



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLARİTROMİSİN VE METRONİDAZOL' ÜN FARKLI
MOLEKÜL AĞIRLIKLIL KİTOSAN İLE KOMBİNASYONUNUN
HELICOBACTER PYLORI ÜZERİNE ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTESİ**

HATİCE MERVE ALTINDAĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. ÜMRAN SOYOĞUL GÜRER

2016-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Farmasötik Mikrobiyoloji
Tez Sahibi : Hatice Merve Sarıca
Tez Başlığı : Klaritromisin ve metronidazol' ün farklı molekül ağırlıklı kitosan ile kombinasyonunun *Helicobacter pylori* üzerine antimikrobiyal aktivitesi
Sınav Yeri : Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 26/02/2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

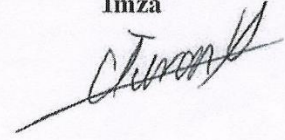
Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr. Ümran Soyoğul Gürer

Kurumu

Marmara Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Yard.Doç.Dr. Cenk Sesal

Marmara Üniversitesi

Yard.Doç.Dr. Erkan Rayaman

Marmara Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 24/03/2016 tarih ve 2.1. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hatice Merve Altındağ



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof.Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER'e,

Bilgi ve tecrübeleriyle, yüksek lisans eğitimimde büyük emeği geçen kıymetli hocalarım Yrd.Doç.Dr. Erkan RAYAMAN, Yrd.Doç.Dr. Pervin RAYAMAN ve Öğr.Gör.Dr. Burçak GÜRBÜZ'e,

Yüksek lisans tez çalışmamda desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Yrd.Doç.Dr. Cenk SESAL ve öğrencisi Buse BERBER'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni anlayış ile karşılayıp destek olan tüm iş arkadaşlarıma,

Birlikte çalışmaktan sonsuz mutluluk duyduğum tüm yüksek lisans arkadaşlarıma,

Ve her zaman yanımda olup bana en büyük desteği veren canım annem, canım babam ve tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışması Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (SAG-YLP -110215-0026) tarafından projelendirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	vi
TABLoların LİSTESİ.....	vii
RESİMLERİN LİSTESİ	viii
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. <i>Helicobacter pylori</i> ve Tarihçesi	4
4.1.1. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin genel özellikleri.....	6
4.1.2. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin doğal ortamı	7
4.1.3. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin kültür, üreme ve biyokimyasal özellikleri	7
4.1.4. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin epidemiyolojisi.....	9
4.1.5. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin mideye yerleşimi	9
4.1.6. <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonları	10
4.1.7. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin bulaşma yolları.....	12
4.1.8. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin tanı yöntemleri	13
4.1.9. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin tedavisi	13
4.1.9.1. Tedavide kullanılan ilaçlar	14
4.1.9.1.1. Tedavi şeması	14
4.1.9.2. Antibiyotik duyarlılığı.....	15
4.2. Kitin ve Kitosan.....	17
4.2.1. Kitinden kitosan elde edilmesi.....	18
4.2.2. Kitosanın genel özellikleri	19
4.2.3. Kitosanın kullanım alanları.....	20
4.2.4. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi.....	24
4.2.4.1. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesine etki eden parametreler	24
4.2.4.1.1. Molekül ağırlığı	25
4.2.4.1.2. Deasetillenme derecesi (DD).....	25
4.2.4.1.3. pH	26
4.2.4.1.4. Sıcaklık	26

