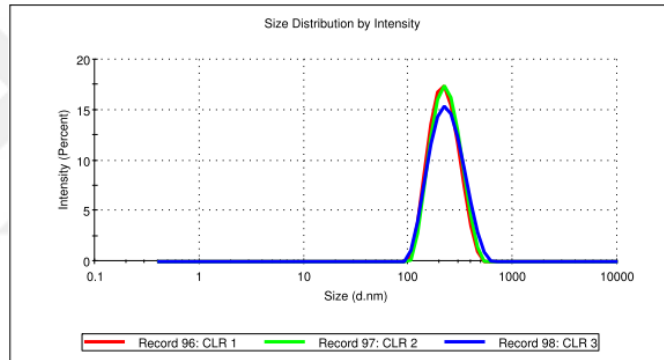
**Result quality** Good



Şekil 4.10 Boş PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 216,5	<b>Peak 1:</b> 244,1	100,0	87,30
<b>Pdl:</b> 0,114	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,959	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

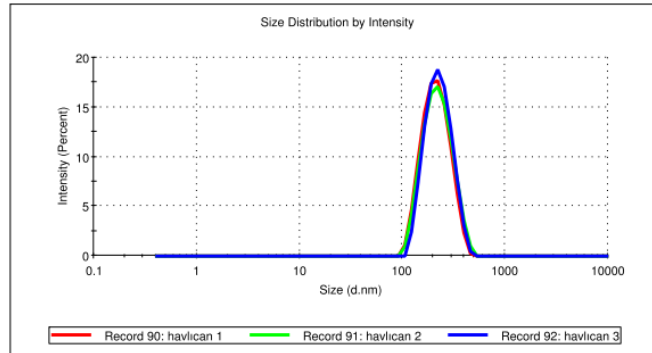
**Result quality** Good



Şekil 4.11 Klaritromisin enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 213,7	<b>Peak 1:</b> 230,9	100,0	66,55
<b>Pdl:</b> 0,066	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,944	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

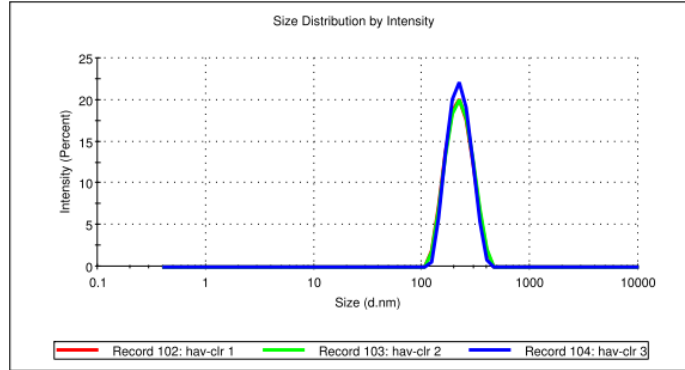
**Result quality** Good



Şekil 4.12 *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL Nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut dağılım grafiği

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 213,9	<b>Peak 1:</b> 225,5	100,0	54,79
<b>Pdl:</b> 0,034	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,959	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000

**Result quality** Good



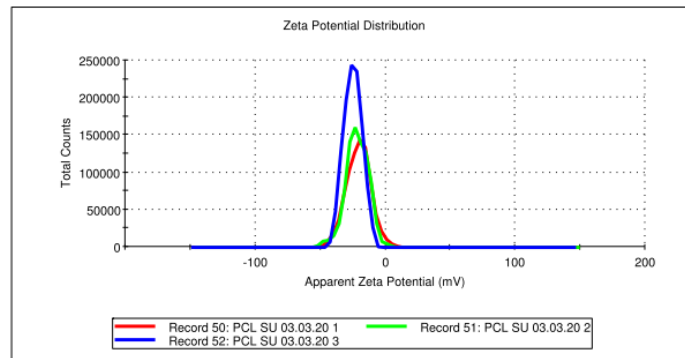
**Şekil 4.13** Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer boyut grafiği

#### 4.4.2 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Zeta Potansiyel Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri elektroforetik ışık saçılması yöntemi ile ölçüldü ve Şekil 4.14, Şekil 4.15 Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de verildi. Sentezlenen nanopartiküllerin ortalama zeta potansiyelleri boş PCL nanopartikülleri için -24,9 mV; klaritromisin enkapsüle PCL nanopartikülleri için -16,6 mV; *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL nanopartikülleri için -18,8 mV ve klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL nanopartikülleri için -15,6 mV olarak ölçüldü.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV):</b> -24,9	<b>Peak 1:</b> -24,9	100,0	6,95
<b>Zeta Deviation (mV):</b> 6,95	<b>Peak 2:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm):</b> 0,00701	<b>Peak 3:</b> 0,00	0,0	0,00

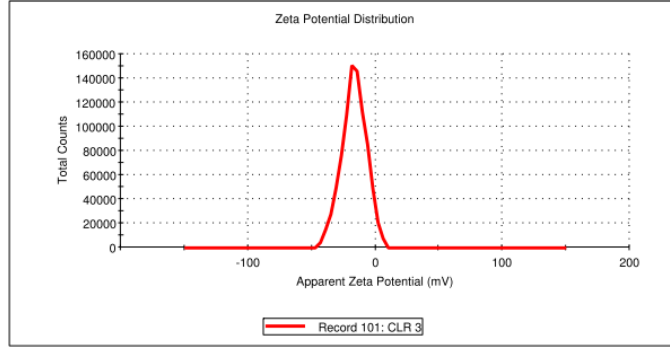
**Result quality** Good



**Şekil 4.14** Boş PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV):</b> -16,6	<b>Peak 1:</b> -16,6	100,0	9,57
<b>Zeta Deviation (mV):</b> 9,57	<b>Peak 2:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm):</b> 0,00482	<b>Peak 3:</b> 0,00	0,0	0,00

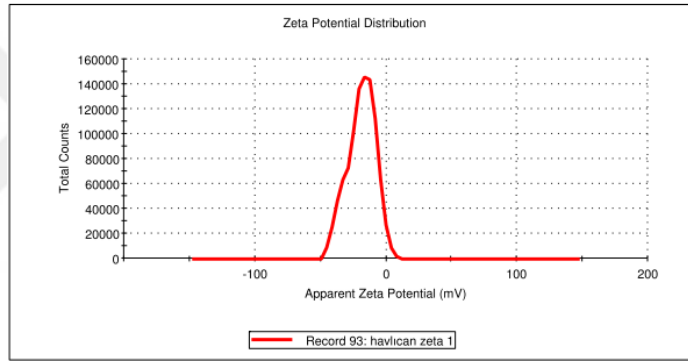
**Result quality Good**



Şekil 4.15 Klaritromisin enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV):</b> -18,8	<b>Peak 1:</b> -18,8	100,0	10,5
<b>Zeta Deviation (mV):</b> 10,5	<b>Peak 2:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm):</b> 0,00452	<b>Peak 3:</b> 0,00	0,0	0,00

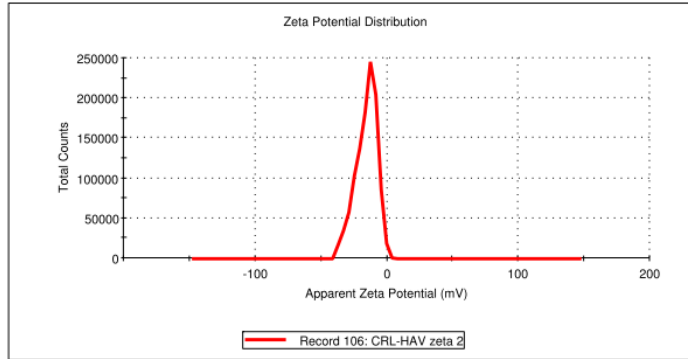
**Result quality Good**



Şekil 4.16 Alpinia officinarum ekstraktı enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV):</b> -15,6	<b>Peak 1:</b> -15,6	100,0	8,02
<b>Zeta Deviation (mV):</b> 8,02	<b>Peak 2:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm):</b> 0,0234	<b>Peak 3:</b> 0,00	0,0	0,00

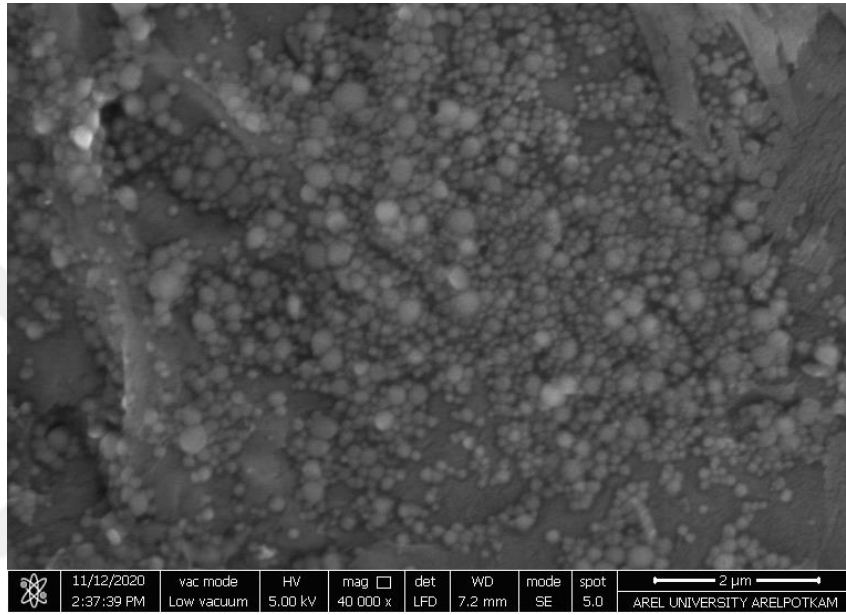
**Result quality Good**



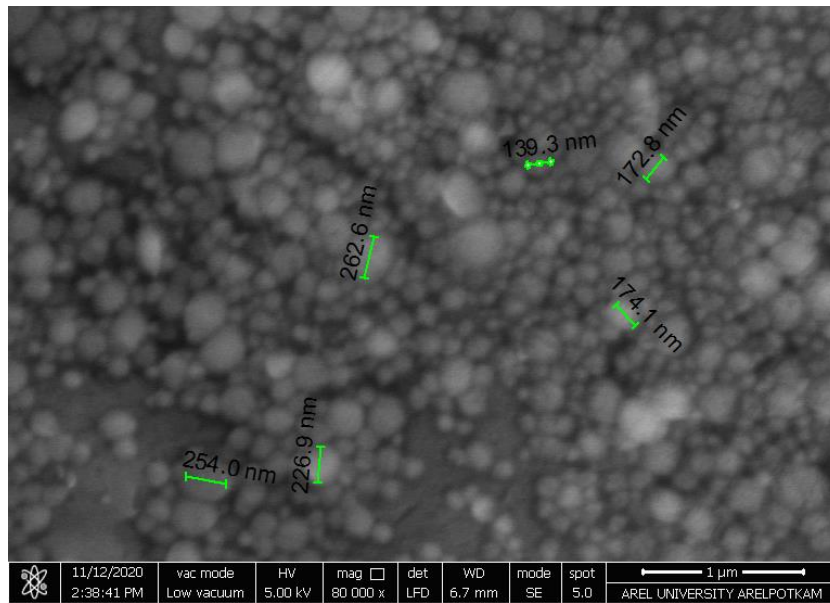
Şekil 4.17 Klaritromisin ve Alpinia officinarum ekstraktı enkapsüle PCL nanopartiküllerinin Zeta-Sizer zeta potansiyel grafiği

#### 4.4.3 Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi

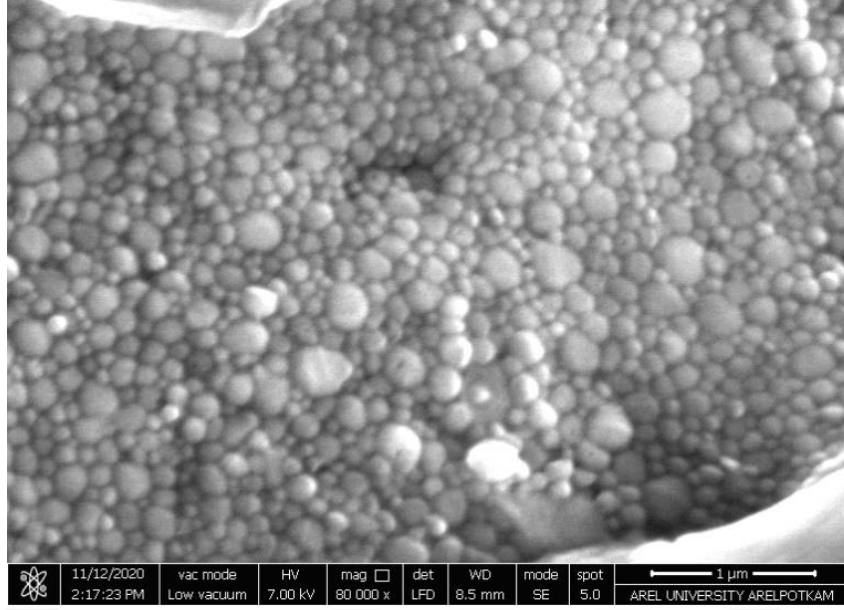
Şekil 4.18-4.23'te PCL-CLR, PCL-ALP, PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin farklı büyütme oranlarında taramalı elektron mikroskobu alınan görüntüleri verilmiştir. Nanopartiküllerin SEM görüntüleri incelendiğinde yüzeylerinde herhangi bir etken madde görülmedi. Nanopartiküllerin, morfolojik olarak düzgün, pürüzsüz, küresel ve homojen boyut dağılımına sahip olduğu görüldü. Görüntüler Zetasizer boyut ölçümleriyle birbirini desteklemektedir.



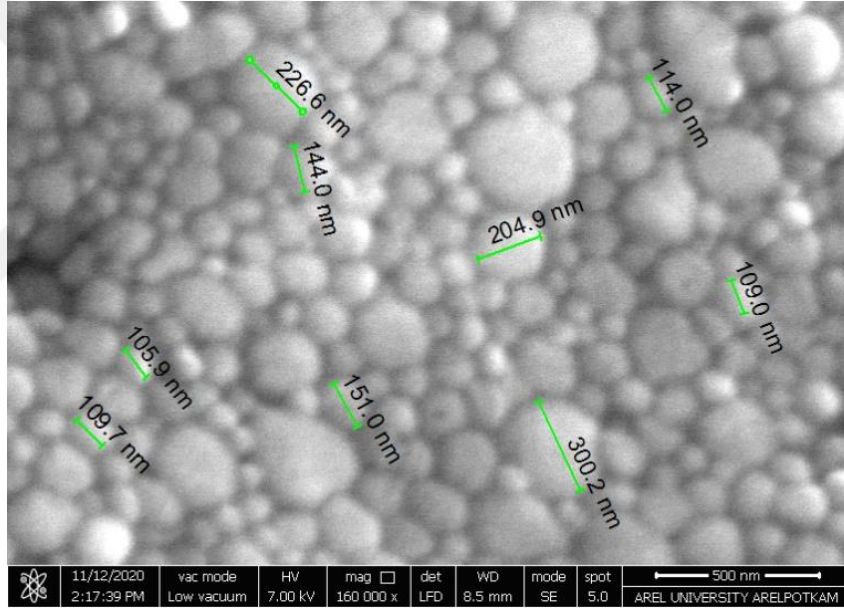
Şekil 4.18 PCL-CLR nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (40.000X)



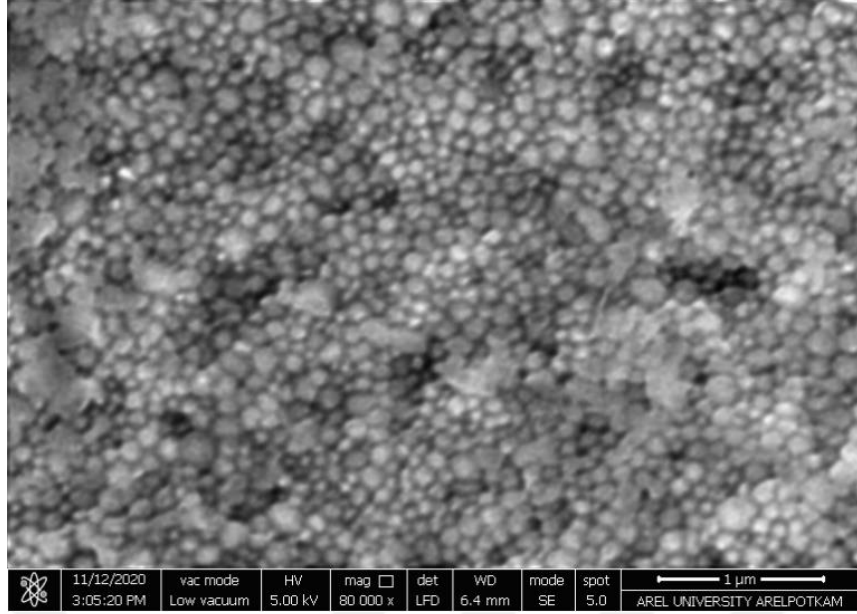
Şekil 4.19 PCL-CLR nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X)



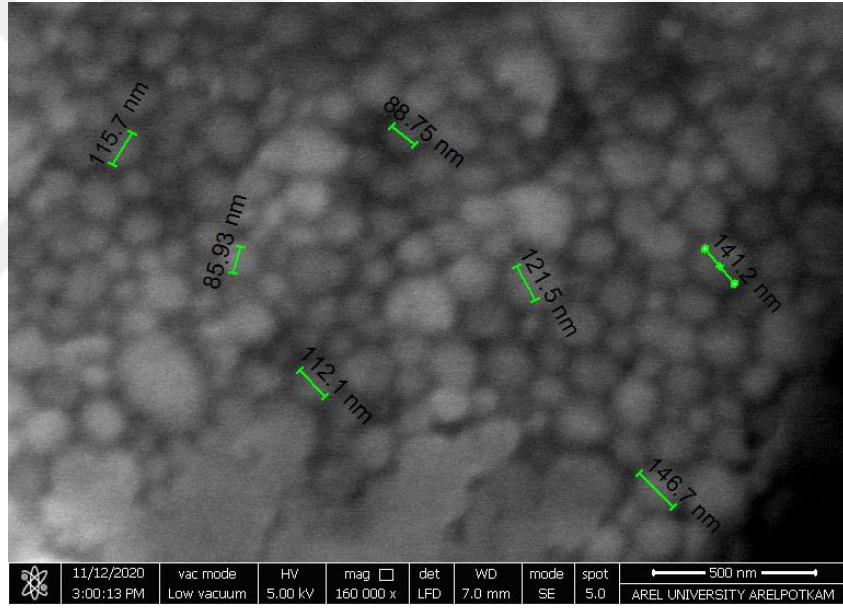
Şekil 4.20 PCL-ALP nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X)



Şekil 4.21 PCL-ALP nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (160.000X)



Şekil 4.22 PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (80.000X)



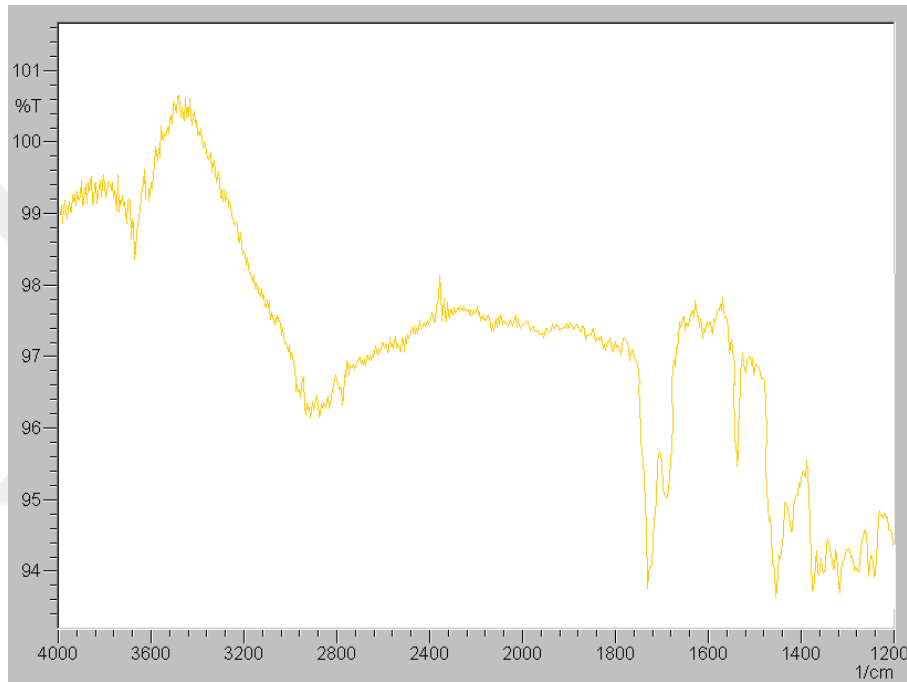
Şekil 4.23 PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (160.000X)

#### 4.4.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi Analizi

Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktının nanopartiküllere enkapsülasyonunun incelenmesi amacıyla *Alpinia officinarum* ekstraktının, klaritromisin, boş PCL ve etken madde yüklü PCL-CLR, PCL-ALP, PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre cihazında 4000-1200  $\text{cm}^{-1}$  aralığında spektrum ölçümleri gerçekleştirildi.

### **Klaritromisin'in FT-IR Spektrumu**

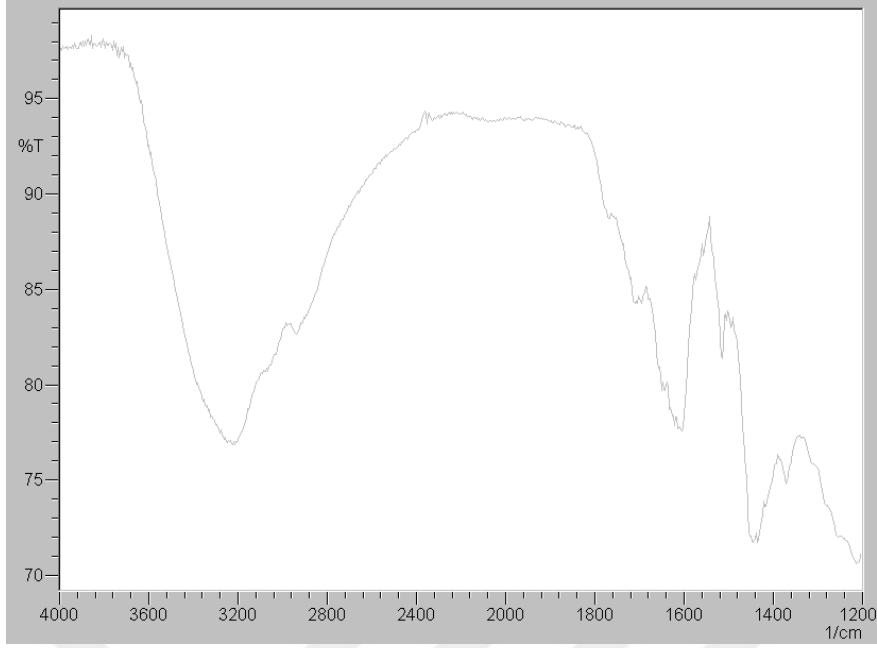
Klaritromisin'in FT-IR spektrumu şekil 4.24'de görülmektedir. 1390-1200  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bantlar  $\text{CH}_2$  fonksiyonel gruplarının gerilme titreşimlerinin varlığını göstermektedir. 1690-1680 $\text{cm}^{-1}$  arasında görülen bant lakton halkası içindeki keton grubundaki karbonil gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1690-1745  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bant lakton halkasındaki karbonil gerilmelerinin (O=C=O) titreşimlerini temsil etmektedir. 3000-2780  $\text{cm}^{-1}$  arasında belirlenen bantlar alkan (C-H) gerilmelerine aittir.



**Şekil 4.24** Klaritromisin'in FT-IR spektrumu

### ***Alpinia officinarum*'un Ekstraktının FT-IR Spektrumu**

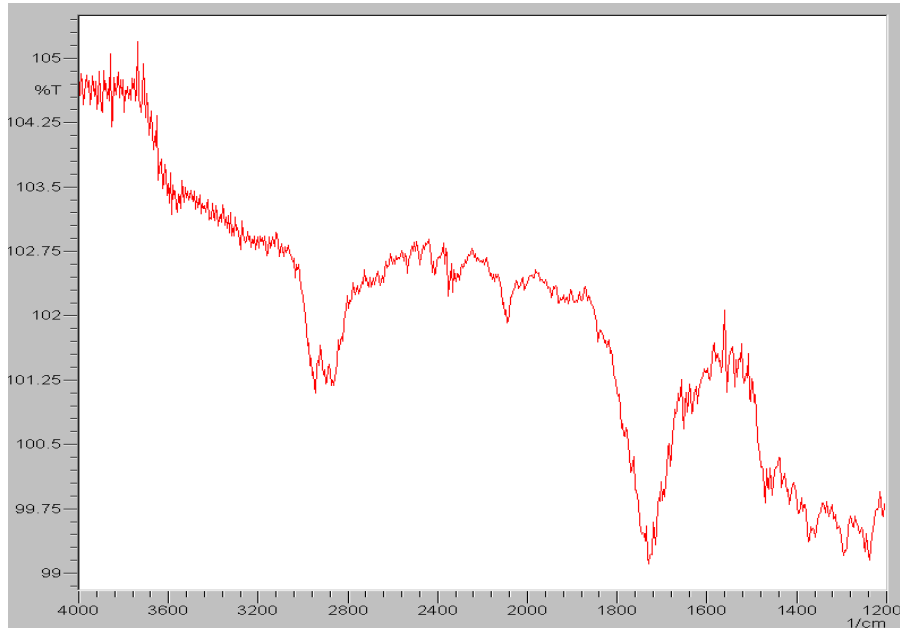
*Alpinia officinarum*'un metanolik ekstraktının FT-IR spektrumu şekil 4.25'te görülmektedir. 3400-3200  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki şiddetli bant *Alpinia officinarum*'un içerdiği çeşitli metabolitlerin OH gruplarından kaynaklı absorpsiyonu göstermektedir. 3000-2760  $\text{cm}^{-1}$  arasında görülen zayıf bantlar alifatik O-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1670-1600  $\text{cm}^{-1}$  arasında görülen bantlar aromatik halkalardaki C=C gerilme titreşimlerini temsil etmektedir. 1440-1395  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bantlar O-H eğilme titreşimlerine aittir. 1380-1360  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bant karboksil gruplarındaki C-O gerilme titreşimlerinin varlığını göstermektedir.



**Şekil 4.25** *Alpinia officinarum* ekstraktının FT-IR spektrumu

### **Boş PCL Nanopartiküllerinin FT-IR Spektrumu**

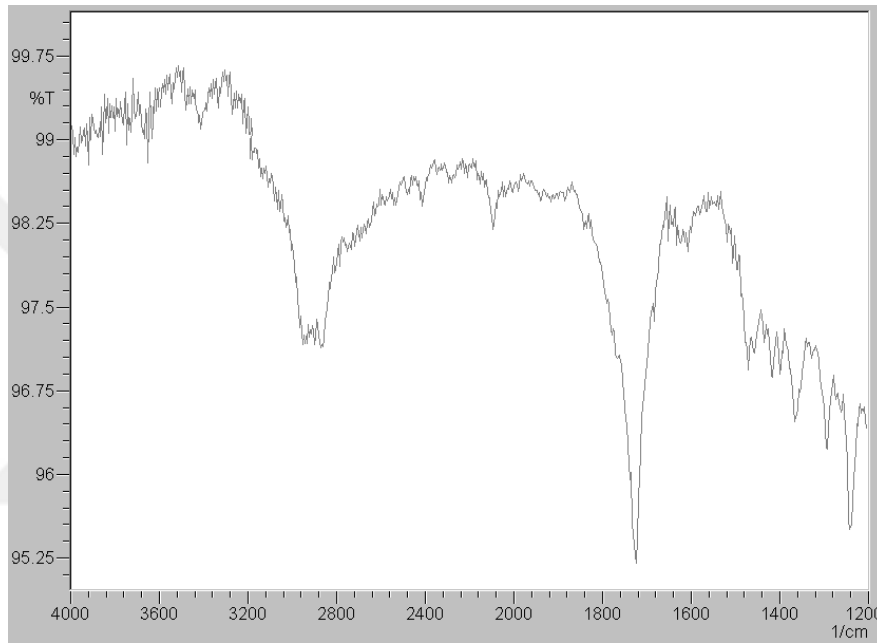
Boş PCL nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu şekil 4.26'da görülmektedir. 2950-2940  $\text{cm}^{-1}$  arasında görülen karakteristik bant asimetrik  $\text{CH}_2$  gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1730-1720  $\text{cm}^{-1}$  arasında görülen bant karbonil gerilme titreşimlerini temsil etmektedir. 1290-1200  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki bantlar C-O ve C-C gerilme titreşimlerine aittir.



**Şekil 4.26** Boş PCL nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu

### PCL-CLR Nanopartiküllerinin FT-IR Spektrumu

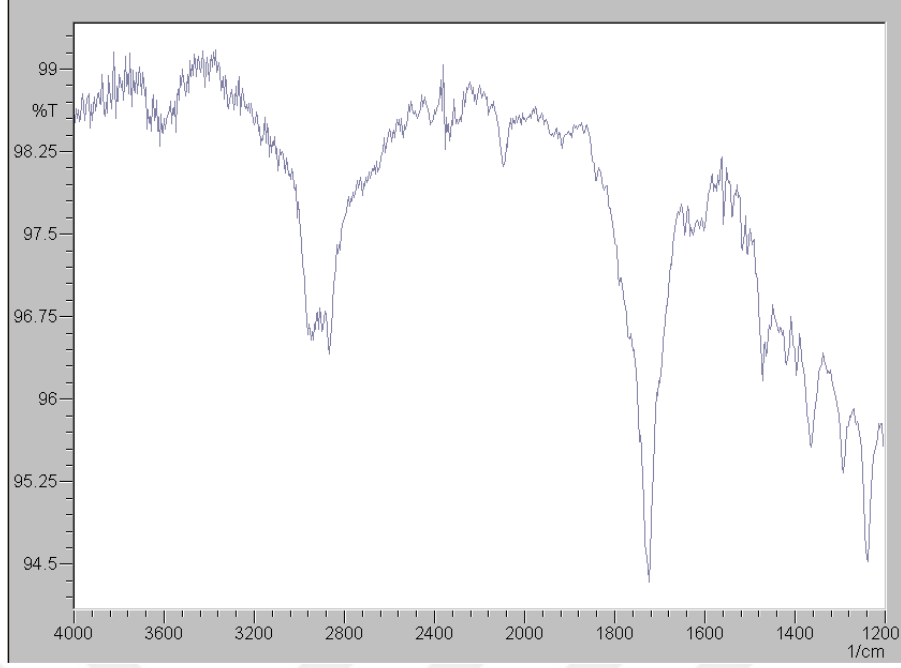
Klaritromisin yüklü PCL nanopartiküllerine ait FTIR spektrumu şekil 4.27’de görülmektedir. Klaritromisinin FT-IR spektrumunda antibiyotiğe özgü 1390-1200  $\text{cm}^{-1}$  ve 1690-1680  $\text{cm}^{-1}$  bantların PCL-CLR nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda görülmemesi klaritromisinin nanopartiküllerin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda PCL nanopartiküllerine spesifik 2950-2940  $\text{cm}^{-1}$  ve 1730-1720  $\text{cm}^{-1}$  bantlarının görülmesi enkapsülasyonu doğrulamaktadır.



Şekil 4.27 PCL-CLR nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu

### PCL-ALP Nanopartiküllerinin FT-IR Spektrumu

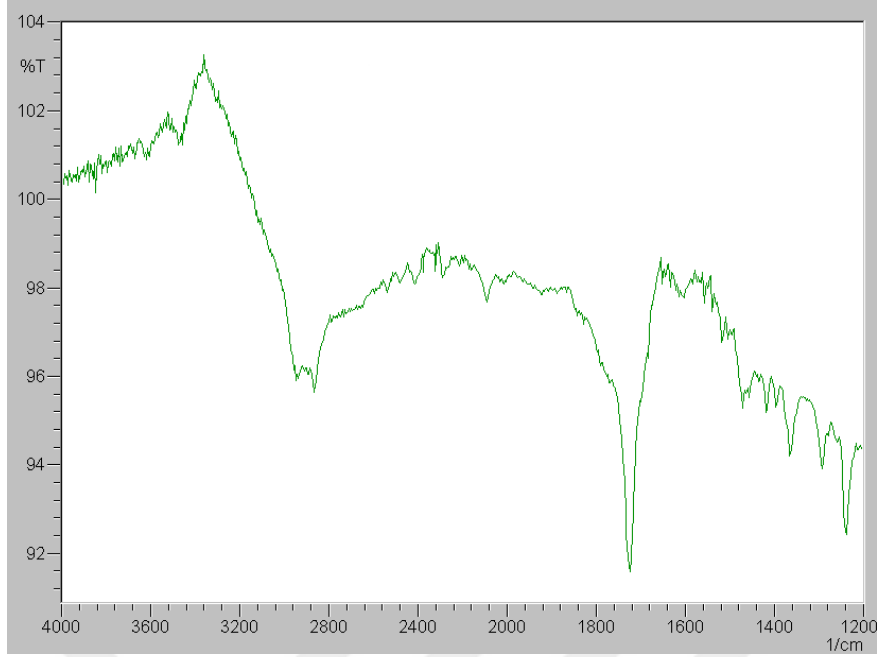
*Alpinia officinarum* ekstraktı yüklü PCL nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu şekil 4.28’de görülmektedir. *Alpinia officinarum*un FT-IR spektrumunda ekstrakta özgü 1670-1600  $\text{cm}^{-1}$  ve 1440-1395  $\text{cm}^{-1}$  bantlarının PCL-ALP nanopartiküllerinin FTIR spektrumunda görülmemesi bitkisel ekstraktın nanopartiküllerin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda PCL nanopartiküllerine spesifik 2950-2940  $\text{cm}^{-1}$  ve 1730-1720  $\text{cm}^{-1}$  bantlarının görülmesi enkapsülasyonu doğrulamaktadır.



**Şekil 4.28** PCL-ALP nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu

#### **PCL-CLR-ALP Nanopartiküllerinin FT-IR Spektrumu**

*Alpinia officinarum* ekstraktı ve klaritromisin yüklü PCL nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu şekil 4.29’de görülmektedir. *Alpinia officinarum*un FTIR spektrumunda ekstrakta özgü  $1670-1600\text{ cm}^{-1}$  ve  $1440-1395\text{ cm}^{-1}$  bantların PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda görülmemesi bitkisel ekstraktın nanopartiküllerin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda antibiyotiğe özgü  $1390-1200\text{ cm}^{-1}$  ve  $1690-1680\text{ cm}^{-1}$  bantlarının PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda görülmemesi klaritromisinin nanopartiküllerin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, PCL nanopartiküllerine spesifik  $2950-2940\text{ cm}^{-1}$  ve  $1730-1720\text{ cm}^{-1}$  bantlarının görülmesi enkapsülasyonu doğrulamaktadır.



**Şekil 4.29** PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin FT-IR spektrumu

#### 4.4.5 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Reaksiyon Verimi

Çözücü buharlaştırma yöntemi ile elde edilen klaritromisin ve/veya *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle edilmiş PCL nanopartiküllerinin reaksiyon verimi materyal ve metot bölümünde verilen formüle göre hesaplandı. Reaksiyon verimleri tablo 4.1’de verildi.

**Tablo 4.1** Polikaprolakton nanopartiküllerinin reaksiyon verimi

Nanopartikül	Reaksiyon Verimi (%)
PCL-CLR	43
PCL-ALP	50
PCL-CLR-ALP	47

#### 4.4.6 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Enkapsülasyon Etkinliği

Çözücü buharlaştırma yöntemi ile elde edilen klaritromisin ve/veya *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle edilmiş PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon

etkinliği materyal ve metot bölümünde verilen formüle göre hesaplandı. Reaksiyon verimleri tablo 4.2’de verildi.

**Tablo 4.2** Polikaprolakton nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği

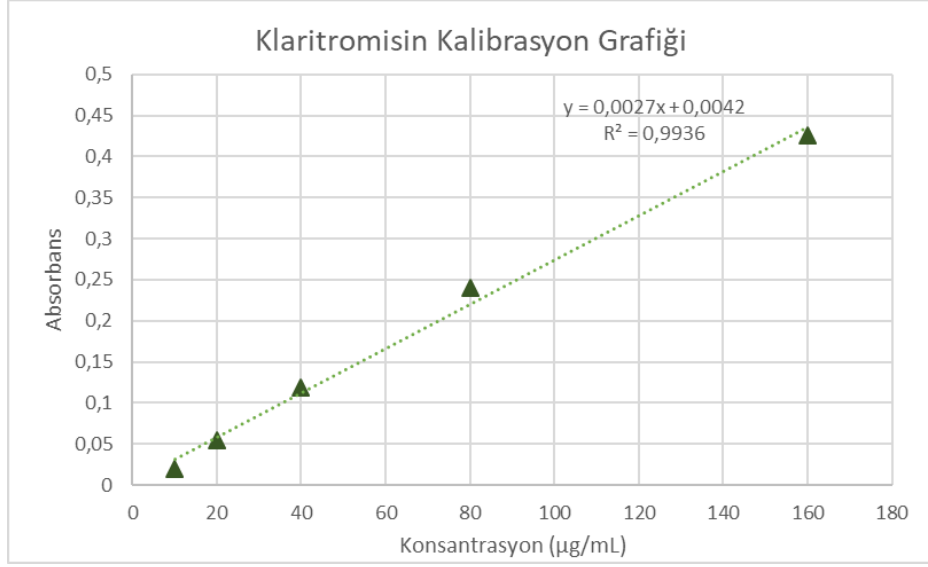
Nanopartikül	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
PCL-CLR	76
PCL-ALP	86,7
PCL-CLR-ALP	CLR: 68 ALP:82

#### 4.4.7 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Salım Profilleri

PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinden klaritromisin ve bitkisel ekstraktın salımını incelemek amacıyla öncelikle klaritromisinin ve *Alpinia officinarum* ekstraktının konsantrasyona karşı absorbans verilerini içeren grafikleri çizilerek kalibrasyon eğrileri oluşturuldu. Eğri denklemlerinden yararlanılarak da 168 saat boyunca farklı zamanlarda alınan örneklerin absorbans değerlerine karşılık salınan etken madde miktarları belirlendi.

#### Klaritromisinin Farklı Konsantrasyonlarının Kalibrasyon Eğrisi

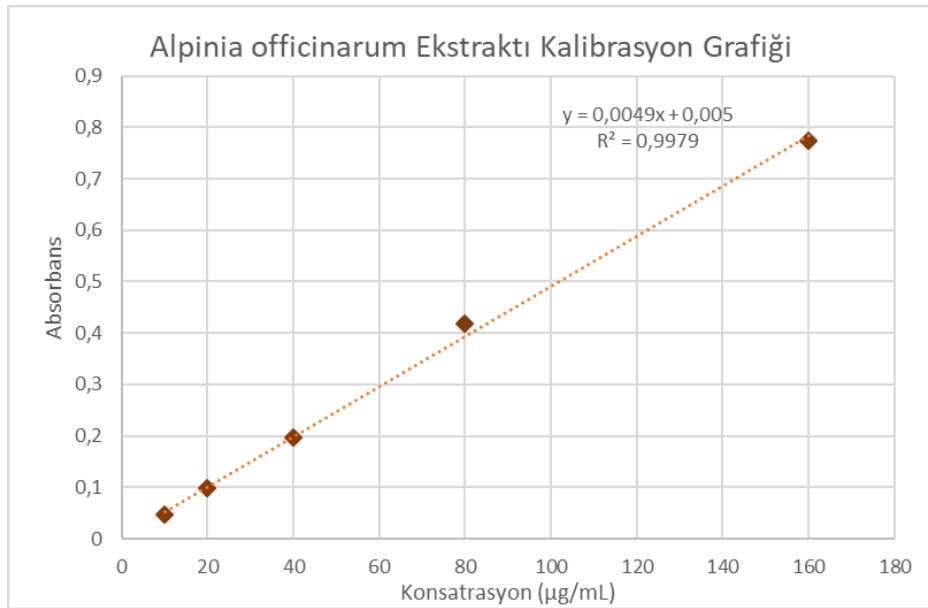
Polikaprolakton nanopartiküllerine kapsüllenen klaritromisin miktarını belirlemek ve nanopartiküllerin salım profillerini oluşturabilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda PBS ile hazırlanan klaritromisinin 210 nm’de UV spektrofotometrede absorbans değerleri okundu. Bu değerlere bağlı olarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve eğri denklemi elde edildi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30 Klaritromisinin kalibrasyon grafiği

### ***Alpinia officinarum* Ekstraktının Farklı Konsantrasyonlarının Kalibrasyon Eğrisi**

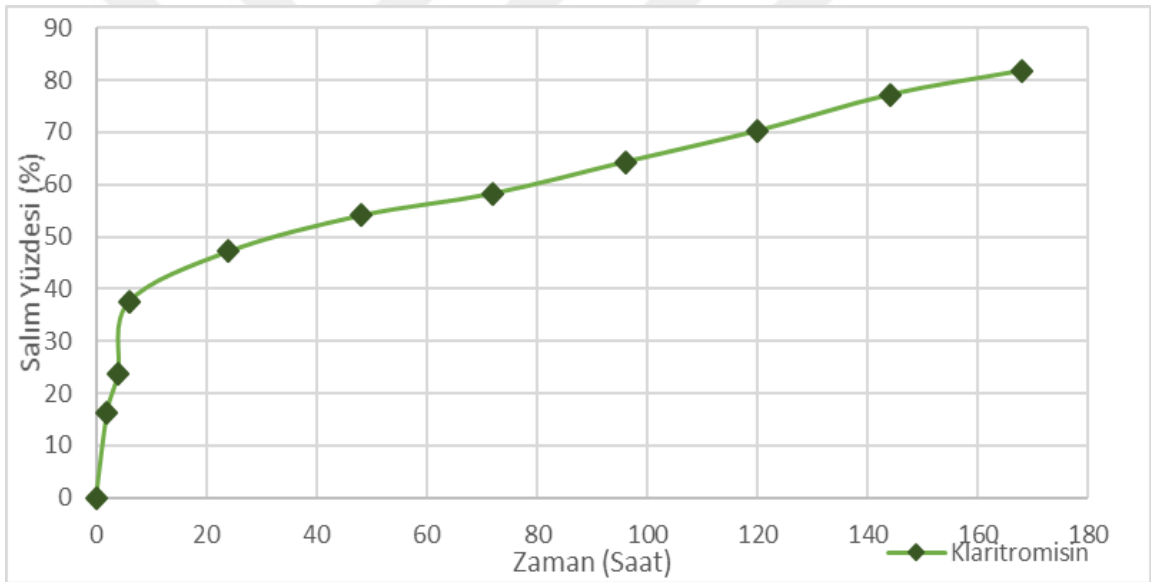
Polikaprolakton nanopartiküllerine enkapsüle edilen *Alpinia officinarum* ekstraktı miktarını belirlemek ve nanopartiküllerin salım profillerini oluşturabilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda PBS ile hazırlanan klaritromisinin 268 nm’de UV spektrofotometrede absorbans değerleri okundu. Bu değerlere bağlı olarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve eğri denklemleri elde edildi (Şekil 4.31).



Şekil 4.31 *Alpinia officinarum* ekstraktının Kalibrasyon eğrisi

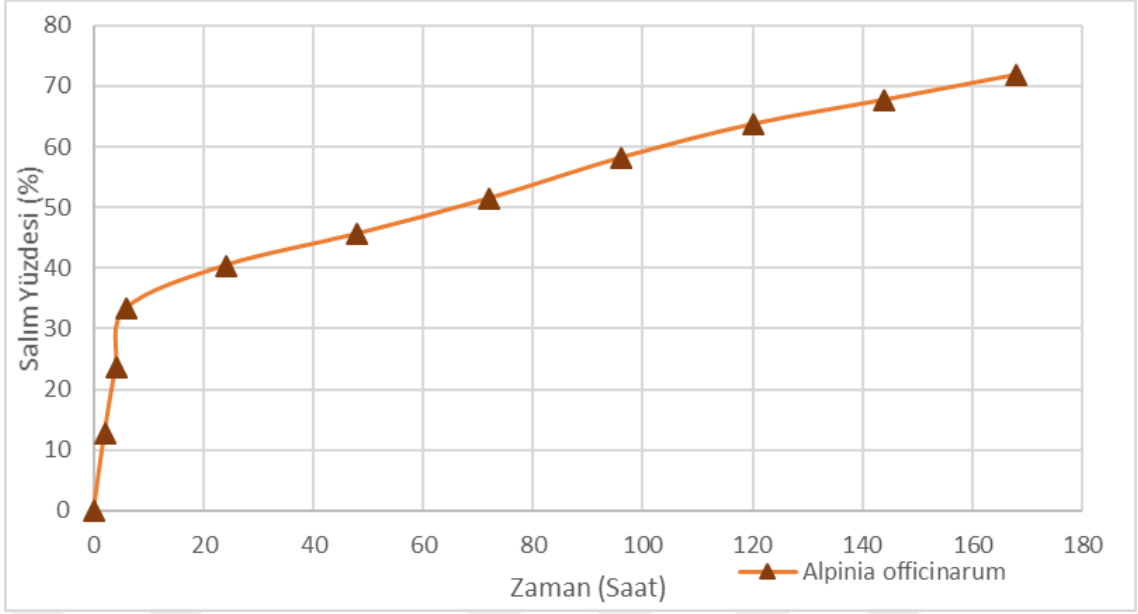
Sentezlenen PCL nanopartiküllerinin in vitro salım çalışmaları PBS tamponu içerisinde pH 7.4'te çalkalamalı inkübatörde (130 rpm) gerçekleştirildi. Farklı formülasyonlar içeren PCL nanopartikülleri 15 mg tartılarak 3 mL PBS içerisinde salıma bırakıldı. Partiküllerin salımı 168 saat boyunca belirli aralıklarla örnek alınarak devam ettirildi. Belirli aralıklarla 1 mL örnek alınarak 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi, süpernatantlar biriktirildi ve UV-Vis spektrofotometre ile ölçüm alınarak partiküllerden salınan klaritromisin ve *Alpinia officinarum*'un kümülatif yüzdeleri kalibrasyon eğri denklemleri ile belirlendi.