4.2.5. Suda çözünen kitosan / Karboksimetil kitosan	27
4.3. Antibiyotikler	27
4.3.1. Klaritromisin	27
4.3.1.1. Klaritromisinin etki spektrumu	28
4.3.2. Metronidazol	29
4.3.2.1. Metronidazolün etki spektrumu	29
5. GEREÇ ve YÖNTEM	31
5.1. Gereçler	31
5.1.1. Mikroorganizmalar	31
5.1.2. Besiyerleri	31
5.1.3. Çözeltiler	31
5.1.4. Boyalar	32
5.1.5. Antibiyotikler	32
5.1.6. McFarland bulanıklık tüpleri	33
5.1.7. Kimyasal maddeler	33
5.1.8. Kullanılan araç ve gereçler	34
5.2. Yöntemler	35
5.2.1. Mikroorganizma kültürü ve biyokimyasal özellikleri	35
5.2.1.1. Kanlı agarda hemoliz tespiti	35
5.2.1.2. Gram boyama	35
5.2.1.3. Katalaz deneyi	36
5.2.1.4. Oksidaz deneyi	36
5.2.1.5. Üreaz deneyi	36
5.2.2. Stok <i>Helicobacter pylori</i> suşunun canlandırılması	37
5.2.3. Kitosanların hazırlanması	37
5.2.4. Antibiyotik çözeltilerinin hazırlanması	37
5.2.5. Antimikrobiyal etkinin saptanması	38
5.2.5.1. Oluk difüzyon yöntemi	38
5.2.5.2. Agar dilüsyon yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) tayini	38
5.2.5.3. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) tayini	39
6. BULGULAR	41

6.1. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin mikroskop görüntüsü, koloni morfolojisi ve biyokimyasal özellikleri	41
6.2. Oluk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinin saptanması	44
6.3. Agar dilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinin saptanması.....	46
6.4. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinin saptanması.....	49
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
8. KAYNAKLAR	60
9.EK	66
10.ÖZGEÇMİŞ	67

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

Da: Dalton

DD: Deasetillenme Derecesi

HCl: Hidroklorik Asit

H₂O₂: Hidrojen peroksit

H₂RA: H₂ Reseptör Antagonisti

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu – (International Agency for Research on Cancer)

L: Litre

MALT: Mucosa-associated lymphoid tumors

MHA: Mueller Hinton Agar

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

mL: Mililitre

µm: Mikrometre

mm: Milimetre

NaOH: Sodyum Hidroksit

NIH: National Institute of Health

NSAID: Nonsteroid Anti İnflamatuar İlaç

PMN: Polimorfonükleer

PPI: Proton Pompa İnhibitörü

SF: Serum fizyolojik

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 1: <i>Helicobacter pylori</i>	6
Şekil 2: <i>Helicobacter pylori</i> 'nin üreaz enziminin midedeki aktivitesi.....	10
Şekil 3: <i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunun doğal gelişimi.....	12
Şekil 4: (a) selüloz, (b) kitosan, (c) kitin'in kimyasal yapısı.....	18
Şekil 5: Karboksimetil kitosanın kimyasal formülü.....	27
Şekil 6: Klaritromisin'in kimyasal formülü.....	28
Şekil 7: Metronidazolün kimyasal formülü.....	29

TABLULARIN LİSTESİ

Tablo 1: <i>Helicobacter pylori</i> tanısında kullanılan testler.....	13
Tablo 2: Kitin, kitosan ve türevlerinin uygulama alanları.....	21
Tablo 3: Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan ve asetik asitin <i>H.pylori</i> ATCC 43504 suşu üzerine oluk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi.....	45
Tablo 4: Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan ile klaritromisin ve metronidazolün <i>H.pylori</i> ATCC 43504 suşu üzerine antimikrobiyal aktivitesi.....	47
Tablo 5: Karboksimetil kitosanın agar dilüsyon yöntemi ile <i>H.pylori</i> ATCC 43504 suşu üzerine antimikrobiyal aktivitesi.....	47
Tablo 6: Karboksimetil kitosanın agar dilüsyon yöntemi ile <i>E.coli</i> ATCC 11229 suşuna etkili olduğu MİK değeri	48
Tablo 7: Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan ile asetik asitin <i>H.pylori</i> ATCC 43504 suşu üzerine sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi.....	49
Tablo 8: Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosanın MİK değeri ve asetik asitin <i>E.coli</i> ATCC 11229 suşu üzerine antimikrobiyal aktivitesi.....	51