Klaritromisin yüklü PCL nanopartiküllerinden klaritromisinin salımı incelendiğinde birinci günün sonunda antibiyotiğin %47,17'sinin salımının gerçekleştiği gözlemlendi. 168. Saatin sonunda ise toplam kapsüle edilen klaritromisinin %81,88'inin salımının gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.32).



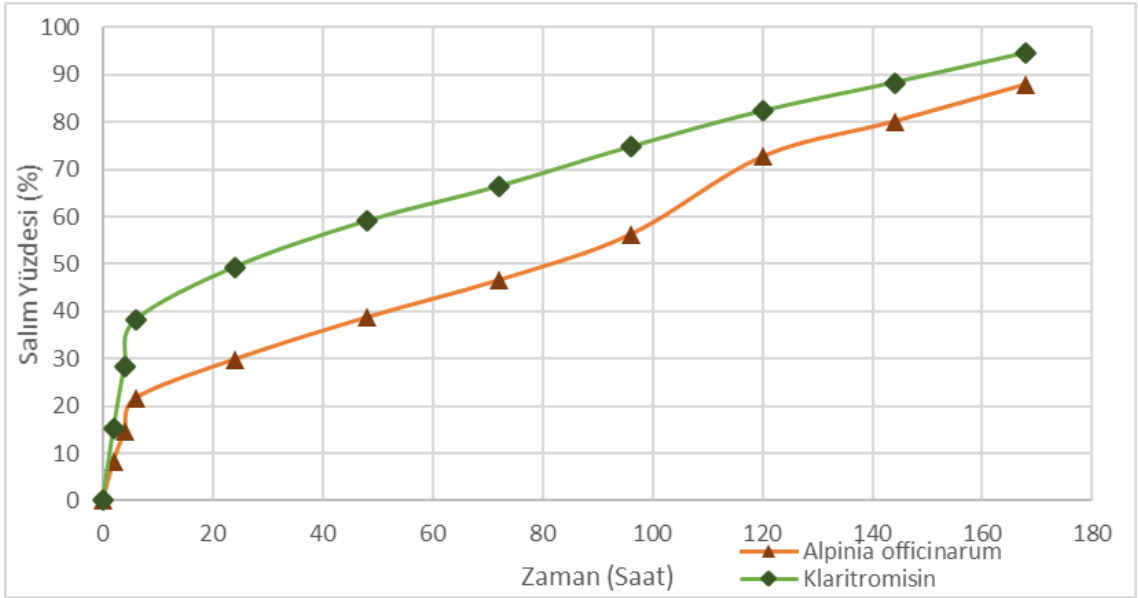
Şekil 4.32 Klaritromisin enkapsüle PCL nanopartiküllerinin salım grafiği

*Alpinia officinarum* ekstraktı yüklü PCL nanopartiküllerinden ekstraktın salımı incelendiğinde birinci günün sonunda bitkisel ekstraktın %33,39'unun salımının gerçekleştiği belirlendi. 168. Saatin sonunda ise toplam kapsüle edilen ekstraktın %71,83'ünün salımının gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.33).



**Şekil 4.33** *Alpinia officinarum* enkapsüle PCL nanopartiküllerinin salım grafiği

*Alpinia officinarum* ekstraktı ve klaritromisin yüklü PCL nanopartiküllerinin in vitro salımı incelendiğinde birinci günün sonunda bitkisel ekstraktın %29,9'unun; antibiyotığın ise %49,37'sinin salımının gerçekleştiği gözlemlendi. 168. Saatin sonunda ise toplam kapsüle edilen bitkisel ekstraktın %88,01'inin; klaritromisinin ise %94,64'ünün salımının gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.34).



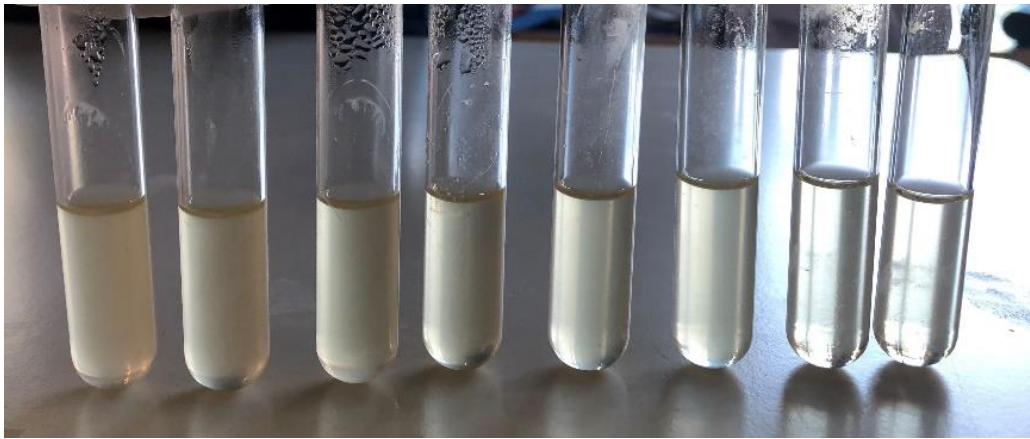
**Şekil 4.34** Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* enkapsüle PCL nanopartiküllerinin salım grafiği

#### 4.5 Klaritromisinin *Alpinia officinarum* Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin *Helicobacter pylori* Üzerinde Antibakteriyel Etkinliklerinin Belirlenmesi

PCL nanopartiküllerinin anti-helicobakteriyel etkinliği incelenmeden önce klaritromisin antibiyotiğinin ve *Alpinia officinarum* bitkisel ekstraktının serbest hallerinin antibakteriyel etkinliği *H. pylori* üzerinde incelendi. Antibiyotiğin ve ekstraktın MİK ve MBK değerlerine bağlı olarak klaritromisin ve/veya bitkisel ekstrakt yüklü PCL nanopartiküllerinin inceleneceği konsantrasyon aralıkları belirlendi.

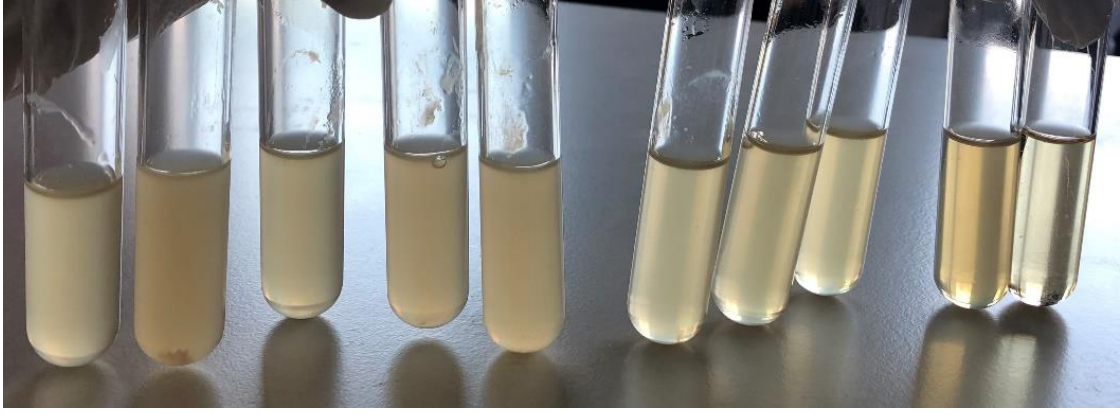
##### 4.5.1 Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* Ekstraktının Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Sıvı Makrodilüsyon Yöntemi ile Analizi

Sıvı makrodilüsyon yöntemi ile klaritromisin antibiyotiğinin 128-2 µg/mL konsantrasyon aralığında anti-helicobakteriyel etkinliğinin incelenmesi sonucu klaritromisinin minimum inhibisyon konsantrasyonu 64 µg/mL olarak belirlendi. (Şekil 4.35)



Şekil 4.35 Klaritromisin ATCC 700824 *Helicobacter pylori* üzerinde makrodilüsyon analizi

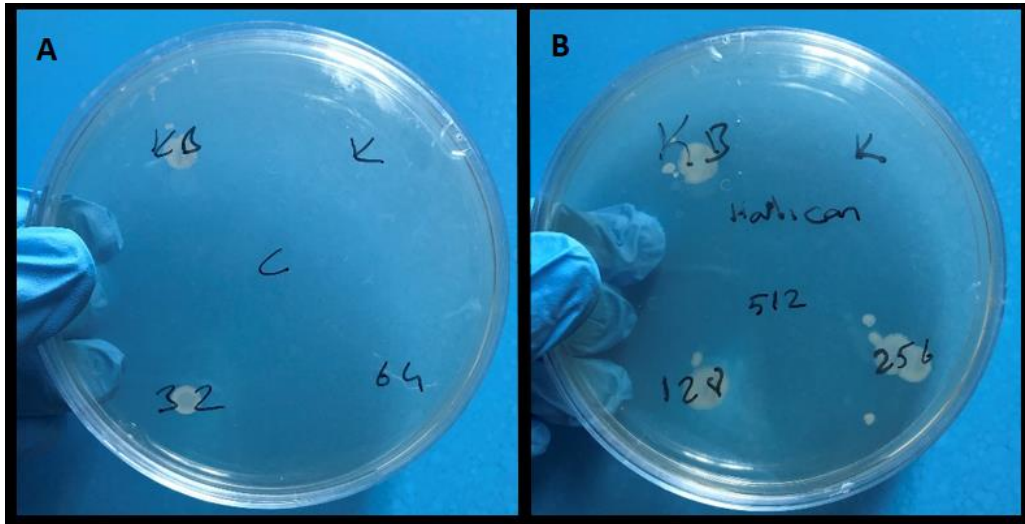
Sıvı makrodilüsyon yöntemi ile *Alpinia officinarum* ekstraktının 512-2 µg/mL konsantrasyon aralığında anti-helicobakteriyel etkinliğinin incelenmesi sonucu ise bitkisel ekstraktın minimum inhibisyon konsantrasyonu 512 µg/mL olarak belirlendi. (Şekil 4.36)



Şekil 4.36 *Alpinia officinarum* ekstraktının ATCC 700824 *Helicobacter pylori* üzerinde makrodilüsyon analizi

#### 4.5.2 Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* Ekstraktının Minimum Bakterisidal Konsantrasyonunun Analizi

Antibiyotik için 32 µg/mL ve 64 µg/mL; ekstrakt için 512 µg/mL, 256 µg/mL ve 128 µg/mL petrilere damlatılması sonucu minimum bakterisidal konsantrasyonu klaritromisin için 64 µg/mL ekstrakt için 512 µg/mL olarak belirlendi. (Şekil 4.37) Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktının MİK ve MBK değerlerine bağlı olarak PCL nanopartiküllerinin 64 µg/mL ile 1024 µg/mL konsantrasyonları arasında antibakteriyel etkilerinin incelenmesine karar verildi.

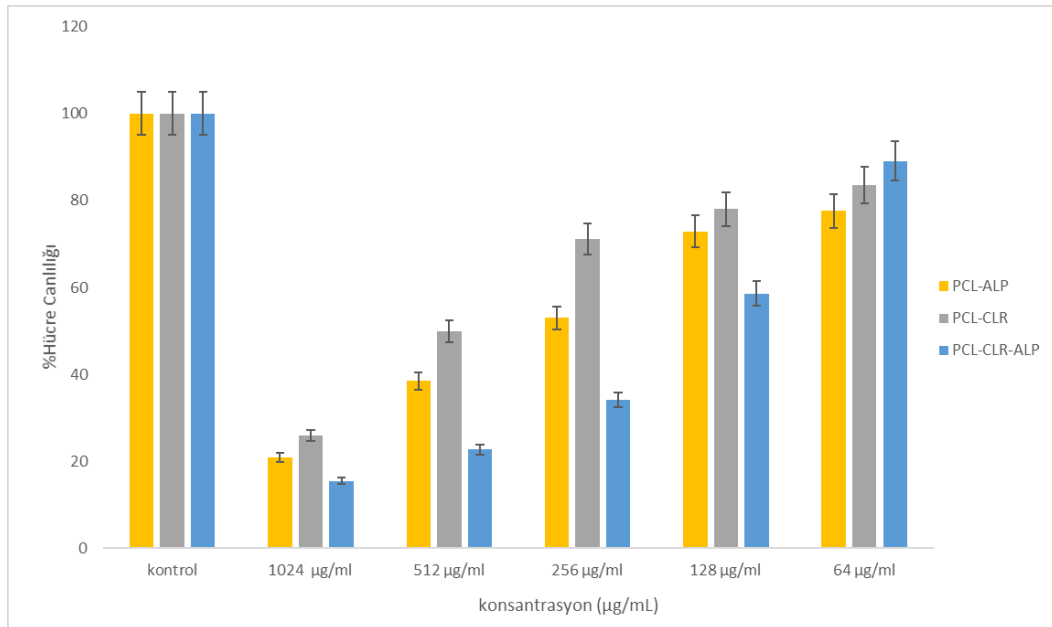


Şekil 4.37 Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktının minimum bakterisidal konsantrasyonunun analizi

### 4.5.3 Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Antimikrobiyal Etkinliklerinin Tayini

#### 4.5.3.1 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Sıvı Makrodilüsyon Yöntemi ile *Helicobacter pylori* Üzerinde Antibakteriyel Etkinliklerinin Analizi

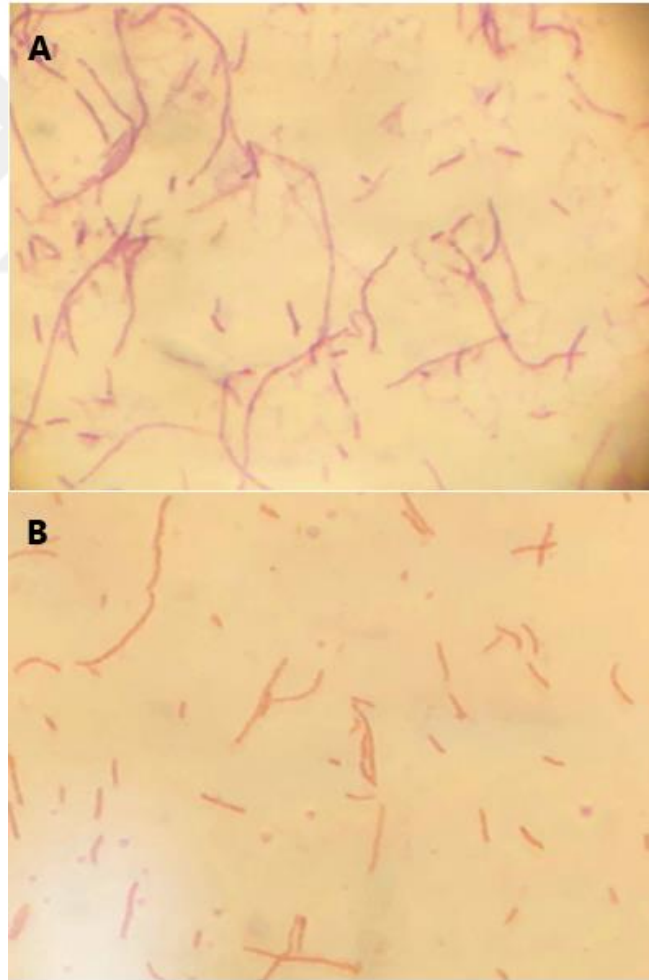
Sıvı makrodilüsyon yöntemi ile klaritromisin'in MİK değeri'nin 64 µg/mL *Alpinia officinarum* ekstraktının MİK değeri'nin ise 512 µg/mL belirlenmesine bağlı olarak PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin antibakteriyel etkinliğinin 64 µg/mL - 1024 µg/mL arasında incelenmesine karar verildi. Sıvı makrodilüsyon yöntemi sonucu elde edilen veriler şekil 4.38'de gösterilmektedir. Etkinliği incelenen tüm nanopartikül konsantrasyonlarının *H. pylori* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği belirlendi. PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin incelenen en düşük konsantrasyon hariç tüm konsantrasyonlarda PCL-CLR ve PCL-ALP nanopartiküllerine kıyasla bakterilerin üremesini daha fazla inhibe ettiği gözlemlendi. PCL-ALP nanopartiküllerinin ise incelenen tüm konsantrasyonlarda PCL-CLR nanopartiküllerine kıyasla daha etkin anti-helicobakteriyel özellik gösterdiği tespit edildi.



Şekil 4.38 PCL-CLR PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin antibakteriyel analizi (sıvı makrodilüsyon yöntemi)

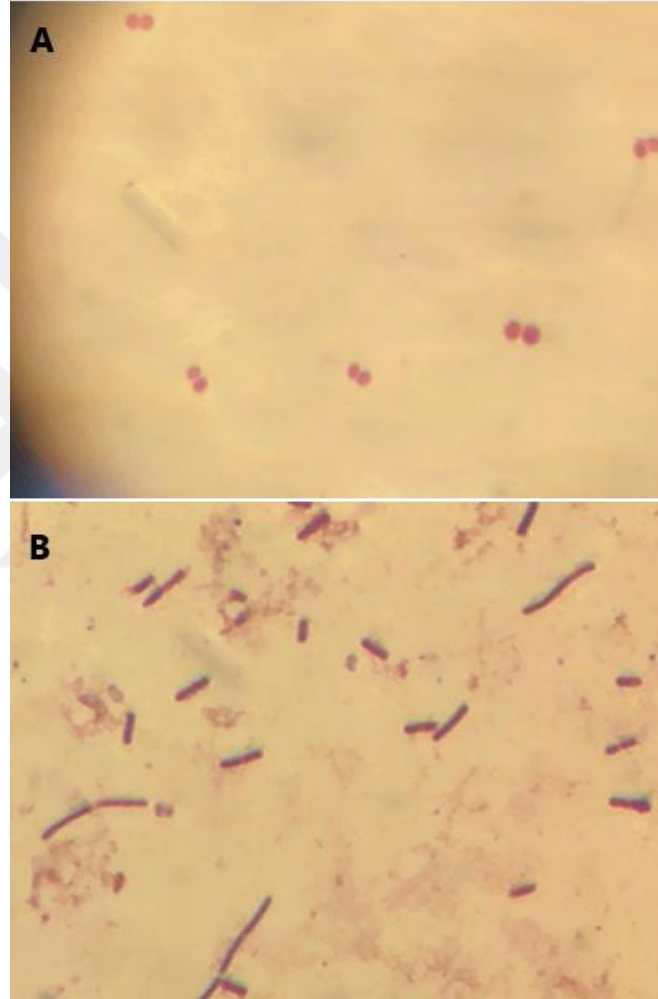
#### 4.5.3.2 Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Sıvı Makrodilüsyon Yöntemi ile *Helicobacter pylori* Üzerinde Antibakteriyel Etkinliklerinin Gram Boyama İle Gösterilmesi

Antibakteriyel etkinliği incelenen klaritromisin ve/veya *Alpinia officinarum* ekstraktı yüklü PCL nanopartiküllerin en yüksek iki konsantrasyonundan ve kontrol tüpünden örnek alınarak gram boyama yapılarak ışık mikroskopunda 100X büyütme altında incelendi. Şekil 4.39'de PCL-CLR nanopartiküllerinin uygulandığı *H. pylori* bakterilerine ait gram boyama sonuçları görülmektedir (A:1024 µg/mL, B:512 µg/mL). Klaritromisin antibiyotiği enkapsüle PCL-CLR nanopartiküllerinin *H. pylori*'nin filament formuna dönüşmesine neden olduğu gözlemlendi. Artan konsantrasyona bağlı olarak filamentleşmenin arttığı ve bakterilerin bir araya toplanarak filament boylarının da uzamasına sebep olduğu belirlendi.



**Şekil 4.39** PCL-CLR nanopartiküllerinin *Helicobacter pylori* üzerinde etkinliği (gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü, A:1024 µg/mL, B:512 µg/mL)

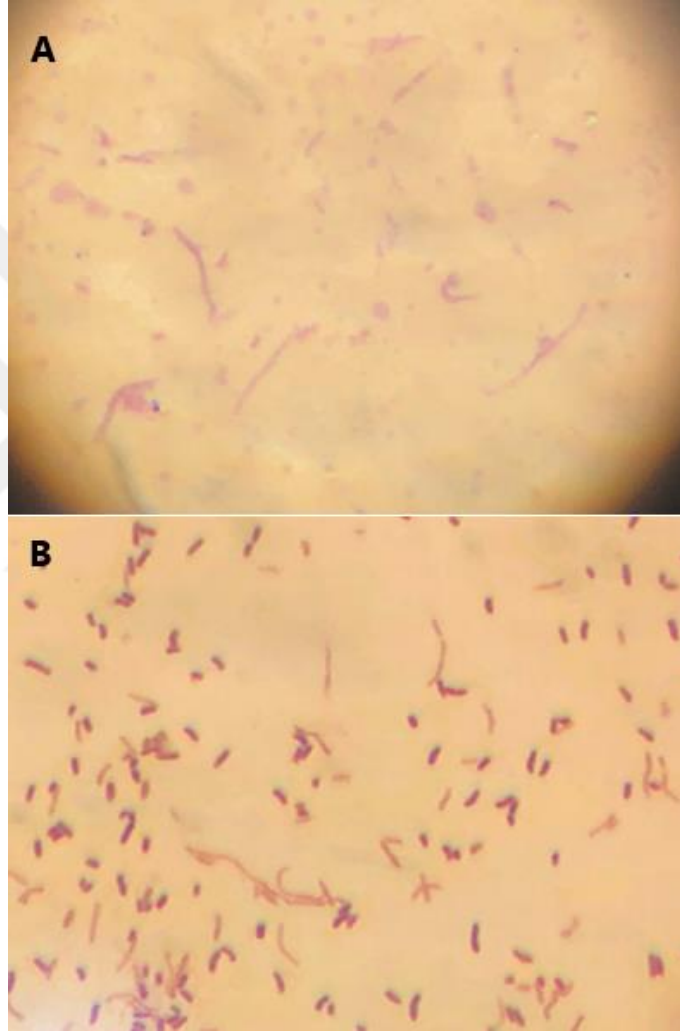
Şekil 4.40'da PCL-ALP nanopartiküllerinin uygulandığı bakterilere ait gram boyama sonuçları görülmektedir (A:1024 µg/mL, B:512 µg/mL). *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL-ALP nanopartiküllerinin 1024 µg/mL konsantrasyonunun *H. pylori* üzerinde oldukça bakterisidal olduğu ancak varlığını sürdüren bakterilerin ise kokoid formuna dönüştüğü belirlendi. UV-Vis spektrofotometre ile de belirlendiği gibi PCL-ALP nanopartiküllerinin artan konsantrasyonuna bağlı olarak bakteri sayısındaki azalma gram boyama sonuçlarında da gözlemlendi.