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 1: <i>Helicobacter pylori</i> 'nin ışık mikroskobu görüntüsü.....	41
Resim 2: <i>Helicobacter pylori</i> 'nin kolonilerinin görünümü.....	42
Resim 3: <i>Helicobacter pylori</i> 'nin hemoliz aktivitesi.....	42
Resim 4: <i>Helicobacter pylori</i> 'nin katalaz aktivitesi.....	43
Resim 5: <i>Helicobacter pylori</i> 'nin oksidaz aktivitesi.....	43
Resim 6: <i>Helicobacter pylori</i> 'nin üreaz aktivitesi	44
Resim 7: Kitosanın <i>H.pylori</i> ATCC 43504 üzerine etkisi.....	45
Resim 8: %0,5 asetik asitin <i>H.pylori</i> ATCC 43504 üzerine etkisi.....	46
Resim 9: Karboksimetil kitosanın <i>E.coli</i> ATCC 11229 üzerine etkisi.....	48
Resim 10: Kitosanın <i>H.pylori</i> ATCC 43504 üzerine etkisi.....	50
Resim 11: Asetik asitin <i>H.pylori</i> ATCC 43504 üzerine etkisi	50
Resim 12: Kitosanın <i>E.coli</i> ATCC 11229 üzerine etkisi.....	52
Resim 13: Kitosanın <i>E.coli</i> ATCC 11229 üzerine etkisi.....	52
Resim 14: Asetik asitin (%1) <i>E.coli</i> ATCC 11229 üzerine etkisi.....	53

Klaritromisin ve Metronidazol' ün Farklı Molekül Ağırlıklı Kitosan ile Kombinasyonunun *Helicobacter pylori* Üzerine Antimikrobiyal Aktivitesi

Öğrencinin Adı: Hatice Merve Altındağ

Danışman: Prof.Dr. Ümran Soyoğul Gürer

Anabilim Dalı: Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Dünyada en yaygın görülen enfeksiyon etkenlerinden biri olan *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) midede yerleşmekte ve ülserden kansere kadar ulaşabilen klinik tablolara neden olabilmektedir. Kitosan, kitinin deasetillenmesi sonucu elde edilen bir polisakkarittir. Çalışmamızda düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan ile karboksimetil kitosanın *H.pylori* ATCC 43504 standart suşu üzerine antimikrobiyal aktivitesinin olup olmadığı araştırılmıştır. Kontrol olarak *Escherichia coli* (*E.coli*) ATCC 11229 standart suşu, klaritromisin ve metronidazol kullanılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan, karboksimetil kitosan, klaritromisin ve metronidazol'ün *H.pylori* ATCC 43504 ve kontrol suşu *E.coli* ATCC 11229 üzerine antimikrobiyal aktivitesi oluk difüzyon, agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerilerine uygun olarak araştırılmıştır.

Bulgular: Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosanlar ile yapılan oluk difüzyon testinde inhibisyon zonu, agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon testlerinde MİK değeri saptanamamıştır. Agar dilüsyon yöntemi ile klaritromisin MİK değeri 0,015 µg/mL, metronidazol MİK değeri 64 µg/mL olarak bulunmuştur. Karboksimetil kitosan + klaritromisin, karboksimetil kitosan + metronidazol kombinasyonlarının antagonist etki gösterdiği saptanmıştır. Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan ile karboksimetil kitosanın kontrol *E.coli* ATCC 11229 suşuna karşı MİK değerleri sırasıyla 1000 µg/mL, 1000 µg/mL ve 40 000 µg/mL olarak bulunmuştur.

Sonuçlar: Kontrol suşu *E.coli* ATCC 11229 üzerine antimikrobiyal etki gösteren kitosanların tek başına ve çalışmada kullanılan antibiyotikler ile kombinasyonlarının *H.pylori* ATCC 43504 suşu üzerine antimikrobiyal aktivite göstermediği görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: *Helicobacter pylori*, Kitosan, Klaritromisin, Metronidazol, Antimikrobiyal Aktivite

The Antimicrobial Activity of Clarithromycin and Metronidazole in Combination with Various Molecular Weight Chitosan on *Helicobacter pylori*

Student's Name: Hatice Merve Altındağ

Supervisor: Prof.Dr. Ümran Soyoğul Gürer

Department: Pharmaceutical Microbiology

2. SUMMARY

Aim: *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) which is one of the most common infectious agents in the world is located in the stomach and can cause a clinical picture from cancer to ulcers. Chitosan is a polysaccharide obtained by deacetylation of chitin. In our study, it was investigated whether low and medium molecular weight chitosan, and carboxymethyl chitosan have an antimicrobial activity on the standard *H.pylori* strain ATCC 43504. *Escherichia coli* (*E.coli*) ATCC 11229 standard strain, clarithromycin and metronidazole were used as control.