**Şekil 4.40** PCL-ALP nanopartiküllerinin *Helicobacter pylori* üzerinde etkinliği (gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü, A:1024 µg/mL, B:512 µg/mL)

Şekil 4.41'de PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin uygulandığı bakterilere ait gram boyama sonuçları görülmektedir (A:1024 µg/mL, B:512 µg/mL). *Alpinia officinarum* ekstraktı ve klaritromisin enkapsüle PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin UV-Vis spektrofotometre ile belirlendiği gibi artan konsantrasyona bağlı olarak bakteri

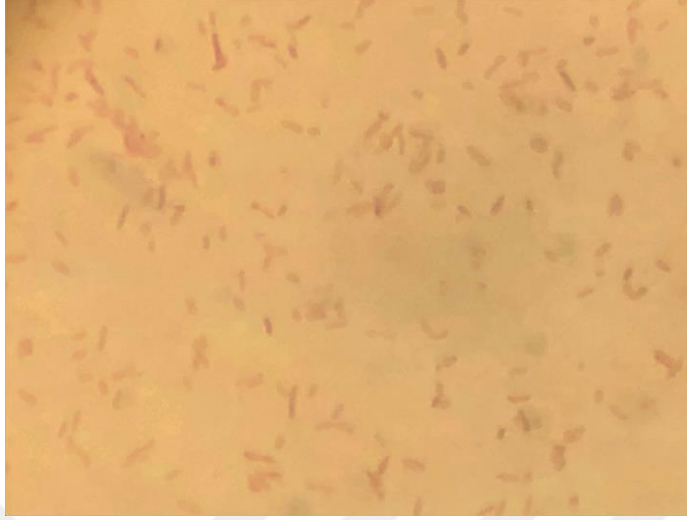
sayısındaki azalma gram boyama ile de doğrulandı. Her iki konsantrasyonda da klaritromisinin sebep olduğu filamentleşme görülmektedir. PCL-CLR nanopartiküllerinde olduğu gibi PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinde de artan konsantrasyona bağlı olarak filamentlerin uzunluğunun arttığı belirlendi. Ayrıca PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin 1024 µg/mL konsantrasyonunda *Alpinia officinarum* ekstraktına bağlı olarak kokoid oluşumu ve klaritromisine bağlı olarak da filamentleşme gözlemlendi.



**Şekil 4.41** PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin *Helicobacter pylori* üzerinde etkinliği (gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü, A:1024 µg/mL, B:512 µg/mL)

Şekil 4.42’de ise hiçbir nanopartiküler formülasyon uygulanmamış sadece bakteri ekimi yapılmış ve nanoformülasyonlar ile aynı süre boyunca ve aynı şartlar altında inkübe edilmiş kontrol grubundan alınan bakteri örneklerinin gram boyama görüntüleri verilmiştir. Spiral *H. pylori* formunda görülen bakteriler nanopartikül

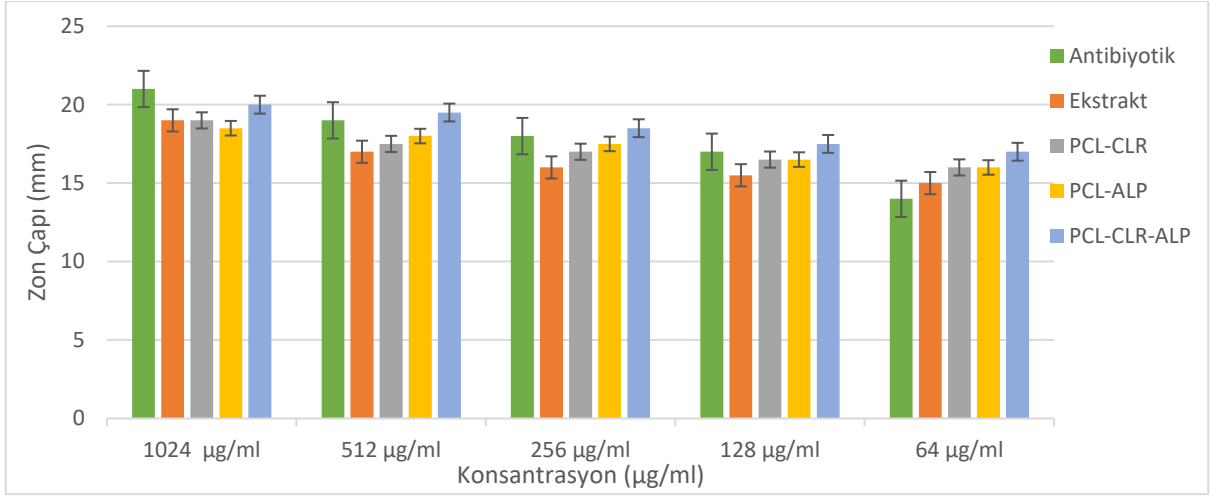
içeren formülasyonlardan alınan bakteri örneklerinde görülen filamentleşme ve kokoid oluşumunun ortam şartlarından kaynaklanmadığını göstermektedir.



Şekil 4.42 *H. pylori* kontrol grubunun gram boyama ışık mikroskobu görüntüsü

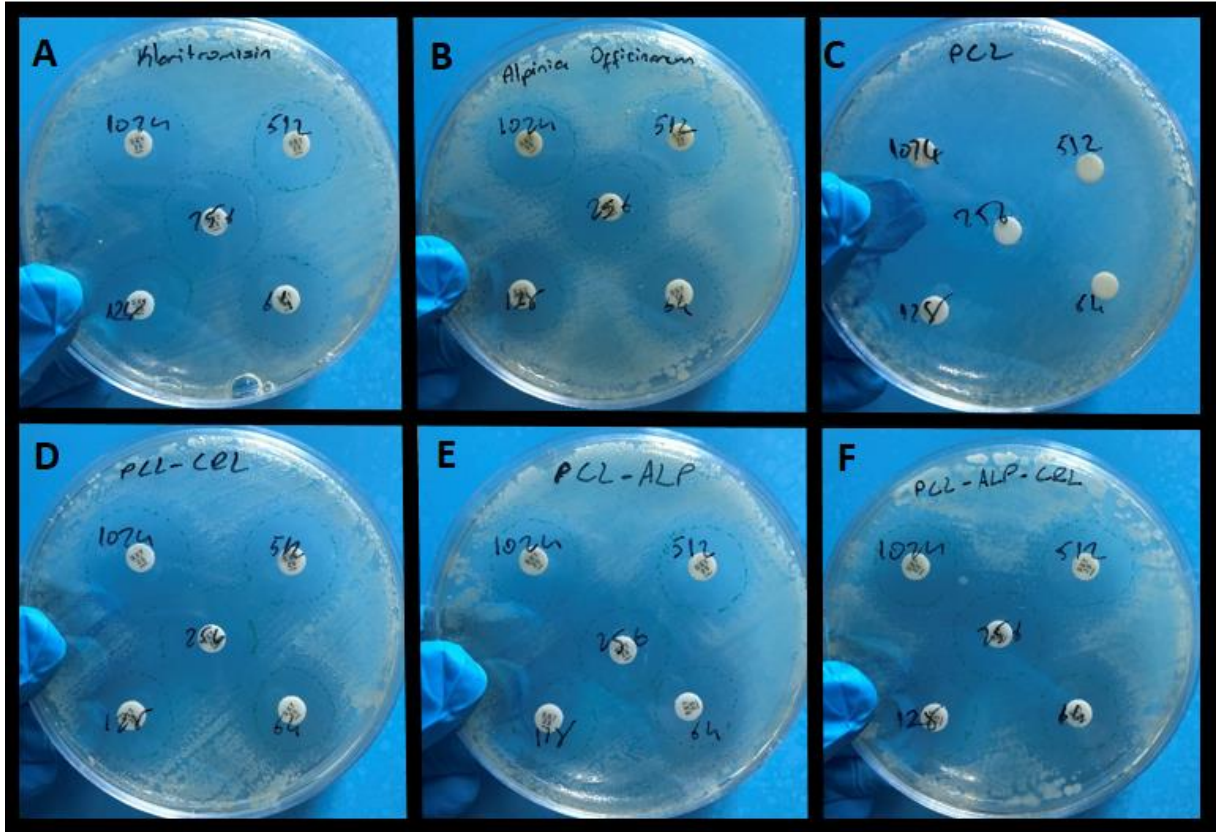
#### **4.5.3.3 Klaritromisinin *Alpinia officinarumun* ve Polikaprolakton Nanopartiküllerinin Disk Difüzyon Yöntemi ile *Helicobacter pylori* Üzerinde Antibakteriyel Etkinliklerinin Analizi**

Klaritromisin, *Alpinia officinarum* ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin antibakteriyel etkinliği 64 µg/mL-1024 µg/mL arasında disk difüzyon yöntemi ile de incelendi. İncelenen her bir örnek için tüm konsantrasyonlarda boş PCL nanopartikülleri hariç inhibisyon zonu oluşumu tespit edildi. İnhibisyon zon çapları Şekil 4.43'te karşılaştırmalı olarak verilmiştir. 48 saat inkübasyonun ardından Boş PCL nanopartiküllerinin inhibisyon zonu oluşturmayıp PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinde zon çaplarının varlığının tespit edilmesi nanopartiküllerden etken maddelerin salımının gerçekleştiğini göstermektedir.



**Şekil 4.43** Klaritromisin *Alpinia officinarum* ekstraktı, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin antibakteriyel etkinliği (Disk difüzyon yöntemi)

PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin PCL-CLR ve PCL-ALP nanopartiküllerine kıyasla daha büyük zon çapı oluşturduğu saptandı (Şekil 4.44).



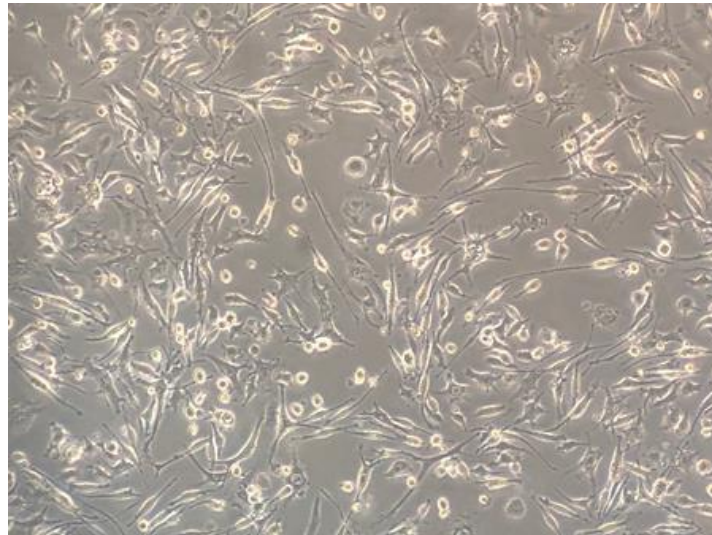
**Şekil 4.44** Klaritromisin *Alpinia officinarum* ekstraktı, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin oluşturduğu inhibisyon zonları

## 4.6 Klaritromisin *Alpinia officinarum* Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin J774 ve AGS Hücre hatlarında Sitotoksosite Analizleri

Antibakteriyel etkinlikleri *H. pylori* üzerinde incelenen klaritromisin, *Alpinia officinarum* ekstraktı, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-ALP-CLR nanopartiküllerinin sitotoksosite analizleri; vücuttaki sağlıklı hücrelerle nanopartiküllerin etkileşimi incelemek amacıyla j774 normal fare makrofaj hücre hattı ve *H. pylori* enfeksiyonunun da neden olduğu bilinen mide kanseriyle etkileşimini incelemek için ise ATCC CRL-1739 AGS insan mide kanseri hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi.

### 4.6.1 J774 Hücre Hattının Kültürü ve Morfolojik Değerlendirilmesi

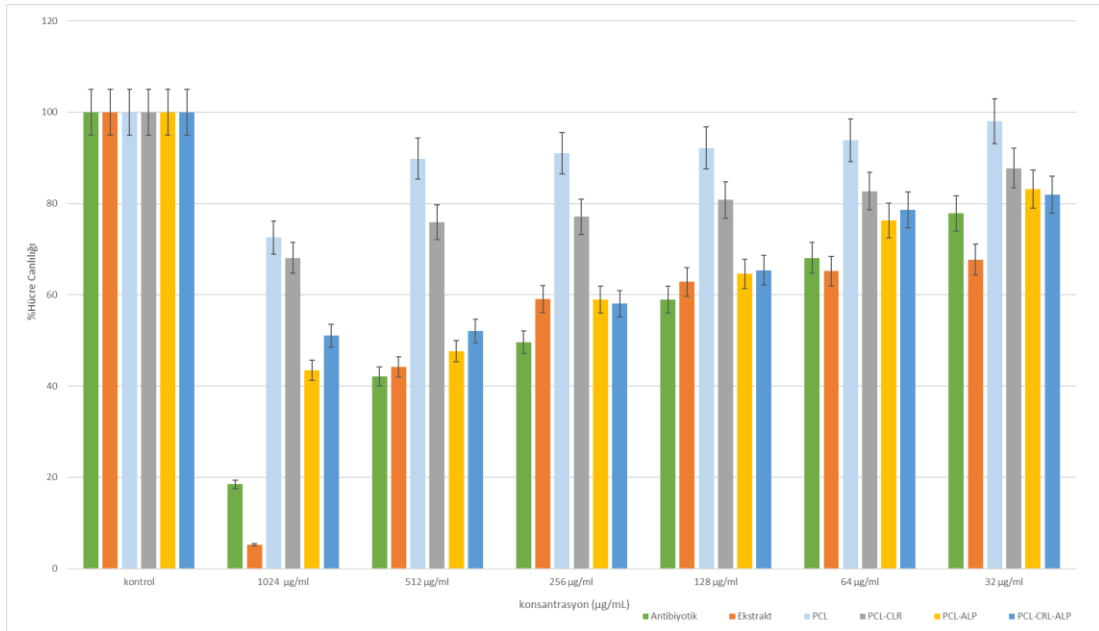
Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Doku Mühendisliği ve Hücre Kültürü laboratuvarında bulunan kriyobanktan çıkarılan J774 hücrelerinin kültürü %10 FBS içeren RPMI besiyerinde gerçekleştirildi. Her 24 saatte bir hücrelerin morfolojisi ve proliferasyonu invert mikroskopta incelendi. Kültür flaskında adheran olarak gelişen hücrelerin kültürünün 7 gününden sonra flaskın tabanına homojen yayılma gösterdiği parlak, canlı olduğu ve normal proliferasyonunun gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.45).



Şekil 4.45 J774 Hücre Kültürünün 7. Gün Morfolojik Görüntüsü (10X)

#### 4.6.2 Klaritromisinin *Alpinia officinarum* Ekstraktının ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin J774 Hücre Hattında Toksisitelerinin Belirlenmesi

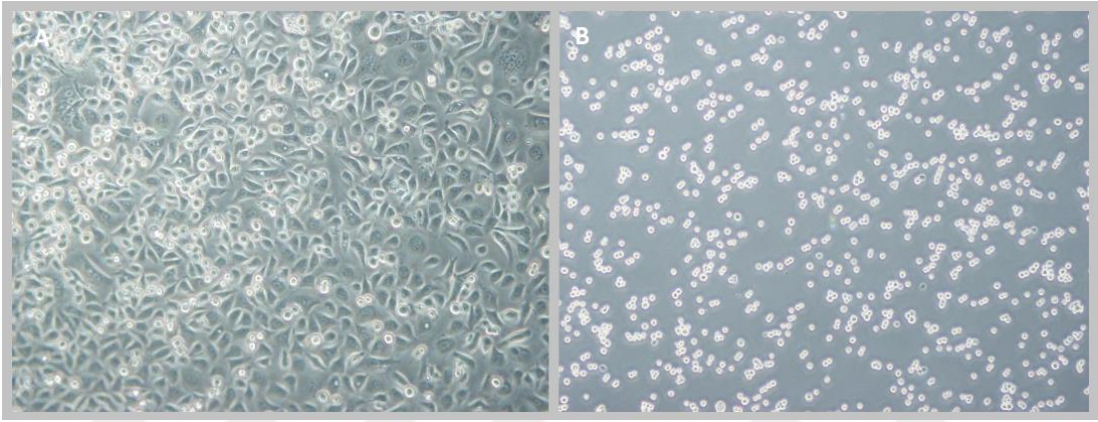
Klaritromisin, *Alpinia officinarum* ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin 32 µg/mL - 1024 µg/mL arasında J774 makrofaj hücre hattında 48 saat inkübasyon süresinin sonundaki sitotoksik etkileri incelendi. Şekil 4.46'da incelenen formülasyonların farklı konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri karşılaştırmalı olarak verilmiştir. İncelenen tüm konsantrasyonlarda artan konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkinin arttığı, klaritromisin ve ekstraktın serbest hallerinin PCL nanopartiküllerine kapsüle hallerine kıyasla daha düşük canlılık oranlarına sahip olduğu belirlendi. Buna bağlı olarak; klaritromisin, *Alpinia officinarum* ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 383,18; 347,13; >1024; >1024; 679,86 ve >1024 µg/mL olarak belirlendi. Klaritromisin ve/veya *Alpinia officinarum* ekstraktı kapsüle PCL nanopartikülleri ve kapsüle edilmeyen serbest halleri kıyaslandığında IC<sub>50</sub> değerleri arasında yaklaşık ≥2-2,5 kat artış olduğu tespit edildi. Bu durum antibiyotik ve bitki ekstraktının PCL nanopartiküllerine kapsüllemesinin sitotoksik etkilerini azalttığını göstermektedir.



**Şekil 4.46** Klaritromisin, *Alpinia officinarum* ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin 48 saat inkübasyon sonunda J774 makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

#### 4.6.3 AGS Hücre Hattının Kültürü ve Morfolojik Değerlendirilmesi

Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Doku Mühendisliği ve Hücre Kültürü laboratuvarında bulunan kriyobanktan çıkarılan AGS ATCC CRL-1739 hücrelerinin kültürü %10 FBS içeren DMEM F12 besiyerinde gerçekleştirildi. Her 24 saatte bir hücrelerin morfolojisi ve proliferasyonu invert mikroskopta incelendi. Kültürün 4. gününde hücrelerin kültür flaskının tabanında homojen yayılma göstererek proliferasyon olduğu invert mikroskopta gözlemlendi. Şekil 4.47A'da da görüldüğü gibi hücreler canlı ve parlak görünüme sahipti. Şekil 4.47B ise kültürün tripsin ile kaldırılmasından sonra invert mikroskopta (10X büyütme) görüntüsüdür.



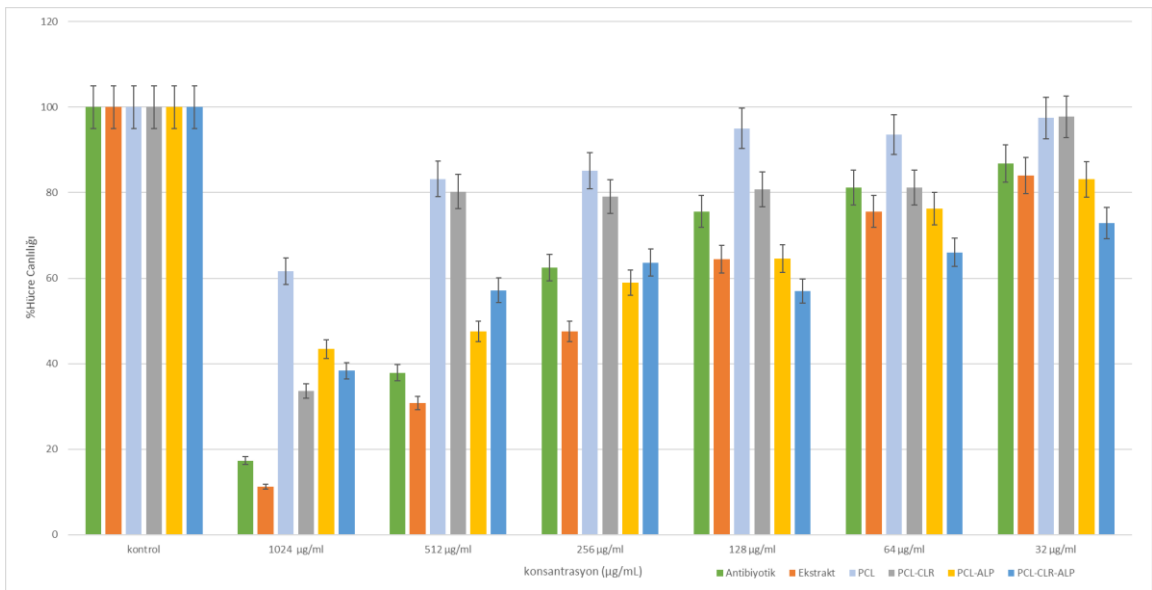
Şekil 4.47 AGS Hücre Kültürünün Mikroskop Görüntüleri (10X Büyütme)

#### 4.6.4 Klaritromisin *Alpinia officinarum* Ekstraktı ve Farklı Formülasyonları İçeren Polikaprolakton Nanopartiküllerinin AGS Hücre Hattı Üzerinde Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Klaritromisinin, *Alpinia officinarum* ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin 32 µg/mL - 1024 µg/mL konsantrasyonları arasında mide kanseri hücre hattında (AGS) 48 saat inkübasyon süresinin sonundaki hücre canlılığı incelendi.

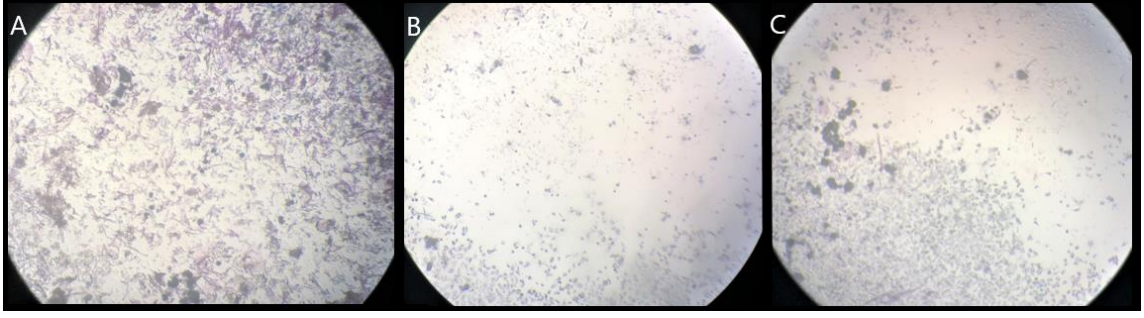
Şekil 4.48'de incelenen formülasyonların farklı konsantrasyonlarının mide kanser hücrelerinin canlılığına etkileri yüzde olarak karşılaştırmalı verilmiştir. Buna bağlı olarak; klaritromisinin, *Alpinia officinarum* ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 482,01; 368,68; >1024; 822,42; 679,86 ve 656,92 µg/mL olarak belirlendi. İncelenen tüm konsantrasyonlarda artan konsantrasyona bağlı olarak canlılığının azaldığı tespit

edildi. Antibiyotik ve bitki ekstraktının PCL nanopartiküllerine kapsüllenmesinin sitotoksik etkilerini azalttığını AGS hücre hattında da görüldü. MTT analizi sonucunda *Alpinia officinarum* ekstraktının 64 µg/mL'den itibaren artan konsantrasyonlarında, hücre canlılığının %80'nin altında olduğu belirlendi. İncelenen en yüksek konsantrasyon olan 1024 µg/mL'de ise AGS hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde etkilediği ve %11,2 canlılık görüldüğü tespit edildi. Klaritromisin ve/veya *Alpinia officinarum* ekstraktı kapsüllenmiş PCL nanopartikülleri karşılaştırıldığında ise hücrelerin çoğalmasını en fazla ekstrakt kapsüle PCL nanopartiküllerinin engellediği sonucuna varıldı.



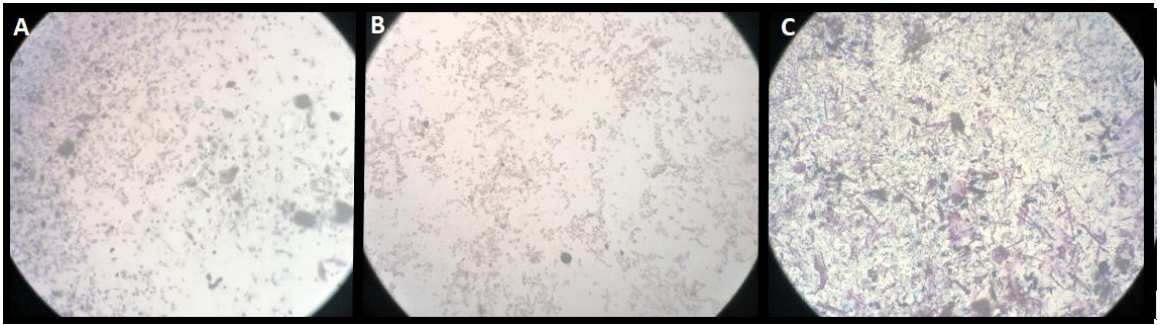
**Şekil 4.48** Klaritromisin, *Alpinia officinarum* ekstraktı, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin 48 saat inkübasyon sonunda AGS hücrelerinin canlılığına etkisi

Şekil 4.49'da PCL-CLR (A), PCL-ALP (B) ve PCL-CLR-ALP (C) nanopartiküllerinin AGS hücreleri ile 48 saat inkübasyonun ve 4 saat Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide tuzu ile muamele edilmesinin ardından 1024 µg/mL konsantrasyonlarında oluşan formazan kristallerinin mikroskop görüntüsü verilmiştir. Nanopartikül formülasyonları kıyaslandığında en fazla formazan kristal oluşumu PCL-ALP nanopartiküllerinde daha sonra sırasıyla PCL-CLR-ALP ve PCL-CLR nanopartiküllerinde görüldü. Formazan kristal oluşumu hücre canlılığıyla ilişkili olduğundan mikroskop görüntüleri yüzde canlılık verileriyle de örtüşmektedir.



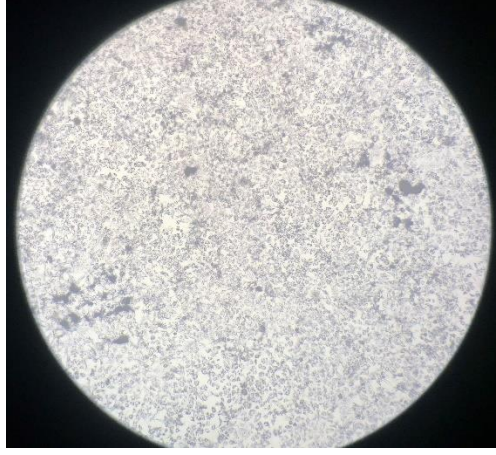
**Şekil 4.49** PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin 1024 µg/mL konsantrasyonlarında oluşan formazan kristallerinin mikroskop görüntüsü (40x)

Şekil 4.50'da Klaritromisin (A), *Alpinia officinarum* ekstraktının (B) ve PCL (C) nanopartiküllerinin AGS hücreleri ile 48 saat inkübasyonun ve 4 saat Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide tuzu ile muamele edilmesinin ardından 1024 µg/mL konsantrasyonlarında oluşan formazan kristallerinin mikroskop görüntüsü verilmiştir. Antibiyotik ve/veya ekstrakt içermeyen boş PCL nanopartiküllerinde görülen formazan kristal oluşumu PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerine kıyasla oldukça fazlaydı. Bu durum klaritromisin ve ekstraktın PCL nanopartiküllerinden salımının gerçekleştiğini, hücre çoğalmasını PCL nanopartiküllerinin engellemediğini ve salımı gerçekleşen etken maddelerin hücre canlılığını azalttığını göstermektedir.



**Şekil 4.50** Klaritromisin, *Alpinia officinarum* ekstraktının ve PCL nanopartiküllerinin 1024 µg/mL Konsantrasyonlarında Oluşan Formazan Kristallerinin Mikroskop Görüntüsü (40x)

Şekil 4.51'de ise hiçbir formülasyon ile muamele edilmeden 48 saat boyunca inkübe edilen ve 4 saat Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide tuzu ile muamele edilen AGS hücrelerinde oluşan formazan kristallerinin mikroskop görüntüsü verilmiştir.



**Şekil 4.51** Kontrol grubunun formazan kristallerinin mikroskop görüntüsü (40x)



*Helicobacter pylori*'nin en büyük rezervuarı insan olmakla birlikte Dünya nüfusunun yaklaşık yarısında enfeksiyon gelişimine neden olmaktadır [70]. *H. pylori*'nin görülme sıklığı, coğrafi bölge, yaş, ırk, etnik köken ile ilişkilidir. Sosyo-ekonomik koşullara bağlı olarak enfeksiyon genellikle çocukluk çağında ortaya çıkmakta, gelişmemiş ülkelerde ve gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere kıyasla daha sık görülmektedir [66]. *H. pylori*, duodenal veya gastrik ülserler, mukozal atrofi, gastrik karsinom ve gastrik lenfoma gibi gastroduodenal hastalıklara sebep olmaktadır. Bunun yanı sıra bugüne kadar yapılan çalışmalarda, *Helicobacter pylori*'nin; nörolojik, dermatolojik, hematolojik, oküler, kardiyovasküler, metabolik ve alerjik gibi birçok sindirim sistemi dışı hastalıkların patojenik mekanizmalarında potansiyel bir rol oynadığı da gösterilmiştir [4]. Bu nedenle *H. pylori*'nin midede çoğalıp kolonize olmasının engellenmesi, yani inhibisyonunun sağlanması bakteri ile direkt veya dolaylı olarak ilişkili hastalıkların tedavisinde oldukça önemlidir. *H. pylori*'nin mevcut tedavisi amoksisilin, klaritromisin, metronidazol ve levofloksasin gibi antimikrobiyal ajanların ve proton pompası inhibitörleri gibi antisekretuar ajanların kombinasyonuna dayanmaktadır. Ancak özellikle artan antibiyotik dirençliliği gibi nedenler *Helicobacter pylori*'nin ortadan kaldırılmasını oldukça zorlaştırmaktadır [160]. Bu nedenle, bu tez çalışmasında da olduğu gibi günümüzde araştırmacılar antibiyotik dirençliliğini azaltacak veya ortadan kaldıracak alternatif tedavi yaklaşımları üzerine çalışmalar gerçekleştirmektedir. Nanopartiküller de alternatif tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde yararlanılan araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır. F. Lotfipour ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, klaritromisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin, serbest halde uygulanmış klaritromisin antibiyotiğine kıyasla hasta biyopsi örneklerinden izole edilen *H. pylori* suşları için daha düşük MİK değerleri gösterdiği bildirilmiştir [20]. Bu durum *H. pylori* eradikasyonunda gerekli olan klaritromisin miktarının PLGA nanopartiküllerine enkapsülasyonu ile azaldığını göstermekle birlikte, antibiyotik

dirençliliğiyle mücadele açısından değerlendirildiğinde umut vadetmektedir. Nanopartiküllerin biyoyumluluk, biyobozunurluk, toksik özellik göstermeme ve non-immünojenik olma gibi insan vücuduna uygulamada önemli kolaylıklar sağlayan avantajları da bulunmaktadır. Ayrıca, enfeksiyonun bulunduğu bölgeye hedeflendirilebilmeleri tedavideki yan etkilerin azalmasına katkıda bulunmaktadır [194]. Polikaprolakton polimeri de mikroorganizmaların lipazları ve esterazları tarafından kolaylıkla parçalanabilmesi, çeşitli ilaçlara karşı yüksek geçirgenliği, mükemmel biyoyumluluğu sayesinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır [208]. Nanopartiküllere farmasötik ilaçların yanı sıra bitkisel ekstrakt, yağ ve bitki sekonder metabolitleri de kapsüle edilebilmektedir. Chiung-Hung Chang ve ark. berberin ekstraktı yüklü kitosan nanopartikülleri sentezleyerek simule edilmiş bir gastrointestinal ortamda, nanopartiküllerin *H. pylori* enfeksiyon bölgesindeki hücreler arası boşluklar ile etkileşime girdiğini ve etkili berberin salımı gerçekleştirerek *H. pylori*'nin çoğalmasını inhibe edici etki gösterdiğini bildirmişlerdir [211]. Berberin gibi birçok bitkisel bileşenin *H. pylori* üremesini ve midede kolonizasyonunu engelleyici etki gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Zencefilgiller familyasından olan *Alpinia officinarum* bitkisinin de yapılan bilimsel araştırmalarda anti-enflamatuar, antioksidan, anti-emetik, antibakteriyel ve antikanserojen özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir [24]. *Alpinia officinarum*'un ana karakteristik bileşenlerini diarilheptanoidler oluşturmaktadır. Haeng-Byung Lee ve ark. *A. officinarum*'dan diarilheptanoid 5-hidroksi-7-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1-fenil-3-heptanon izolasyonunu gerçekleştirerek anti *H. pylori* aktivitesini incelemiştir. Diarilheptanoidin *H. pylori* ATCC 43504, ATCC 700392 ve ATCC 700824'e karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu sırasıyla 48, 24 ve 24 µg/mL olarak belirlenmiştir [25]. Ancak çalışmamıza kadar literatürde *Alpinia officinarum* ekstraktının anti-helicobakteriyel etkinliğinin incelendiği bir çalışmaya rastlamadık. Aynı zamanda *Alpinia officinarum*un polikaprolakton nanopartikülleri içerisine tek başına ya da herhangi bir antibiyotik ile enkapsülasyonunu içeren de herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildi. Buna göre de bu tez çalışmasının amacını; *H. pylori*'nin birinci basamak tedavisinde kullanılan antibiyotiklerden biri olan klaritromisine karşı gelişen antibiyotik dirençliliğini azaltmak ve antibiyotiğin

tedavideki etkinliğini arttırmak için daha önce antibakteriyel etkinliği belirlenmiş *Alpinia officinarum* ekstraktı ile klaritromisin tek başına ve kombinasyon halinde polikaprolakton nanopartiküllerine enkapsülasyonu gerçekleştirilerek karakterize edilmesi, antibakteriyel etkinliklerinin ATCC 700824 ticari *H. pylori* suşu üzerinde ve sitotoksik etkinliklerinin ise J774 makrofaj, ATCC CRL-1739 AGS mide kanser hücre hatlarında in vitro olarak incelenmesi oluşturmaktadır.

Tezin amaç ve hedefine ulaşmak için gerçekleştirilen çalışmalar aşağıda verilmiştir.

- I. *Alpinia officinarum* metanolik ekstraktının elde edilmesi ve karakterizasyonu,
- II. *Alpinia officinarum* ekstraktı ve klaritromisin antibiyotiklerinin PCL nanopartiküllerine enkapsülasyonunun gerçekleştirilmesi,
- III. Polimerik nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyel, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskopu analizlerinin gerçekleştirilerek karakterize edilmesi,
- IV. Karakterize edilmiş yüklü polimerik nanopartiküllerin *H. pylori* üzerinde disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile antibakteriyel etkinliğinin incelenmesi,
- V. Karakterize edilmiş yüklü polimerik nanopartiküllerin j774 makrofaj ve AGS mide kanser hücre hatlarında MTT yöntemi ile IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi.

*Alpinia officinarum* rizomlarından izole edilen metanolik ekstraktın 1 gramındaki gallik asit eşdeğeri [mg GAE (Gallik Asit Eşdeğeri) / g *Alpinia officinarum* ekstraktı] fenolik madde miktarı 102,75 mg olarak hesaplandı. Jinsong Zhang ve ark. yaptığı çalışmada ise metanolik *Alpinia officinarum* ekstraktının gallik asit eşdeğeri fenolik madde miktarı  $98,64 \pm 1,35$  mg GAE/g olarak belirlenmiştir [212]. Buna bağlı olarak tez çalışmamızda elde ettiğimiz ekstraktın fenolik madde miktarı literatürdeki verilerle benzerlik göstermektedir. Ayrıca *Alpinia officinarum* ekstraktının UV spektrumu alındığında literatürle benzer şekilde 268 nm ve 280 nm'de fenolik madde varlığını gösteren ve 358 nm'de flavonoidlerin varlığını gösteren absorpsiyon pikleri görüldü [213].

Karakterizasyonu gerçekleştirilen *Alpinia officinarum* ekstraktı ve klaritromisin tek başına veya birlikte kombinasyon halinde PCL nanopartiküllerinin içerisine çözücü buharlaştırma yöntemi ile enkapsüle edildi. Enkapsüle edilen polimerik nanopartiküllerin UV-Vis spektrofotometre, SEM, FTIR, Zeta-sizer kullanılarak karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Nanopartiküllerin boyutu, hücreler ve bakteriler ile etkileşime girebilmesi için oldukça önemlidir. Mukoza, oral yoldan gönderilen nanopartiküllerin taşınmasında bir bariyer görevi gören yarı geçirgen bir zardır. Partiküllerin mukus jeli içinden difüzyonu, müsün lifleri arasındaki ağ aralığı boyutu ve parçacıkların müsün liflerine yapışması nedeniyle engellenebilir [214]. *H. pylori*'nin mukozal tabakada kolonize olması sebebiyle etkili bir tedavi için ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistemlerin mukozal bariyeri aşabilmesi gerekmektedir. Etkili membran geçirgenliği için uygun partikül boyutunun 500 nm çapından küçük olması gerekmektedir. Bununla birlikte, 200 nm civarındaki nanopartiküller 500 nm boyutlu nanopartiküllere kıyasla mukozal membranlara daha fazla nüfuz etme potansiyeline sahiptir. 500 nm'den daha büyük boyuta sahip partiküllerin mukus döngüsü yoluyla elimine edilmesi beklenmektedir. Mukus ağ aralıklarından daha küçük çapa sahip nanopartiküller, mukus katmanlarına hızla nüfuz ederek ilaç moleküllerinin daha uzun süre tutulmasını ve salım gerçekleştirmesini sağlamaktadır [215]. Sentezlediğimiz Boş PCL, klaritromisin enkapsüle PCL, *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL, klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL nanopartikülerinin boyutları sırasıyla ortalama 208,5 nm; 216,5 nm; 213,7 nm ve 213,9 nm olarak ölçüldü ve mukozal bariyerlerden geçebilecek boyutlara sahip oldukları tespit edildi. Boş PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartikülerinin çoklu dağılım indisi değerlerinin ortalamaları ise sırasıyla 0,076; 0,114; 0,066 ve 0,034 olarak saptandı. Çoklu dağılım indekslerinin yaklaşık 0,1 ve daha küçük olması nanopartiküllerin boyutlarının birbirine yakın ve monodispers dağılıma sahip olduğunu göstermektedir. Nanopartiküllerin homojen dağılımı ve boyutları SEM görüntüleri ile de doğrulandı.

Sentezlenen nanopartiküllerin zeta potansiyelleri boş PCL nanopartikülleri için -24,9 mV; klaritromisin enkapsüle PCL nanopartikülleri için -16,6 mV; *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL nanopartikülleri için -18,8 mV ve klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL nanopartikülleri için -15,6 mV olarak belirlendi. Negatif zeta potansiyel değerleri polikaprolaktonun negatif yüklü olmasından kaynaklanmaktadır. Literatürde -15 ila -30 mV aralığındaki zeta potansiyel değerlerinin stabilize nanopartiküller için ideal olduğu bildirilmiştir [210].

Boş PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartikülleri, klaritromisin antibiyotiği ve *Alpinia officinarum* ekstraktı için 4000 – 1200  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyları arasında FT-IR analizi gerçekleştirildi. Yapılan FT-IR analizi sonucunda klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktının PCL nanopartikülleri içerisine enkapsülasyonunun gerçekleştiği ve yüzey adsorbsiyonuna rastlanmadığı görüldü.

Klaritromisinin FT-IR spektrumunda antibiyotiğe özgü CH<sub>2</sub> fonksiyonel gruplarının gerilme titreşimlerinin varlığından kaynaklı 1390-1200  $\text{cm}^{-1}$  ve lakton halkası içindeki keton grubundaki karbonil gerilme titreşimlerini gösteren 1690-1680  $\text{cm}^{-1}$  bantların PCL-CLR nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda görülmemesi klaritromisinin nanopartiküllerin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda PCL nanopartiküllerine spesifik 2950-2940  $\text{cm}^{-1}$  ve 1730-1720  $\text{cm}^{-1}$  bantlarının görülmesi enkapsülasyonu doğrulamaktadır.

*Alpinia officinarum*un FT-IR spektrumunda ekstrakta özgü 1670-1600  $\text{cm}^{-1}$  görülen bantlar aromatik halkalardaki C=C gerilme titreşimlerini ve 1440-1395  $\text{cm}^{-1}$  O-H eğilme titreşimlerini temsil etmektedir. Bu bantlarının PCL-ALP nanopartiküllerinin FTIR spektrumunda görülmemesi bitkisel ekstraktın nanopartiküllerin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda PCL nanopartiküllerine spesifik asimetrik CH<sub>2</sub> gerilme titreşimlerinden kaynaklanan 2950-2940  $\text{cm}^{-1}$  ve karbonil gerilme titreşimlerini gösteren 1730-1720  $\text{cm}^{-1}$  bantlarının görülmesi de enkapsülasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

*Alpinia officinarum*un FTIR spektrumunda ekstrakta özgü 1670-1600  $\text{cm}^{-1}$  ve 1440-1395  $\text{cm}^{-1}$  bantların PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda görülmemesi bitkisel ekstraktın nanopartiküllerin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle olduğunu, aynı zamanda antibiyotiğe özgü 1390-1200  $\text{cm}^{-1}$  ve 1690-1680  $\text{cm}^{-1}$  bantlarının PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda görülmemesi klaritromisinin nanopartiküllerin içerisine başarılı bir şekilde enkapsüle olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, PCL nanopartiküllerine spesifik 2950-2940  $\text{cm}^{-1}$  ve 1730-1720  $\text{cm}^{-1}$  bantlarının görülmesi enkapsülasyonu doğrulamaktadır.

Sentezlenen PCL nanopartiküllerinin in vitro salım çalışmaları PBS tamponu içerisinde pH 7.4'te 130 rpm hızında çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirildi. Nanopartiküllerin salımı 168 saat boyunca belirli saat aralıklarında ölçüm alınarak gerçekleştirilerek partiküllerden salınan klaritromisin ve *Alpinia officinarum* kümülatif yüzdeleri kalibrasyon eğri denklemleri ile belirlendi. Salımın 24. saatinin sonunda PCL-CLR nanopartiküllerinden klaritromisin salımı %47,17'sinin; PCL-ALP nanopartiküllerinden bitkisel ekstraktın %33,39'unun; PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinden bitkisel ekstraktın %29,9'unun; antibiyotiğin ise %49,37'sinin salımının gerçekleştiği belirlendi. Salımın 168. saatinin sonunda ise PCL-CLR nanopartiküllerinden klaritromisin %81,88'inin; PCL-ALP nanopartiküllerinden bitkisel ekstraktın %71,83'ünün; PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinden bitkisel ekstraktın %88,01'inin; klaritromisin ise %94,64'ünün salımının gerçekleştiği tespit edildi. Nanopartiküllerden terapötik bileşenlerin salımının ilk 24 saat hızlı bir şekilde sürdüğü 24. saatten itibaren ise daha yavaş bir salım profili gözlemlendi.

Klaritromisin, *Alpinia officinarum* ekstraktının ve karakterizasyonu gerçekleştirilen PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin anti-helicobakteriyel etkinliği ATCC 700824 ticari suşu üzerinde sıvı makrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle incelendi. Sıvı makrodilüsyon yöntemi ile klaritromisinin MİK değeri 64 µg/mL olarak belirlendi. Klaritromisin, *H. pylori*'ye yönelik tedavide ilk tercih edilen antibiyotiklerden biridir ve MİK değerleri genellikle 0,016-0,5 µg/mL arasında rapor edilmektedir. Ancak, antibiyotik direnci görülen suşlarda MİK değerleri 2 µg/mL ila 256 µg/mL arasında tespit edilmiştir [216]. Çalışmamızda tek başına klaritromisin ve klaritromisin yüklü PCL nanopartikülleri uygulanan *H. pylori* kültürlerinde filament oluşumu görüldü. Flamentleşmiş *H. pylori* hücrelerinin işlevi henüz belirlenmemiştir, ancak diğer bakterilerden farklı olarak filamentasyonun konakçı kolonizasyonuna katılmadığı C57/BL6J fareleri üzerinde yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. *H. pylori*'nin flamentasyonu ile göç etme ve kolonizasyon yeteneklerinin azaldığı da gösterilmiştir [44]. Bununla birlikte, flamentlerin antibiyotik direncinde de önemli rolleri vardır. Bu tür formların varlığı amoksisilin antibiyotiğinin MBK değerinde (0,006 µg/mL'ye karşı 32 µg/mL) ciddi bir artışa yol açmaktadır. Bu nedenle bazı

araştırmacılar tarafından filamentasyonun, antibiyotiğin *H. pylori*'ye yönelik antibakteriyel etkisine karşı bakterinin geliştirdiği koruyucu bir mekanizma olduğu öne sürölmektedir [42]. Çalışmamızda da klaritromisinin MİK değerinin literatöreye kıyasla daha yüksek olarak belirlenmesinin nedenini *H. pylori* hücrelerinde filamentleşmenin varlığı olarak düşünmekteyiz.

*Alpinia officinarum* ekstraktının MİK değeri 512 µg/mL olarak belirlendi. Literatürde *Alpinia officinarum* ekstraktının *H. pylori* üzerinde antibakteriyel etkinliğini belirlemeye yönelik herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Ancak, *Bacillus cereus* (MİK: 250 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (MİK: 31,25 µg/mL), *Pseudomonas auroginosa* (MİK: 250 µg/mL), *Escherichia coli* (MİK:500 µg/mL) gibi bakteriler üzerinde yapılan çalışmalarda *Alpinia officinarum* ekstraktının antibakteriyel etkinliği gösterilmiştir [217].

Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktının MİK değerlerine bağlı olarak PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiköllerinin antibakteriyel etkinliği 64 µg/mL - 1024 µg/mL arasında incelendi. Sıvı makrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin her ikisinde de etkinliği incelenen tüm nanopartiköl konsantrasyonlarının *H. pylori* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği tespit edildi. Klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL-CLR-ALP nanopartiköllerinin, incelenen en düşük konsantrasyon hariç tüm konsantrasyonlarda PCL-CLR ve PCL-ALP nanopartiköllerine kıyasla bakterilerin üremesini daha fazla inhibe ettiği gözlemlendi. İncelenen en yüksek konsantrasyon olan 1024 µg/mL'de PCL-CLR-ALP nanopartiköllerinin bakterilerin yaklaşık %85'ini inhibe ettiği belirlendi. 128 µg/mL konsantrasyondan itibaren tek başına klaritromisin ve tek başına ekstrakt içeren nanopartiköllere kıyasla antibiyotik ve ekstraktın ikili kombinasyonunu içeren PCL-CLR-ALP nanopartikölleri daha etkin antibakteriyel etki gösterdiği de tespit edildi.