Materials and Methods: The antimicrobial activity of low and medium weight molecules of chitosan, carboxymethyl chitosan, clarithromycin and metronidazole on *Helicobacter pylori* ATCC 43504 strain and control strain *E.coli* ATCC 11229 is investigated by well diffusion, agar dilution and broth microdilution method in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) proposals.

Results: Inhibition zone by well diffusion test and MIC values by agar dilution and broth microdilution tests with low and medium molecular weight chitosans were not detected. In the agar dilution test MIC value for clarithromycin was found to be 0,015 µg/mL and for metronidazole was found to be 64 µg/mL. It was determined that carboxymethyl chitosan + clarithromycin, carboxymethyl chitosan + metronidazole combinations have shown antagonistic effect. The MIC values of low and medium molecular weight chitosan and carboxymethyl chitosan towards *E.coli* ATCC 11229 strain were 1000 µg/mL, 1000 µg/mL and 40 000 µg/mL respectively.

Conclusion: It was found that chitosans which have antimicrobial effect on control strain *E.coli* ATCC 11229 have not shown antimicrobial activity on *Helicobacter pylori* ATCC 43504 strain alone and in combinations with the antibiotics used in our study.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Chitosan, Clarithromycin, Metronidazole, Antimicrobial Activity.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Helicobacter pylori, dünyada en yaygın görülen enfeksiyon etkenlerinden biridir ve gastrit, ülser gibi hastalıklara neden olmaktadır. Midede üreyerek ülser ve reflüye neden olan *H.pylori* enfeksiyonu ilerleyen aşamalarda mide kanseri gibi ciddi mortalite nedeni olan birçok hastalığın gelişimine neden olmaktadır. Bu neden ile 1994 senesinde Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu – IARC (International Agency for Research on Cancer) *H.pylori*'nin insanlar için kanserojen olduğunu duyurmuştur. Böylece ilk defa bir bakteri Tip I karsinojen olarak sınıflandırılmıştır (Yula, 2009). *H.pylori*'nin tedavisinde kullanılan mevcut ilaçların dezavantajları (stabilitelelerinin sağlanamaması ve midede kalış süresinin az olması) ve kullanılan antimikrobiyallere karşı hızla artan direnç nedeni ile alternatif ilaç arayışları devam etmektedir (Kadioğlu, 2011). Gelişen ilaç direnci nedeniyle tedavide büyük sıkıntı yaşanmaktadır. En yaygın kullanılan tedavi, "iki antibiyotik (amoksisilin, klaritromisin) ve proton pompa inhibitöründen (omeprazol, lansoprazol) oluşan klasik 3'lü tedavi olarak isimlendirilen tedavi protokolüdür. Ancak son yıllarda kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen direnç nedeniyle tedavi başarısı giderek azalmaktadır. Tedavide yaşanan sıkıntılara ilave olarak hastalığın nüksetmesi durumu da söz konusudur (Akgüç, 2011).

Kitosan, kitinin deasetillenmesi ile elde edilen bir polisakkarittir ve doğada yaygın olarak bulunmaktadır (İmamoğlu, 2011). Kitinin molekül ağırlığı, 1 000 000 Dalton'dan (Da) yüksektir, ticari olarak satılan kitosanın molekül ağırlığı ise 100 000 – 1 200 000 Da arasında değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda kitosanın antimikrobiyal aktivitesi ile molekül ağırlığı arasındaki ilişkiyi destekleyen kesin bir veri bulunmamaktadır (Demir ve ark., 2008).