Antibakteriyel etkinliği incelenen nanopartiköl formölasyonların en yüksek iki konsantrasyonundan (1024 µg/mL, 512 µg/mL) ve kontrol tüpünden örnek alındı ve gram boyama yapılarak ışık mikroskobunda 100X büyütme altında incelendi. PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiköllerinin UV-Vis spektrofotometre ile belirlenen artan konsantrasyona bağlı olarak bakteri sayısındaki azalma, gram

boyama ile de ışık mikroskobu görüntüleriyle doğrulandı. Klaritromisin antibiyotiği enkapsüle PCL-CLR ve klaritromisinle birlikte *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinde *H. pylori* bakterilerinde filamentleşme görüldü. Ancak, *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL-ALP nanopartiküllerinde ve kontrol grubunda filament formu *H. pylori* tespit edilmedi. Bu durum filamentleşmenin klaritromisin antibiyotiğinden kaynaklandığını kanıtlamaktadır.

Disk difüzyon yöntemiyle PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin PCL-CLR ve PCL-ALP nanopartiküllerine kıyasla daha büyük zon çapı oluşturduğu belirlenerek sıvı makrodilüsyon yöntemiyle elde edilen sonuçlarla paralellik saptandı. Boş PCL nanopartiküllerinin inhibisyon zonu oluşumunun görülmemesi, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin tüm konsantrasyonlarında zon çaplarının varlığı nanopartiküllerden etken maddelerin salımının gerçekleştiğinin kanıtıdır. Bu durum, ayrıca antibakteriyel etkinin PCL polimerinden kaynaklanmadığını da göstermektedir. İncelenen en düşük konsantrasyon olan 64 µg/mL, sıvı makrodilüsyon yöntemiyle klaritromisin için MİK olarak belirlenmesine rağmen antibiyotik ve/veya ekstrakt içeren PCL nanopartiküllerinin bu konsantrasyonda daha büyük inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edildi. Bu durum ise nanopartiküllere kapsüllenen etken maddelerin salımının yavaş ve uzun süreli olmasıyla açıklanabilir. PCL-ALP nanopartikülleri 1024 µg/mL hariç tüm konsantrasyonlarda PCL-CLR nanopartikülleriyle ya aynı ya da daha büyük zon çapı oluşturduğu belirlendi. Klaritromisinin antibakteriyel etkinliğinin daha düşük olmasının sebebi olarak gram boyama sonuçlarında da görülen filamentleşmenin varlığı düşünülmektedir. PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin PCL-CLR ve PCL-ALP nanopartiküllerine kıyasla tüm konsantrasyonlarda daha fazla antibakteriyel etki göstermesinin yanı sıra kombinasyonun, klaritromisinin tek başına oluşturduğu filamentleşmeyi azaltmış olması da gram boyama sonuçlarında görülmektedir.

Polikaprolakton düşük toksisite göstermesi nedeniyle biyolojik çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Literatürde farklı yöntemlerle sentezlenen PCL nanopartiküllerinin, mikropartiküllerin ve fiberlerin makrofaj hücre hatları üzerinde sitotoksiteleri incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. Murillo ve ark.

tarafından hazırlanan PCL mikropartiküllerinin J774.2 hücre hattına karşı hafif toksik etki gösterdiği bildirilmiştir [218]. Ayrıca, Luong-Van ve ark., heparin içeren PCL fiberlerinin fare RAW264.7 makrofaj hücre hattında herhangi bir enflamatuar tepkiye neden olmadığını göstermişlerdir [219]. Çalışmamızda sentezlenen nanopartiküllerin ve kapsüle edilen etken maddelerin sitotoksitesisi J774 makrofaj hücre hattında 32 µg/mL - 1024 µg/mL konsantrasyonları arasında incelendi. Klaritromisin, *Alpinia officinarum* ekstraktının, PCL, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin IC50 değerleri sırasıyla 383,18; 347,13; >1024; >1024; 679,86 ve >1024 µg/mL olarak belirlendi. H. Eidi ve ark. tez çalışmamızda da kullandığımız yöntem olan çözücü buharlaştırma yöntemiyle boş PCL ve heparin enkapsüle PCL nanopartikülleri sentezlemiş ve nanopartiküllerin toksisitesini NR8383 makrofaj hücre hattında 15 µg/mL ile 400 µg/mL konsantrasyonları arasında incelemişlerdir. Hem boş PCL hem de heparin yüklü PCL nanopartiküllerinin IC50 değerlerinin 400 µg/mL'den yüksek olduğu sonucunu bildirmişlerdir [220]. Bir başka çalışmada boş ve moksifloksasin yüklü PCL nanopartiküllerinin çeşitli konsantrasyonlarda J774, THP1 ve RAW264.7 hücre hatları üzerinde hücre canlılığı çalışmaları gerçekleştirilmiş ve incelenen tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığının %96'ından fazlasına olduğu belirlenmiştir [221]. Buna bağlı olarak, sentezlediğimiz nanopartiküllerin sitotoksitesileri literatürdeki çalışmalara uygun olarak makrofaj hücrelerinde düşük toksisite gösterdiği sonucuna varıldı.

Tedavide, ideal bir ilaç uygulamasında terapötik bileşenin sadece hedef hücre ve dokularla ilgili belirli biyolojik reaksiyonlarda etkili olması, diğer biyolojik olayları veya vücudun diğer yapılarını etkilememesi ve toksik etki oluşturmaması beklenmektedir. Farmasötik olarak kullanılan ilaçların nanopartiküllere kapsüle edilmeleri hedef dokuda ilaç birikimini arttırmanın yanı sıra çevre dokulardaki hücreler üzerindeki toksisiteyi de azaltmaktadır. Çalışmamızda, klaritromisin ve/veya *Alpinia officinarum* ekstraktı kapsüle PCL nanopartikülleri ve kapsüle edilmeyen serbest halleri kıyaslandığında J774 makrofaj hücrelerinin IC50 değerleri arasında yaklaşık  $\geq 2$ -2,5 kat artış olduğu tespit edildi. Makrofaj hücrelerine serbest halde uygulanan klaritromisin IC50 değeri 383,18 µg/mL, *Alpinia officinarum* ekstraktının IC50 değeri ise 347,13 µg/mL iken *Alpinia officinarum* içeren PCL-ALP

nanopartiküllerinin IC50 değeri 679,86, klaritromisin enkapsüle PCL-CLR, Klaritromisin ile *Alpinia officinarum* ekstraktı yüklü PCL-CLR-ALP ve boş PCL nanopartiküllerinin IC50 değerlerinin ise 1024 µg/mL'den büyük olduğu belirlendi. Bu durum, antibiyotik ve bitki ekstraktının PCL nanopartiküllerine kapsüllenmesinin sitotoksik etkilerini azalttığını göstermektedir.

Antibakteriyel testlerde klaritromisinin serbest halde kullanımı incelenen konsantrasyonların çoğunda daha etkili görüldü de toksisite çalışmalarında incelenen tüm konsantrasyonlarda %80'nin altında hücre canlılığı tespit edildi. Makrofaj hücrelerinin MTT sonuçlarında klaritromisinin 1024 µg/mL konsantrasyonunda yaklaşık %20 hücre canlılığı görüldü. Buna karşılık, klaritromisin içeren PCL-CLR ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin 1024 µg/mL konsantrasyonlarında hücre canlılıkları sırasıyla ~%70 ve ~%50 olarak belirlendi. *Alpinia officinarum* ekstraktı klaritromisin gibi serbest halde uygulandığında da güçlü antibakteriyel etki göstermesine rağmen 1024 µg/mL konsantrasyonda makrofaj hücreleri üzerinde oldukça toksik etki göstererek yaklaşık %5 hücre canlılığı görüldü. Buna rağmen aynı konsantrasyonda PCL-ALP nanopartikülleri uygulanan makrofaj hücrelerinin canlılığı yaklaşık %45 idi. Ayrıca, incelenen en düşük konsantrasyon olan 64 µg/mL'de ilaç ve/veya ekstrakt enkapsüle PCL nanopartikülleri, serbest halde uygulanan klaritromisin ve *Alpinia officinarum* ekstraktından daha güçlü antibakteriyel etki gösterdi. Bu sonuçlar klaritromisinin ve ekstraktın PCL nanopartiküllerine enkapsülasyonunun toksisitelerini oldukça azalttığını ve tedavide uygulanabilirliklerini arttırdığını göstermektedir.

Gastrik adenokarsinom için en güçlü risk faktörü olarak bilinen *H. pylori*, 1994 yılında IARC çalışma grubu tarafından tip I kanserojen olarak sınıflandırılmıştır. *H. pylori* enfeksiyonuna sahip hastaların %1-3'ünde gastrik adenokarsinom geliştiği bilinmektedir [81]. Bu nedenle, *H. pylori* enfeksiyonu ve gastrik adenokarsinom aynı anda görülmesi durumunda, sentezlenen nanopartiküllerin mide kanseri üzerindeki etkinliklerini belirlemek amacıyla AGS (ATCC-CRL-1739) hücre hattında MTT yöntemiyle hücre canlılığı incelendi. Antikanserojen etkinliği bilinmesine rağmen, *Alpinia officinarum* metanolik ekstraktının mide kanser hücrelerinin proliferasyonuna etkisi tez çalışmamıza kadar araştırılmamıştır. Ancak, *Alpinia*

galangalin sulu ekstraktının antikanserojen etkinliği MTT yöntemiyle AGS hücre hattında incelenmiş ve 48 saat inkübasyonun ardından ekstraktın 250 µg/mL'den itibaren artan konsantrasyonlarda canlılığı %80'nin altına düşürdüğü, 1000 µg/mL'de ise %60 hücre canlılığı belirlenmiştir. Havlıcanın mide kanser hücrelerinin büyümesini inhibe edebileceği gösterilmiştir. Çalışmamızda *Alpinia officinarum* metanolik ekstraktının IC<sub>50</sub> değeri 368,68 µg/mL olarak belirlendi ve ekstraktın anti-helicobakteriyel etkisinin yanı sıra antikanserojen etkinliğe de sahip olduğu gösterildi. Ayrıca, *Alpinia officinarum* ekstraktı enkapsüle PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin PCL-CLR nanopartiküllerine kıyasla AGS hücreleri için daha düşük IC<sub>50</sub> değeri tespit edildi. Bu durumun *Alpinia officinarum* antikanserojen etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin AGS hücre hattında 48 saat inkübasyonunun ardından hücrelerin IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 822,42; 679,86 ve 656,92 µg/mL olarak belirlendi. Antibiyotik ve *Alpinia officinarum* ekstraktının PCL nanopartiküllerine kapsüllenmesinin sitotoksik etkilerini azalttığını AGS hücre hattında da tespit edildi. Ying Cong ve ark. klaritromisin yüklü nanomisellerin AGS hücreleri ile 24 saat inkübasyonun ardından incelenen en yüksek konsantrasyonda bile hücre canlılığının %92 olduğunu tespit etmişlerdir. Literatürle de benzer şekilde tez çalışmamızda da klaritromisinin nanopartiküllere enkapsüle edilmesinin antibiyotığın toksisitesini azalttığını gösterildi.

J774 makrofaj hücre hattı ile AGS mide kanser hücre hattının MTT sonuçları karşılaştırıldığında, klaritromisin ve/veya *Alpinia officinarum* ekstraktı yüklü, PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin IC<sub>50</sub> değerlerinin AGS hücreleri için (sırasıyla 822,42; 679,86 ve 656,92 µg/mL) daha düşük olduğu belirlendi. Ayrıca *Alpinia officinarum* ekstraktı incelenen tüm konsantrasyonlarda AGS hücrelerinin canlılığını azalttı. Ancak yüksek konsantrasyonlarda ekstrakt tek başına serbest halde uyguladığında makrofaj hücreleri üzerinde de oldukça toksik etki gösterdi. Buna rağmen, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin makrofaj hücreleri için IC<sub>50</sub> değeri 1024 µg/mL'nin üzerindedir.

Böylece, sentezlenen tüm nanopartiküler formülasyonların incelenen konsantrasyonlarda büyük oranda toksik olmadığı j774 makrofaj hücre hattında

gösterildi. Sıvı makrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleriyle antibakteriyel etki gösterdikleri tespit edildi. Ayrıca, AGS kanser hattında özellikle *Alpinia officinarum*un ekstraktı yüklü PCL nanopartiküllerinin antikanserojen etki gösterdiği de belirlendi. *H. pylori* enfeksiyonu ile gastrik adenokarsinom görülmesi durumunda geliştirilen nanoformülasyonların sadece *H. pylori* tedavisi için değil aynı zamanda kanser hücrelerinin yok edilmesine de yardımcı olacağı sonucuna varıldı.

## Öneriler

1. Antibakteriyel etkinlikleri CagA ve VacA pozitif ticari bir suş olan ATCC 700824'te incelenen *Alpinia officinarum* ve/veya klaritromisin yüklü PCL nanopartiküllerinin, farklı ticari ve hastadan izole *H. pylori* suşlarına yönelik etkilerinin incelenmesi
2. *H. pylori* üzerinde antibakteriyel etkinliği in vitro gösterilen PCL-CLR, PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin in vivo anti-helicobakteriyel etkinliğinin incelenmesi
3. Özellikle PCL-ALP ve PCL-CLR-ALP nanopartiküllerinin AGS hücre hattında antikanserojen etki gösterdiği belirlendi. Buna bağlı olarak *Alpinia officinarum* ekstraktının farklı kanser ilaçları ile kombine edilerek mide kanserinin tedavisinde etkinliğinin incelenmesi
4. *Alpinia officinarum* ve *Alpinia officinarum* yüklü PCL nanopartiküllerinin antikanserojen etkinliğinin in vivo incelenmesi
5. Klaritromisin antibiyotiği ile birlikte enkapsüle edildiğinde antibiyotiğin neden olduğu filamentleşmeyi azalttığı tespit edilen *Alpinia officinarum* ekstraktının *Helicobacter pylori* tedavisinde kullanılan farklı antibiyotiklerle birlikte kombinasyonunun incelenmesi

- [1] J. G. Kusters, A. H. van Vliet, and E. J. Kuipers, "Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection," *Clinical microbiology reviews*, vol. 19, no. 3, pp. 449-490, 2006.
- [2] J. K. Hooi, W. Y. Lai, W. K. Ng, M. M. Suen, F. E. Underwood, D. Tanyingoh, P. Malfertheiner, D. Y. Graham, V. W. Wong, and J. C. Wu, "Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis," *Gastroenterology*, vol. 153, no. 2, pp. 420-429, 2017.
- [3] S. M. Dobbs, R. J. Dobbs, C. Weller, A. Charlett, A. Augustin, D. Taylor, M. A. Ibrahim, and I. Bjarnason, "Peripheral aetiopathogenic drivers and mediators of Parkinson's disease and co-morbidities: role of gastrointestinal microbiota," *Journal of neurovirology*, vol. 22, no. 1, pp. 22-32, 2016.
- [4] A. G. Gravina, R. M. Zagari, C. De Musis, L. Romano, C. Loguercio, and M. Romano, "*Helicobacter pylori* and extragastric diseases: a review," *World journal of gastroenterology*, vol. 24, no. 29, p. 3204, 2018.
- [5] S. Suerbaum and P. Michetti, "*Helicobacter pylori* infection," *New England Journal of Medicine*, vol. 347, no. 15, pp. 1175-1186, 2002.
- [6] A. Rizvanov, T. Haertlé, L. Bogomolnaya, and A. Talebi Bezmin Abadi, "*Helicobacter pylori* and its antibiotic heteroresistance: a neglected issue in published guidelines," *Frontiers in microbiology*, vol. 10, p. 1796, 2019.
- [7] K. McGovern, T. Blanchard, J. Gutierrez, S. Czinn, S. Krakowka, and P. Youngman, " $\gamma$ -Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization," *Infection and immunity*, vol. 69, no. 6, pp. 4168-4173, 2001.
- [8] J. C. Yang, C. W. Lu, and C. J. Lin, "Treatment of *Helicobacter pylori* infection: current status and future concepts," (in eng), *World J Gastroenterol*, vol. 20, no. 18, pp. 5283-93, May 14 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5283.
- [9] T. Safarov, B. Kiran, M. Bagirova, A. M. Allahverdiyev, and E. S. Abamor, "An overview of nanotechnology-based treatment approaches against *Helicobacter pylori*," *Expert review of anti-infective therapy*, vol. 17, no. 10, pp. 829-840, 2019.
- [10] Y. Hu, Y. Zhu, and N.-H. Lu, "Novel and effective therapeutic regimens for *Helicobacter pylori* in an era of increasing antibiotic resistance," *Frontiers in cellular and infection microbiology*, vol. 7, p. 168, 2017.
- [11] S. Y. Kim, D. J. Choi, and J.-W. Chung, "Antibiotic treatment for *Helicobacter pylori*: Is the end coming?," *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, vol. 6, no. 4, p. 183, 2015.
- [12] D. Pohl, P. M. Keller, V. Bordier, and K. Wagner, "Review of current diagnostic methods and advances in *Helicobacter pylori* diagnostics in the era of next

- generation sequencing," *World journal of gastroenterology*, vol. 25, no. 32, p. 4629, 2019.
- [13] B. Kocazeybek and H. B. Tokman, "Prevalence of primary antimicrobial resistance of *H. pylori* in Turkey: a systematic review," *Helicobacter*, vol. 21, no. 4, pp. 251-260, 2016.
- [14] M. L. Hans and A. M. Lowman, "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting," *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, vol. 6, no. 4, pp. 319-327, 2002.
- [15] D. Chenthamara, S. Subramaniam, S. G. Ramakrishnan, S. Krishnaswamy, M. M. Essa, F.-H. Lin, and M. W. Qoronfleh, "Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration," *Biomaterials Research*, vol. 23, no. 1, pp. 1-29, 2019.
- [16] V. M. Gun'ko, "Polymer composites with functionalized silica," in *Polymer Composites with Functionalized Nanoparticles*: Elsevier, 2019, pp. 119-148.
- [17] M. Sharma, "Transdermal and intravenous nano drug delivery systems: present and future," in *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*: Elsevier, 2019, pp. 499-550.
- [18] Y.-H. Lin, S.-C. Tsai, C.-H. Lai, C.-H. Lee, Z. S. He, and G.-C. Tseng, "Genipin-cross-linked fucose-chitosan/heparin nanoparticles for the eradication of *Helicobacter pylori*," *Biomaterials*, vol. 34, no. 18, pp. 4466-4479, 2013.
- [19] R. Umamaheshwari and N. Jain, "Receptor mediated targeting of lectin conjugated gliadin nanoparticles in the treatment of *Helicobacter pylori*," *Journal of drug targeting*, vol. 11, no. 7, pp. 415-424, 2003.
- [20] F. Lotfipour, H. Valizadeh, M. Milani, N. Bahrami, and R. Ghotaslou, "Study of antimicrobial effects of clarithromycin loaded PLGA nanoparticles against clinical strains of *Helicobacter pylori*," *Drug research*, vol. 66, no. 01, pp. 41-45, 2016.
- [21] G. Ayala, W. I. Escobedo-Hinojosa, C. F. de la Cruz-Herrera, and I. Romero, "Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection," *World journal of gastroenterology: WJG*, vol. 20, no. 6, p. 1450, 2014.
- [22] Y.-C. Wang, "Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases," *World Journal of Gastroenterology: WJG*, vol. 20, no. 30, p. 10368, 2014.
- [23] A. M. Basri, H. Taha, and N. Ahmad, "A review on the pharmacological activities and phytochemicals of *Alpinia officinarum* (Galangal) extracts derived from bioassay-guided fractionation and isolation," *Pharmacognosy Reviews*, vol. 11, no. 21, p. 43, 2017.
- [24] P. Ding, L. Yang, C. Feng, and J.-c. Xian, "Research and application of *Alpinia officinarum* in medicinal field," *Chinese Herbal Medicines*, vol. 11, no. 2, pp. 132-140, 2019.
- [25] H.-B. Lee, H.-K. Lee, J.-R. Kim, and Y.-J. Ahn, "Anti-*Helicobacter pylori* diarylheptanoid identified in the rhizome of *Alpinia officinarum*," *Journal of*

the Korean Society for Applied Biological Chemistry, vol. 52, no. 4, pp. 367-370, 2009.

- [26] F. Maixner, K. Thorell, L. Granehall, B. Linz, Y. Moodley, T. Rattei, L. Engstrand, and A. Zink, "*Helicobacter pylori* in ancient human remains," *World journal of gastroenterology*, vol. 25, no. 42, p. 6289, 2019.
- [27] F. Maixner, B. Krause-Kyora, D. Turaev, A. Herbig, M. R. Hoopmann, J. L. Hallows, U. Kusebauch, E. E. Vigl, P. Malfertheiner, and F. Megraud, "The 5300-year-old *Helicobacter pylori* genome of the Iceman," *Science*, vol. 351, no. 6269, pp. 162-165, 2016.
- [28] J. Konturek, "Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori*," *Journal of physiology and pharmacology*, vol. 54, no. S3, pp. 23-41, 2003.
- [29] B. J. Marshall, "One hundred years of discovery and rediscovery of *Helicobacter pylori* and its association with peptic ulcer disease," in *Helicobacter pylori: American Society of Microbiology*, 2001, pp. 19-24.
- [30] J. Pajares and J. Gisbert, "*Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine," *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, vol. 98, no. 10, p. 770, 2006.
- [31] B. Marshall, H. Royce, D. Annear, C. Goodwin, and J. Pearman, "Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa," *Microbios Letters*, vol. 25, no. 28, pp. 83-88, 1984.
- [32] C. Goodwin, "How *Helicobacter pylori* acquired its name, and how it overcomes gastric defence mechanisms," *Journal of gastroenterology and hepatology*, vol. 9, no. S1, pp. S1-S3, 1994.
- [33] P. M. Hellström, "Spotlight on gastroenterology–The Nobel Prize Laureates in Physiology or Medicine 2005: John Robin Warren and Barry James Marshall," ed: Taylor & Francis, 2005.
- [34] J. Houghton, *Helicobacter Species: Methods and Protocols*. Springer, 2012.
- [35] M. Bagirova, A. Allahverdiyev, E. Abamor, H. Aliyeva, G. Unal, and T. Tanalp, "An overview of challenges to eradication of *Helicobacter pylori* infection and future prospects," *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, vol. 21, no. 9, pp. 2199-2219, 2017.
- [36] N. Azevedo, C. Almeida, L. Cerqueira, S. Dias, C. Keevil, and M. Vieira, "Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 10, pp. 3423-3427, 2007.
- [37] S. Kadkhodaei, F. Siavoshi, and K. Akbari Noghabi, "Mucoid and coccoid *Helicobacter pylori* with fast growth and antibiotic resistance," *Helicobacter*, vol. 25, no. 2, p. e12678, 2020.
- [38] W.-Y. Chan, P.-K. Hui, K.-M. Leung, J. Chow, F. Kwok, and C.-S. Ng, "Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach," *American journal of clinical pathology*, vol. 102, no. 4, pp. 503-507, 1994.

- [39] P. Krzyżek and G. Gościniak, "Oral *Helicobacter pylori*: Interactions with host and microbial flora of the oral cavity," *Dental and medical problems*, vol. 55, no. 1, pp. 75-82, 2018.
- [40] L. Cellini, N. Allocati, D. Angelucci, T. Iezzi, E. D. Campi, L. Marzio, and B. Dainelli, "Cocoid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice," *Microbiology and immunology*, vol. 38, no. 11, pp. 843-850, 1994.
- [41] P. Krzyżek, M. M. Biernat, and G. Gościniak, "Intensive formation of cocoid forms as a feature strongly associated with highly pathogenic *Helicobacter pylori* strains," *Folia microbiologica*, vol. 64, no. 3, pp. 273-281, 2019.
- [42] P. Krzyżek and G. Gościniak, "Morphology of *Helicobacter pylori* as a result of peptidoglycan and cytoskeleton rearrangements," *Przegląd gastroenterologiczny*, vol. 13, no. 3, p. 182, 2018.
- [43] D. C. Yang, K. M. Blair, and N. R. Salama, "Staying in shape: the impact of cell shape on bacterial survival in diverse environments," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 80, no. 1, pp. 187-203, 2016.
- [44] C. Chaput, C. Ecobichon, N. Pouradier, J.-C. Rousselle, A. Namane, and I. G. Boneca, "Role of the N-acetylmuramoyl-l-alanyl amidase, AmiA, of *Helicobacter pylori* in peptidoglycan metabolism, daughter cell separation, and virulence," *Microbial Drug Resistance*, vol. 22, no. 6, pp. 477-486, 2016.
- [45] H. Gu, "Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*," *Current microbiology*, vol. 74, no. 7, pp. 863-869, 2017.
- [46] B. Ho and S. Vijayakumari, "A simple and efficient continuous culture system for *Helicobacter pylori*," *Microbios*, vol. 76, no. 306, pp. 59-66, 1993.
- [47] L. P. Andersen, "Colonization and infection by *Helicobacter pylori* in humans," *Helicobacter*, vol. 12, pp. 12-15, 2007.
- [48] V. Camilo, T. Sugiyama, and E. Touati, "Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection," *Helicobacter*, vol. 22, p. e12405, 2017.
- [49] L. K. Sycuro, T. J. Wyckoff, J. Biboy, P. Born, Z. Pincus, W. Vollmer, and N. R. Salama, "Multiple peptidoglycan modification networks modulate *Helicobacter pylori*'s cell shape, motility, and colonization potential," *PLoS Pathog*, vol. 8, no. 3, p. e1002603, 2012.
- [50] Y. Matsuo, Y. Kido, and Y. Yamaoka, "*Helicobacter pylori* outer membrane protein-related pathogenesis," *Toxins*, vol. 9, no. 3, p. 101, 2017.
- [51] D. Sgouras, N. Tegtmeyer, and S. Wessler, "Activity and functional importance of *Helicobacter pylori* virulence factors," *Helicobacter pylori in Human Diseases: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 11*, pp. 35-56, 2019.
- [52] S. Nejati, A. Karkhah, H. Darvish, M. Validi, S. Ebrahimpour, and H. R. Nouri, "Influence of *Helicobacter pylori* virulence factors CagA and VacA on pathogenesis of gastrointestinal disorders," *Microbial pathogenesis*, vol. 117, pp. 43-48, 2018.

- [53] Y. Yamaoka, "Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors," *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, vol. 7, no. 11, p. 629, 2010.
- [54] V. Ricci, M. Giannouli, M. Romano, and R. Zarrilli, "*Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase and its pathogenic role," *World journal of gastroenterology: WJG*, vol. 20, no. 3, p. 630, 2014.
- [55] C. Schmees, C. Prinz, T. Treptau, R. Rad, L. Hengst, P. Volland, S. Bauer, L. Brenner, R. M. Schmid, and M. Gerhard, "Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori*  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase," *Gastroenterology*, vol. 132, no. 5, pp. 1820-1833, 2007.
- [56] C. Wunder, Y. Churin, F. Winau, D. Warnecke, M. Vieth, B. Lindner, U. Zähringer, H.-J. Mollenkopf, E. Heinz, and T. F. Meyer, "Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by *Helicobacter pylori*," *Nature medicine*, vol. 12, no. 9, pp. 1030-1038, 2006.
- [57] S. Backert, M. Neddermann, G. Maubach, and M. Naumann, "Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection," (in eng), *Helicobacter*, vol. 21 Suppl 1, pp. 19-25, Sep 2016, doi: 10.1111/hel.12335.
- [58] U. Zarzecka, A. Harrer, A. Zawilak-Pawlik, J. Skorko-Glonek, and S. Backert, "Chaperone activity of serine protease HtrA of *Helicobacter pylori* as a crucial survival factor under stress conditions," *Cell Communication and Signaling*, vol. 17, no. 1, pp. 1-18, 2019.
- [59] R. N. Ndip, W. G. MacKay, M. J. Farthing, and L. T. Weaver, "Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: review of microbiologic methods," *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, vol. 36, no. 5, pp. 616-622, 2003.
- [60] F. Mégraud and P. Lehours, "*Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing," *Clinical microbiology reviews*, vol. 20, no. 2, pp. 280-322, 2007.
- [61] S. Bury-Moné, N. O. Kaakoush, C. Asencio, F. Mégraud, M. Thibonnier, H. De Reuse, and G. L. Mendz, "Is *Helicobacter pylori* a true microaerophile?," *Helicobacter*, vol. 11, no. 4, pp. 296-303, 2006.
- [62] R. H. Hunt and G. Tytgat, *Helicobacter pylori: basic mechanisms to clinical cure*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [63] S. Backert and Y. Yamaoka, *Helicobacter pylori Research*. Springer, 2016.
- [64] S. Han, R. Flamm, C. Hachem, H. Kim, J. Clarridge, D. Evans, J. Beyer, J. Drnec, and D. Graham, "Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates," *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, vol. 14, no. 4, pp. 349-352, 1995.
- [65] L. M. Brown, "*Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission," *Epidemiologic reviews*, vol. 22, no. 2, pp. 283-297, 2000.
- [66] M. Okuda, Y. Lin, and S. Kikuchi, "*Helicobacter pylori* infection in children and adolescents," *Helicobacter pylori in Human Diseases: Advances in*

Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 11, pp. 107-120, 2019.

- [67] B. Zabala Torres, Y. Lucero, A. J. Lagomarcino, A. Orellana-Manzano, S. George, J. P. Torres, and M. O'Ryan, "Prevalence and dynamics of *Helicobacter pylori* infection during childhood," *Helicobacter*, vol. 22, no. 5, p. e12399, 2017.
- [68] K. Stefano, M. Marco, G. Federica, B. Laura, B. Barbara, and L. Gioacchino, "*Helicobacter pylori*, transmission routes and recurrence of infection: state of the art," *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, vol. 89, no. Suppl 8, p. 72, 2018.
- [69] I. Mladenova and M. Durazzo, "Transmission of *Helicobacter pylori*," *Minerva gastroenterologica e dietologica*, vol. 64, no. 3, pp. 251-254, 2018.
- [70] L. M. Brown, "*Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission," (in eng), *Epidemiol Rev*, vol. 22, no. 2, pp. 283-97, 2000, doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a018040.
- [71] M. Zamani, A. Vahedi, Z. Maghdouri, and J. Shokri-Shirvani, "Role of food in environmental transmission of *Helicobacter pylori*," *Caspian journal of internal medicine*, vol. 8, no. 3, p. 146, 2017.
- [72] Z. Z. Nurgalieva, M. E. Conner, A. R. Opekun, C. Q. Zheng, S. N. Elliott, P. B. Ernst, M. Osato, M. K. Estes, and D. Y. Graham, "B-cell and T-cell immune responses to experimental *Helicobacter pylori* infection in humans," *Infection and immunity*, vol. 73, no. 5, pp. 2999-3006, 2005.
- [73] G. Sobala, J. Crabtree, M. Dixon, C. Schorah, J. Taylor, B. Rathbone, R. Heatley, and A. Axon, "Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations," *Gut*, vol. 32, no. 11, pp. 1415-1418, 1991.
- [74] J. G. K. JG, A. van Vliet, and E. Kuipers, "Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection," *Clinical microbiology reviews*, vol. 19, no. 3, pp. 449-490, 2006.
- [75] J. Watari, N. Chen, P. S. Amenta, H. Fukui, T. Oshima, T. Tomita, H. Miwa, K.-J. Lim, and K. M. Das, "*Helicobacter pylori* associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development," *World Journal of Gastroenterology: WJG*, vol. 20, no. 18, p. 5461, 2014.
- [76] E. Sverdén, L. Agréus, J. M. Dunn, and J. Lagergren, "Peptic ulcer disease," *Bmj*, vol. 367, p. l5495, 2019.
- [77] A. Lanas and F. K. Chan, "Peptic ulcer disease," *The Lancet*, vol. 390, no. 10094, pp. 613-624, 2017.
- [78] D. Y. Graham, "History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer," (in eng), *World J Gastroenterol*, vol. 20, no. 18, pp. 5191-204, May 14 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5191.
- [79] E. J. Kuipers, J. C. Thijs, and H. P. Festen, "The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease," (in eng), *Aliment Pharmacol Ther*, vol. 9 Suppl 2, pp. 59-69, 1995.

- [80] S. Diaconu, A. Predescu, A. Moldoveanu, C. Pop, and C. Fierbințeanu-Braticevici, "*Helicobacter pylori* infection: old and new," *Journal of medicine and life*, vol. 10, no. 2, p. 112, 2017.
- [81] X.-Y. Zhang, P.-Y. Zhang, and M. A. Aboul-Soud, "From inflammation to gastric cancer: Role of *Helicobacter pylori*," *Oncology letters*, vol. 13, no. 2, pp. 543-548, 2017.
- [82] "Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994," (in eng), *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, vol. 61, pp. 1-241, 1994.
- [83] P. Correa and M. B. Piazuolo, "*Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma," *US gastroenterology & hepatology review*, vol. 7, no. 1, p. 59, 2011.
- [84] M. DEMİRAY and O. MANAVOĞLU, "*Helicobacter pylori* ve gastrik karsinogenez," *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, vol. 29, no. 2, pp. 29-33, 2003.
- [85] R. M. Peek and L. E. Wroblewski, "*Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer," in *Helicobacter pylori Research*: Springer, 2016, pp. 403-421.
- [86] D. B. Polk and R. M. Peek, Jr., "*Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond," (in eng), *Nature reviews. Cancer*, vol. 10, no. 6, pp. 403-14, Jun 2010, doi: 10.1038/nrc2857.
- [87] T. Y. Jo, T. Y. Jeon, K. H. Chae, D. H. Kim, M. S. Sim, D. Y. Park, and K. S. Suh, "RImmunohistochemical evaluation of E-cadherin/catenin (alpha-, beta-, gamma-catenin and p120CTN) complex expression in early gastric cancer," *Cancer Research and Treatment*, vol. 35, no. 1, pp. 16-24, 2003.
- [88] M. Hatakeyama, "Malignant *Helicobacter pylori*-associated diseases: Gastric cancer and MALT lymphoma," *Helicobacter pylori in Human Diseases: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 11*, pp. 135-149, 2019.
- [89] M. Plummer, C. de Martel, J. Vignat, J. Ferlay, F. Bray, and S. Franceschi, "Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis," *The Lancet Global Health*, vol. 4, no. 9, pp. e609-e616, 2016.
- [90] A. Zullo, C. Hassan, L. Ridola, A. Repici, R. Manta, and A. Andriani, "Gastric MALT lymphoma: old and new insights," *Annals of Gastroenterology*, vol. 27, no. 1, p. 27, 2014.
- [91] E. Arranz, A. Pena, and D. Bernardo, "Mediators of inflammation and immune responses in the human gastrointestinal tract," ed: Hindawi, 2013.
- [92] W. C. Lin, H. F. Tsai, S. H. Kuo, M. S. Wu, C. W. Lin, P. I. Hsu, A. L. Cheng, and P. N. Hsu, "Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Human B lymphocytes, the origin of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma," (in eng), *Cancer research*, vol. 70, no. 14, pp. 5740-8, Jul 15 2010, doi: 10.1158/0008-5472.can-09-4690.

- [93] D. R. Mitchell, "Environmental factors relevant to the rising incidence of gastro-oesophageal reflux disease," University of Glasgow, 2018.
- [94] O. Yucel, "Interactions between *Helicobacter pylori* and gastroesophageal reflux disease," *Esophagus*, vol. 16, no. 1, pp. 52-62, 2019.
- [95] P. Enck, F. Azpiroz, G. Boeckxstaens, S. Elsenbruch, C. Feinle-Bisset, G. Holtmann, J. M. Lackner, J. Ronkainen, M. Schemann, and A. Stengel, "Functional dyspepsia," *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 3, no. 1, pp. 1-20, 2017.
- [96] H. Suzuki and P. Moayyedi, "*Helicobacter pylori* infection in functional dyspepsia," *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, vol. 10, no. 3, pp. 168-174, 2013.
- [97] L. Álvarez-Arellano and C. Maldonado-Bernal, "*Helicobacter pylori* and neurological diseases: Married by the laws of inflammation," *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, vol. 5, no. 4, p. 400, 2014.
- [98] W.-S. Huang, T.-Y. Yang, W.-C. Shen, C.-L. Lin, M.-C. Lin, and C.-H. Kao, "Association between *Helicobacter pylori* infection and dementia," *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 21, no. 8, pp. 1355-1358, 2014.
- [99] C. Roubaud Baudron, L. Letenneur, A. Langlais, A. Buissonnière, F. Mégraud, J. F. Dartigues, N. Salles, and P. A. Q. Study, "Does *Helicobacter pylori* infection increase incidence of dementia? The Personnes Agees QUID Study," *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 61, no. 1, pp. 74-78, 2013.
- [100] G. Efthymiou, E. Dardiotis, C. Liaskos, E. Marou, V. Tsimourtou, E. I. Rigopoulou, T. Scheper, A. Daponte, W. Meyer, and L. I. Sakkas, "Immune responses against *Helicobacter pylori*-specific antigens differentiate relapsing remitting from secondary progressive multiple sclerosis," *Scientific reports*, vol. 7, no. 1, pp. 1-10, 2017.
- [101] H.-K. Huang, J.-H. Wang, W.-Y. Lei, C.-L. Chen, C.-Y. Chang, and L.-S. Liou, "*Helicobacter pylori* infection is associated with an increased risk of Parkinson's disease: a population-based retrospective cohort study," *Parkinsonism & related disorders*, vol. 47, pp. 26-31, 2018.
- [102] S. F. Ameriso, E. A. Fridman, R. C. Leiguarda, and G. E. Sevlever, "Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques," (in eng), *Stroke*, vol. 32, no. 2, pp. 385-91, Feb 2001, doi: 10.1161/01.str.32.2.385.
- [103] N. Tabata, S. Hokimoto, T. Akasaka, D. Sueta, Y. Arima, K. Sakamoto, E. Yamamoto, Y. Izumiya, M. Yamamuro, and K. Tsujita, "*Helicobacter pylori*-seropositivity along with pro-inflammatory interleukin-1 polymorphisms correlated with myocardial infarction," *Clinical Trials and Regulatory Science in Cardiology*, vol. 17, pp. 9-14, 2016.
- [104] A. Zendejdel and M. Roham, "Biological evidence of the relationship between *Helicobacter pylori* and associated extragastric diseases," *Journal of cellular biochemistry*, vol. 120, no. 8, pp. 12128-12140, 2019.

- [105] Y. Chen and M. J. Blaser, "Association between gastric *Helicobacter pylori* colonization and glycated hemoglobin levels," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 205, no. 8, pp. 1195-1202, 2012.
- [106] M. Kato, A. Toda, R. Yamamoto-Honda, Y. Arase, and H. Sone, "Association between *Helicobacter pylori* infection, eradication and diabetes mellitus," *Journal of diabetes investigation*, vol. 10, no. 5, pp. 1341-1346, 2019.
- [107] Y. A. M. Vanegas and P. Vishnu, "Management of *Helicobacter pylori* in patients with immune thrombocytopenia," *Hämostaseologie*, vol. 39, no. 03, pp. 279-283, 2019.
- [108] M. Konno, S. Muraoka, M. Takahashi, and T. Imai, "Iron-deficiency anemia associated with *Helicobacter pylori* gastritis," (in eng), *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, vol. 31, no. 1, pp. 52-6, Jul 2000, doi: 10.1097/00005176-200007000-00012.
- [109] C. Hershko and C. Camaschella, "How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia," (in eng), *Blood*, vol. 123, no. 3, pp. 326-33, Jan 16 2014, doi: 10.1182/blood-2013-10-512624.
- [110] N. Figura, F. Franceschi, A. Santucci, G. Bernardini, G. Gasbarrini, and A. Gasbarrini, "Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection," *Helicobacter*, vol. 15, pp. 60-68, 2010.
- [111] X. Ma, R. A. Reich, J. A. Wright, H. R. Tooker, L. D. Teeter, J. M. Musser, and E. A. Graviss, "Association between interleukin-8 gene alleles and human susceptibility to tuberculosis disease," (in eng), *J Infect Dis*, vol. 188, no. 3, pp. 349-55, Aug 1 2003, doi: 10.1086/376559.
- [112] A. Gravina, A. Federico, E. Ruocco, A. Lo Schiavo, M. Masarone, C. Tuccillo, F. Peccerillo, A. Miranda, L. Romano, and C. De Sio, "*Helicobacter pylori* infection but not small intestinal bacterial overgrowth may play a pathogenic role in rosacea," *United European gastroenterology journal*, vol. 3, no. 1, pp. 17-24, 2015.
- [113] E. Garza-González, G. I. Perez-Perez, H. J. Maldonado-Garza, and F. J. Bosques-Padilla, "A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication," *World journal of gastroenterology: WJG*, vol. 20, no. 6, p. 1438, 2014.
- [114] Y.-K. Wang, F.-C. Kuo, C.-J. Liu, M.-C. Wu, H.-Y. Shih, S. S. Wang, J.-Y. Wu, C.-H. Kuo, Y.-K. Huang, and D.-C. Wu, "Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments," *World Journal of Gastroenterology: WJG*, vol. 21, no. 40, p. 11221, 2015.
- [115] S. Kazemi, H. Tavakkoli, M. R. Habizadeh, and M. H. Emami, "Diagnostic values of *Helicobacter pylori* diagnostic tests: stool antigen test, urea breath test, rapid urease test, serology and histology," *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, vol. 16, no. 9, p. 1097, 2011.

- [116] S. K. Patel, C. B. Pratap, A. K. Jain, A. K. Gulati, and G. Nath, "Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard?," World journal of gastroenterology: WJG, vol. 20, no. 36, p. 12847, 2014.
- [117] H. M. El-Zimaity and D. Y. Graham, "Evaluation of gastric mucosal biopsy site and number for identification of *Helicobacter pylori* or intestinal metaplasia: role of the Sydney System," (in eng), Human pathology, vol. 30, no. 1, pp. 72-7, Jan 1999, doi: 10.1016/s0046-8177(99)90303-9.
- [118] J. Y. Lee and N. Kim, "Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: histology," Annals of translational medicine, vol. 3, no. 1, 2015.
- [119] L. Laine, D. N. Lewin, W. Naritoku, and H. Cohen, "Prospective comparison of H&E, Giemsa, and Genta stains for the diagnosis of *Helicobacter pylori*," (in eng), Gastrointest Endosc, vol. 45, no. 6, pp. 463-7, Jun 1997, doi: 10.1016/s0016-5107(97)70174-3.
- [120] H. Rüssmann, V. A. Kempf, S. Koletzko, J. Heesemann, and I. B. Autenrieth, "Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens," (in eng), J Clin Microbiol, vol. 39, no. 1, pp. 304-8, Jan 2001, doi: 10.1128/jcm.39.1.304-308.2001.
- [121] A. Sudraba, I. Daugule, D. Rudzite, K. Funka, I. Tolmanis, L. Engstrand, D. Janciauskas, L. Jonaitis, G. Kiudelis, and L. Kupcinskas, "Performance of routine *Helicobacter pylori* tests in patients with atrophic gastritis," Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases, vol. 20, no. 4, 2011.
- [122] G. I. Perez-Perez, "Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*: Culture, including transport," Gastroenterology clinics of North America, vol. 29, no. 4, pp. 879-884, 2000.
- [123] P. Malfertheiner, F. Megraud, C. A. O'Morain, J. Atherton, A. T. Axon, F. Bazzoli, G. F. Gensini, J. P. Gisbert, D. Y. Graham, and T. Rokkas, "Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV/Florence consensus report," Gut, vol. 61, no. 5, pp. 646-664, 2012.
- [124] A. M. Allahverdiyev, M. Bagirova, R. Caliskan, H. B. Tokman, H. Aliyeva, G. Unal, O. N. Oztel, E. S. Abamor, H. Toptas, and P. Yuksel, "Isolation and diagnosis of *Helicobacter pylori* by a new method: microcapillary culture," World Journal of Gastroenterology: WJG, vol. 21, no. 9, p. 2622, 2015.
- [125] P. Lehours and F. Mégraud, "*Helicobacter pylori* molecular diagnosis," (in eng), Expert review of molecular diagnostics, vol. 11, no. 4, pp. 351-5, May 2011, doi: 10.1586/erm.11.17.
- [126] V. Singh, S. Mishra, G. R. Rao, A. K. Jain, V. K. Dixit, A. K. Gulati, D. Mahajan, M. McClelland, and G. Nath, "Evaluation of nested PCR in detection of *Helicobacter pylori* targeting a highly conserved gene: HSP60," (in eng), Helicobacter, vol. 13, no. 1, pp. 30-4, Feb 2008, doi: 10.1111/j.1523-5378.2008.00573.x.
- [127] J. Versalovic, "*Helicobacter pylori*. Pathology and diagnostic strategies," (in eng), Am J Clin Pathol, vol. 119, no. 3, pp. 403-12, Mar 2003.

- [128] R. J. Owen, "Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*," (in eng), *Gut*, vol. 50, no. 3, pp. 285-9, Mar 2002, doi: 10.1136/gut.50.3.285.
- [129] A. Shiotani, M. P. Dore, and D. Y. Graham, "Urea breath test and rapid urease test," in *Helicobacter pylori*: Springer, 2016, pp. 143-155.
- [130] K. Nishikawa, T. Sugiyama, M. Kato, J. Ishizuka, H. Kagaya, K. Hokari, and M. Asaka, "A prospective evaluation of new rapid urease tests before and after eradication treatment of *Helicobacter pylori*, in comparison with histology, culture and 13C-urea breath test," (in eng), *Gastrointest Endosc*, vol. 51, no. 2, pp. 164-8, Feb 2000, doi: 10.1016/s0016-5107(00)70412-3.
- [131] T. Uotani and D. Y. Graham, "Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test," *Annals of translational medicine*, vol. 3, no. 1, 2015.
- [132] A. Makristathis, A. M. Hirschl, F. Mégraud, and E. Bessède, "Review: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection," (in eng), *Helicobacter*, vol. 24 Suppl 1, p. e12641, Sep 2019, doi: 10.1111/hel.12641.
- [133] J. P. Gisbert and J. M. Pajares, "Review article: 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection -- a critical review," (in eng), *Aliment Pharmacol Ther*, vol. 20, no. 10, pp. 1001-17, Nov 15 2004, doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.02203.x.
- [134] L. M. Best, Y. Takwoingi, S. Siddique, A. Selladurai, A. Gandhi, B. Low, M. Yaghoobi, and K. S. Gurusamy, "Non-invasive diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection," (in eng), *The Cochrane database of systematic reviews*, vol. 3, no. 3, p. Cd012080, Mar 15 2018, doi: 10.1002/14651858.CD012080.pub2.
- [135] C. Ricci, J. Holton, and D. Vaira, "Diagnosis of *Helicobacter pylori*: invasive and non-invasive tests," (in eng), *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, vol. 21, no. 2, pp. 299-313, 2007, doi: 10.1016/j.bpg.2006.11.002.
- [136] F. Mégraud, "The most important diagnostic modalities for *Helicobacter pylori*, now and in the future," (in eng), *Eur J Gastroenterol Hepatol*, vol. 9 Suppl 1, pp. S13-5; discussion S15, Apr 2012.
- [137] P. A. Marchildon, T. Sugiyama, Y. Fukuda, J. S. Peacock, M. Asaka, T. Shimoyama, and D. Y. Graham, "Evaluation of the effects of strain-specific antigen variation on the accuracy of serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* infection," (in eng), *J Clin Microbiol*, vol. 41, no. 4, pp. 1480-5, Apr 2003, doi: 10.1128/jcm.41.4.1480-1485.2003.
- [138] L. Formichella, L. Romberg, C. Bolz, M. Vieth, M. Geppert, G. Göttner, C. Nölting, D. Walter, W. Schepp, and A. Schneider, "A novel line immunoassay based on recombinant virulence factors enables highly specific and sensitive serologic diagnosis of *Helicobacter pylori* infection," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 20, no. 11, pp. 1703-1710, 2013.
- [139] M. Khalifeh Gholi, B. Kalali, L. Formichella, G. Göttner, F. Shamsipour, A. H. Zarnani, M. Hosseini, D. H. Busch, M. H. Shirazi, and M. Gerhard, "*Helicobacter pylori* FliD protein is a highly sensitive and specific marker for serologic diagnosis of *H. pylori* infection," (in eng), *International journal of medical*

microbiology : IJMM, vol. 303, no. 8, pp. 618-23, Dec 2013, doi: 10.1016/j.ijmm.2013.08.005.

- [140] J. P. Gisbert and J. M. Pajares, "Stool antigen test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review," (in eng), *Helicobacter*, vol. 9, no. 4, pp. 347-68, Aug 2004, doi: 10.1111/j.1083-4389.2004.00235.x.
- [141] T. Shimoyama, "Stool antigen tests for the management of *Helicobacter pylori* infection," *World Journal of Gastroenterology: WJG*, vol. 19, no. 45, p. 8188, 2013.
- [142] J. P. Gisbert, F. de la Morena, and V. Abraira, "Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of *H. pylori* infection: a systematic review and meta-analysis," (in eng), *Am J Gastroenterol*, vol. 101, no. 8, pp. 1921-30, Aug 2006, doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00668.x.
- [143] T. Shimoyama, "Stool antigen tests for the management of *Helicobacter pylori* infection," (in eng), *World J Gastroenterol*, vol. 19, no. 45, pp. 8188-91, Dec 7 2013, doi: 10.3748/wjg.v19.i45.8188.
- [144] W. K. Leung and D. Y. Graham, "Clarithromycin for *Helicobacter pylori* infection," (in eng), *Expert opinion on pharmacotherapy*, vol. 1, no. 3, pp. 507-14, Mar 2000, doi: 10.1517/14656566.1.3.507.
- [145] J. A. Salcedo and F. Al-Kawas, "Treatment of *Helicobacter pylori* infection," (in eng), *Archives of internal medicine*, vol. 158, no. 8, pp. 842-51, Apr 27 1998, doi: 10.1001/archinte.158.8.842.
- [146] L. N. Meurer and D. J. Bower, "Management of *Helicobacter pylori* infection," *American family physician*, vol. 65, no. 7, p. 1327, 2002.
- [147] B. Guevara and A. G. Cogdill, "*Helicobacter pylori*: A Review of Current Diagnostic and Management Strategies," (in eng), *Dig Dis Sci*, vol. 65, no. 7, pp. 1917-1931, Jul 2020, doi: 10.1007/s10620-020-06193-7.
- [148] A. O'Connor, T. Furuta, J. P. Gisbert, and C. O'Morain, "Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2020," *Helicobacter*, vol. 25, pp. e12743-e12743, 2020.
- [149] S. Flores-Treviño, S. Mendoza-Olazarán, P. Bocanegra-Ibarias, H. J. Maldonado-Garza, and E. Garza-González, "*Helicobacter pylori* drug resistance: therapy changes and challenges," *Expert review of gastroenterology & hepatology*, vol. 12, no. 8, pp. 819-827, 2018.
- [150] Y. K. HUANG, M. C. WU, S. S. Wang, C. H. KUO, Y. C. LEE, L. L. CHANG, T. H. WANG, Y. H. CHEN, W. M. WANG, and D. C. WU, "Lansoprazole-based sequential and concomitant therapy for the first-line *Helicobacter pylori* eradication," *Journal of digestive diseases*, vol. 13, no. 4, pp. 232-238, 2012.
- [151] A. Zullo, D. Vaira, N. Vakil, C. Hassan, L. Gatta, C. Ricci, V. De Francesco, M. Menegatti, A. Tampieri, F. Perna, V. Rinaldi, F. Perri, C. Papadìa, F. Fornari, S. Pilati, L. S. Mete, A. Merla, R. Potì, G. Marinone, A. Savioli, S. M. Campo, D. Faleo, E. Ierardi, M. Miglioli, and S. Morini, "High eradication rates of *Helicobacter pylori* with a new sequential treatment," (in eng), *Aliment Pharmacol Ther*,

vol. 17, no. 5, pp. 719-26, Mar 1 2003, doi: 10.1046/j.1365-2036.2003.01461.x.

- [152] J. P. Gisbert and X. Calvet, "Update on non-bismuth quadruple (concomitant) therapy for eradication of *Helicobacter pylori*," *Clinical and experimental gastroenterology*, vol. 5, p. 23, 2012.
- [153] J. Gisbert, M. Romano, A. Gravina, P. Solís-Muñoz, F. Bermejo, J. Molina-Infante, M. Castro-Fernández, J. Ortuño, A. Lucendo, and M. Herranz, "*Helicobacter pylori* second-line rescue therapy with levofloxacin-and bismuth-containing quadruple therapy, after failure of standard triple or non-bismuth quadruple treatments," *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 41, no. 8, pp. 768-775, 2015.
- [154] H. Matsumoto, A. Shiotani, and D. Y. Graham, "Current and future treatment of *Helicobacter pylori* infections," *Helicobacter pylori in Human Diseases: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 11*, pp. 211-225, 2019.
- [155] N. Wueppenhorst, H.-P. Stueger, M. Kist, and E. Glocker, "Identification and molecular characterization of triple-and quadruple-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates in Germany," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 63, no. 4, pp. 648-653, 2009.
- [156] D. Wang, Q. Guo, Y. Yuan, and Y. Gong, "The antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* to five antibiotics and influencing factors in an area of China with a high risk of gastric cancer," *BMC microbiology*, vol. 19, no. 1, p. 152, 2019.
- [157] I. Kobayashi, K. Murakami, M. Kato, S. Kato, T. Azuma, S. i. Takahashi, N. Uemura, T. Katsuyama, Y. Fukuda, and K. Haruma, "Changing antimicrobial susceptibility epidemiology of *Helicobacter pylori* strains in Japan between 2002 and 2005," *Journal of clinical microbiology*, vol. 45, no. 12, pp. 4006-4010, 2007.
- [158] K. Murakami, T. Furuta, T. Ando, T. Nakajima, Y. Inui, T. Oshima, T. Tomita, K. Mabe, M. Sasaki, and T. Suganuma, "Multi-center randomized controlled study to establish the standard third-line regimen for *Helicobacter pylori* eradication in Japan," *Journal of gastroenterology*, vol. 48, no. 10, pp. 1128-1135, 2013.
- [159] M. M. Gerrits, A. H. van Vliet, E. J. Kuipers, and J. G. Kusters, "*Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications," *The Lancet infectious diseases*, vol. 6, no. 11, pp. 699-709, 2006.
- [160] J.-C. Yang, C.-W. Lu, and C.-J. Lin, "Treatment of *Helicobacter pylori* infection: current status and future concepts," *World journal of gastroenterology: WJG*, vol. 20, no. 18, p. 5283, 2014.
- [161] M. Wiese, A. Eljaszewicz, M. Andryszczyk, S. Gronek, L. Gackowska, I. Kubiszewska, W. Kaszewski, A. Helmin-Basa, M. Januszewska, and I. Motyl, "Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* and *helicobacter*

- pylori* CagA+ on the expression of selected superficial molecules on monocyte and lymphocyte and the synthesis of cytokines in whole blood culture," *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 63, no. 3, p. 217, 2012.
- [162] F.-G. Hanisch, D. Bonar, N. Schloerer, and H. Schroten, "Human trefoil factor 2 is a lectin that binds  $\alpha$ -GlcNAc-capped mucin glycans with antibiotic activity against *Helicobacter pylori*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 40, pp. 27363-27375, 2014.
- [163] D. Lesbros-Pantoflickova, I. Corthesy-Theulaz, and A. L. Blum, "*Helicobacter pylori* and probiotics," *The Journal of nutrition*, vol. 137, no. 3, pp. 812S-818S, 2007.
- [164] D. Sgouras, P. Maragkoudakis, K. Petraki, B. Martinez-Gonzalez, E. Eriotou, S. Michopoulos, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou, and A. Mentis, "In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota," *Applied and environmental microbiology*, vol. 70, no. 1, pp. 518-526, 2004.
- [165] T.-S. Kim, J.-W. Hur, M.-A. Yu, C.-I. Cheigh, K.-N. Kim, J.-K. Hwang, and Y.-R. Pyun, "Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria," *Journal of food protection*, vol. 66, no. 1, pp. 3-12, 2003.
- [166] K. C. Johnson-Henry, D. J. Mitchell, Y. Avitzur, E. Galindo-Mata, N. L. Jones, and P. M. Sherman, "Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice," *Digestive diseases and sciences*, vol. 49, no. 7-8, pp. 1095-1102, 2004.
- [167] A. Patel, N. Shah, and J. Prajapati, "Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection—a brief review," *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, vol. 47, no. 5, pp. 429-437, 2014.
- [168] L. L. Cogo, C. L. B. Monteiro, M. D. Miguel, O. G. Miguel, M. M. Cunico, M. L. Ribeiro, E. R. d. Camargo, G. M. B. Kussen, K. d. S. Nogueira, and L. M. D. Costa, "Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 41, no. 2, pp. 304-309, 2010.
- [169] T. Ohno, M. Kita, Y. Yamaoka, S. Imamura, T. Yamamoto, S. Mitsufuji, T. Kodama, K. Kashima, and J. Imanishi, "Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*," *Helicobacter*, vol. 8, no. 3, pp. 207-215, 2003.
- [170] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, and L. Pouysegou, "Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, no. 3, pp. 586-621, 2011.
- [171] M. Miklasińska-Majdanik, M. Kępa, R. D. Wojtyczka, D. Idzik, and T. J. Wąsik, "Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical strains," *International journal of environmental research and public health*, vol. 15, no. 10, p. 2321, 2018.
- [172] H. Tsuchiya, M. Sato, T. Miyazaki, S. Fujiwara, S. Tanigaki, M. Ohyama, T. Tanaka, and M. Inuma, "Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 50, no. 1, pp. 27-34, 1996.

- [173] T. T. Cushnie and A. J. Lamb, "Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids," *International journal of antimicrobial agents*, vol. 38, no. 2, pp. 99-107, 2011.
- [174] S. Martini, C. D'Addario, A. Colacevich, S. Focardi, F. Borghini, A. Santucci, N. Figura, and C. Rossi, "Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds," *International journal of antimicrobial agents*, vol. 34, no. 1, pp. 50-59, 2009.
- [175] A. Ohsaki, J. Takashima, N. Chiba, and M. Kawamura, "Microanalysis of a selective potent anti-*Helicobacter pylori* compound in a Brazilian medicinal plant, *Myroxylon peruiferum* and the activity of analogues," *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 9, no. 8, pp. 1109-1112, 1999.
- [176] J. Benites, H. Toledo, F. Salas, A. Guerrero, D. Rios, J. A. Valderrama, and P. B. Calderon, "In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* growth by redox cycling phenylaminojuglones," *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2018, 2018.
- [177] Y.-C. Wang, W.-Y. Li, D.-C. Wu, J.-J. Wang, C.-H. Wu, J.-J. Liao, and C.-K. Lin, "In Vitro Activity of 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone and Stigmasta-7, 22-diene-3 $\beta$ -ol from *Impatiens balsamina* L. against Multiple Antibiotic-Resistant *Helicobacter pylori*," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011, 2011.
- [178] N. A. Mahizan, S.-K. Yang, C.-L. Moo, A. A.-L. Song, C.-M. Chong, C.-W. Chong, A. Abushelaibi, S.-H. E. Lim, and K.-S. Lai, "Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens," *Molecules*, vol. 24, no. 14, p. 2631, 2019.
- [179] L. Othman, A. Sleiman, and R. M. Abdel-Massih, "Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants," *Frontiers in microbiology*, vol. 10, p. 911, 2019.
- [180] M. ed Stems and B. Roots, "Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants."
- [181] N. P. Hanh, N. Q. Binh, and B. S. Adhikari, "Distribution of *Alpinia* (Zingiberaceae) and their use pattern in Vietnam," *J. Biodivers. Endanger Species*, vol. 2, p. 121, 2014.
- [182] P. Saralamp, *Medicinal plants in Thailand*. Department of Pharmaceutical Bota, 1996.
- [183] J. Cao, H. Wang, F. Chen, J. Fang, A. Xu, W. Xi, S. Zhang, G. Wu, and Z. Wang, "Galangin inhibits cell invasion by suppressing the epithelial-mesenchymal transition and inducing apoptosis in renal cell carcinoma," *Molecular Medicine Reports*, vol. 13, no. 5, pp. 4238-4244, 2016.
- [184] L. Tao, Z.-T. Wang, E.-Y. Zhu, Y.-H. Lu, and D.-Z. Wei, "HPLC analysis of bioactive flavonoids from the rhizome of *Alpinia officinarum*," *South African Journal of Botany*, vol. 72, no. 1, pp. 163-166, 2006.

- [185] C. S. Rini, J. Rohmah, and L. Widyaningrum, "The antibacterial activity test galanga (*Alpinia galangal*) on the growth of bacteria *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*," in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2018, vol. 420, no. 1: IOP Publishing, p. 012142.
- [186] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arabian journal of chemistry*, vol. 12, no. 7, pp. 908-931, 2019.
- [187] H. Khan, M. Sakharkar, A. Nayak, U. Kishore, and A. Khan, "Nanoparticles for biomedical applications: An overview," in *Nanobiomaterials*: Elsevier, 2018, pp. 357-384.
- [188] A. Cartaxo, "Nanoparticles types and properties—understanding these promising devices in the biomedical area," MS thesis, Dept. Biomed. Eng., University of Minho., Braga, Portugal, 2010.
- [189] S. Movassaghian, O. M. Merkel, and V. P. Torchilin, "Applications of polymer micelles for imaging and drug delivery," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 7, no. 5, pp. 691-707, 2015.
- [190] E. Abbasi, S. F. Aval, A. Akbarzadeh, M. Milani, H. T. Nasrabadi, S. W. Joo, Y. Hanifehpour, K. Nejati-Koshki, and R. Pashaei-Asl, "Dendrimers: synthesis, applications, and properties," *Nanoscale research letters*, vol. 9, no. 1, p. 247, 2014.
- [191] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, and K. Nejati-Koshki, "Liposome: classification, preparation, and applications," *Nanoscale research letters*, vol. 8, no. 1, p. 102, 2013.
- [192] T. Kim and T. Hyeon, "Applications of inorganic nanoparticles as therapeutic agents," *Nanotechnology*, vol. 25, no. 1, p. 012001, 2013.
- [193] W. H. De Jong and P. J. Borm, "Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards," *International journal of nanomedicine*, vol. 3, no. 2, p. 133, 2008.
- [194] G. D. Mogoşanu, A. M. Grumezescu, L. E. Bejenaru, and C. Bejenaru, "Natural and synthetic polymers for drug delivery and targeting," in *Nanobiomaterials in drug delivery*: Elsevier, 2016, pp. 229-284.
- [195] K. B. Sutradhar and M. Amin, "Nanotechnology in cancer drug delivery and selective targeting," *International Scholarly Research Notices*, vol. 2014, 2014.
- [196] E. Blanco, H. Shen, and M. Ferrari, "Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery," *Nature biotechnology*, vol. 33, no. 9, p. 941, 2015.
- [197] H. S. Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J. P. Zimmer, B. I. Ipe, M. G. Bawendi, and J. V. Frangioni, "Renal clearance of quantum dots," *Nature biotechnology*, vol. 25, no. 10, pp. 1165-1170, 2007.
- [198] L.-T. Chen and L. Weiss, "The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen," *Blood*, vol. 41, no. 4, pp. 529-537, 1973.

- [199] F. Gentile, C. Chiappini, D. Fine, R. Bhavane, M. Peluccio, M. M.-C. Cheng, X. Liu, M. Ferrari, and P. Decuzzi, "The effect of shape on the margination dynamics of non-neutrally buoyant particles in two-dimensional shear flows," *Journal of biomechanics*, vol. 41, no. 10, pp. 2312-2318, 2008.
- [200] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, and O. C. Farokhzad, "Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles," *Molecular pharmaceutics*, vol. 5, no. 4, pp. 505-515, 2008.
- [201] S. Das and A. Chaudhury, "Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery," *Aaps Pharmscitech*, vol. 12, no. 1, pp. 62-76, 2011.
- [202] M. Luo, Y.-Y. Jia, Z.-W. Jing, C. Li, S.-Y. Zhou, Q.-B. Mei, and B.-L. Zhang, "Construction and optimization of pH-sensitive nanoparticle delivery system containing PLGA and UCCs-2 for targeted treatment of *Helicobacter pylori*," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 164, pp. 11-19, 2018.
- [203] V. Rana and R. Sharma, "Recent advances in development of Nano drug delivery," in *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*: Elsevier, 2019, pp. 93-131.
- [204] B. Singh, S. Maharjan, K.-H. Cho, L. Cui, I.-K. Park, Y.-J. Choi, and C.-S. Cho, "Chitosan-based particulate systems for the delivery of mucosal vaccines against infectious diseases," *International journal of biological macromolecules*, vol. 110, pp. 54-64, 2018.
- [205] L. Zhang, D. Pornpattananangkul, C.-M. Hu, and C.-M. Huang, "Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery," *Current medicinal chemistry*, vol. 17, no. 6, pp. 585-594, 2010.
- [206] N. Nair, V. Sekhar, K. Nampoothiri, and A. Pandey, "Biodegradation of biopolymers," in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*: Elsevier, 2017, pp. 739-755.
- [207] L. McKeen, "12-Renewable Resource and Biodegradable Polymers," *The Effect of Sterilization on Plastics and Elastomers*, pp. 305-317, 2012.
- [208] L. W. McKeen, *Permeability properties of plastics and elastomers*. William Andrew, 2016.
- [209] R. Ramanujam, B. Sundaram, G. Janarthanan, E. Devendran, M. Venkadasalam, and M. J. Milton, "Biodegradable Polycaprolactone nanoparticles based drug delivery systems: a short review," *Biosciences Biotechnology Research Asia*, vol. 15, no. 3, pp. 679-685, 2018.
- [210] A. T. Alex, A. Joseph, G. Shavi, J. V. Rao, and N. Udupa, "Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery," *Drug delivery*, vol. 23, no. 7, pp. 2144-2153, 2016.
- [211] C.-H. Chang, W.-Y. Huang, C.-H. Lai, Y.-M. Hsu, Y.-H. Yao, T.-Y. Chen, J.-Y. Wu, S.-F. Peng, and Y.-H. Lin, "Development of novel nanoparticles shelled with heparin for berberine delivery to treat *Helicobacter pylori*," *Acta biomaterialia*, vol. 7, no. 2, pp. 593-603, 2011.

- [212] J. Zhang, J. Dou, S. Zhang, Q. Liang, and Q. Meng, "Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil and methanol extracts of rhizoma *Alpinia officinarum* from China in vitro," *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 28, 2010.
- [213] A. Das and K. S. Santhy, "Chemical Characterisation of *Alpinia galanga* (L.) Willd by Gc–Ms, XRD, FTIR and Uv-Vis Spectroscopic Methods," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 7, no. 9, 2015.
- [214] S. K. Lai, Y.-Y. Wang, and J. Hanes, "Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 61, no. 2, pp. 158-171, 2009.
- [215] S. P. Bandi, Y. S. Kumbhar, and V. V. K. Venuganti, "Effect of particle size and surface charge of nanoparticles in penetration through intestinal mucus barrier," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 22, no. 3, pp. 1-11, 2020.
- [216] V. De Francesco, A. Zullo, C. Hassan, F. Giorgio, R. Rosania, and E. Ierardi, "Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal," *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, vol. 2, no. 3, p. 35, 2011.
- [217] A. Srividya, S. Dhanabal, V. Misra, and G. Suja, "Antioxidant and antimicrobial activity of *Alpinia officinarum*," *Indian journal of pharmaceutical sciences*, vol. 72, no. 1, p. 145, 2010.
- [218] M. Murillo, C. Gamazo, M. Goñi, J. M. Irache, and M. Blanco-Príeto, "Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis," *International journal of pharmaceutics*, vol. 242, no. 1-2, pp. 341-344, 2002.
- [219] E. Luong-Van, L. Grøndahl, K. N. Chua, K. W. Leong, V. Nurcombe, and S. M. Cool, "Controlled release of heparin from poly ( $\epsilon$ -caprolactone) electrospun fibers," *Biomaterials*, vol. 27, no. 9, pp. 2042-2050, 2006.
- [220] H. Eidi, O. Joubert, G. Attik, R. E. Duval, M. Bottin, A. Hamouia, P. Maincent, and B. Rihn, "Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 396, no. 1-2, pp. 156-165, 2010.
- [221] M. Handa, A. Sharma, R. K. Verma, and R. Shukla, "Polycaprolactone based nano-carrier for co-administration of moxifloxacin and rutin and its In-vitro evaluation for sepsis," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 54, p. 101286, 2019.

İletişim Bilgisi: bukrekiran@gmail.com

### Konferans Bildirileri

1. T. Safarov, B. Kiran, A. M. Allahverdiyev, M. Bagirova, and E. S. Abamor, "Evaluation of anti-bacterial activities of polycaprolactone nanoparticles based drug delivery systems on *Helicobacter pylori*," 3 rd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2020), Abstract Book, p. 745, 2020.