Çalışmamızda düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan ile karboksimetil kitosanın tek başına ve klaritromisin ve metronidazol ile kombinasyonlarının *Helicobacter pylori* ATCC 43504 ve kontrol *E.coli* ATCC 11229 standart suşları üzerine antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. *Helicobacter pylori* ve Tarihçesi

Helicobacter pylori ve diğer gastrointestinal *Helicobacter*'lerin çok eski zamanlardan günümüze kadar geldikleri, hatta yeryüzündeki ilk canlı organizmalar kadar eski oldukları düşünülmektedir. Neredeyse 100 milyon yıl kadar önce yani insanın evriminden önceki zamanlarda yaşayan ilk primatlar ve büyük memelilerin gastrointestinal sisteminin baskın flora üyesi olarak yerleştikleri tahmin edilmektedir (Yula, 2009).

1983'de Barry Marshall ve Robin Warren mideden alınan biyopsi örneklerinde *H.pylori*'nin üretildiğini bildirmişlerdir. Bu tarihe kadar bazı hayvan çalışmalarında spiral bakteriler saptanmış ancak mide asit ortamı nedeni ile steril kabul edildiği için birçok araştırmacı tarafından bakteriyel çalışmalar göz ardı edilmiştir (Arı, 2006).

Avrupa'da birçok patoloj 19. yüzyılın sonları ile 20. yy. başlarında gastrik mukozadaki spiral şeklindeki bakterileri tanımlamışlardır. Bottcher ve Letulle 1875'de, mideden aldıkları biyopsi örneklerinde ülserli bölgede gördükleri bakterilerin hastalık ile bağlantılı olabileceklerini iddia etmiş ve bu şekilde mide ülserinin bakteri kaynaklı olabileceği ilk defa ileri sürülmüştür. Klebs 1881'de midenin çeşitli kısımlarında *Bacillus* benzeri mikroorganizmaların varlığını gözlemlemiştir. Jaworski (1889), otopsi yapılan kişilerin mide yıkama sularında spiral şekilli mikroorganizmaları ayrıntılı olarak tanımlamış ve bunların diğer basillerden farklı şekilde düzenli sarmal formda olduklarını belirtmiştir. Sarmal şekilli bu bakteriye *Vibrio regula* adını vererek, gastrik patoloji ile ilişkili olduklarını söylemişlerdir. Bizzozero (1893) köpek midesinde spiral şekilli bakterilerin varlığını göstermiştir. 1893 senesinde tanımlanan bu organizma 1996 senesinde *Helicobacter bizzozeronii* olarak isimlendirilmiştir. Salomon (1896) kedi ve köpeklerin midesinde kolonize olan spiral bakterilerin farelere transferini gerçekleştirmiş ve günümüzde çalışmaları devam eden aşı çalışmalarına öncü olmuştur. Krienitz (1906) yaptığı çalışmalarda gastrik karsinomlu hastaların mide biyopsi örneklerinde spiral şekilli

organizmaların varlığını göstererek Jaworski'nin hipotezini desteklemiştir. Doenges (1938) bu spiral bakterilerin otopsi yapılan insanların %40'ının midesinde bulunduğunu ve buna ilave olarak *Macacus* maymunlarında da var olduğunu bildirmiştir. Freedberg ve Baron (1940) peptik ülserli ya da karsinomlu hastalardan aldıkları biyopsi örneklerinin % 37'sinde benzer spiral mikroorganizmaların gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Ancak tüm bu çalışmalar sadece hipotez olarak kalmıştır (Yula, 2009).

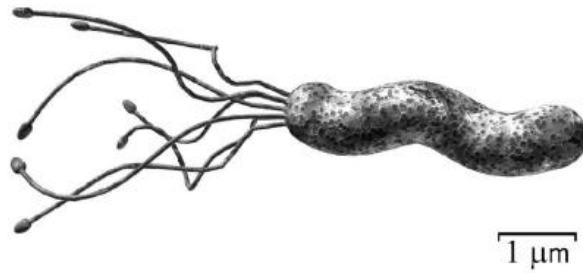
Helicobacter pylori'nin sahip olduğu üreaz enzimi ise ilk kez Luck ve Seth tarafından 1924 yılında tanımlanmıştır. Kornberg ve Davies 1955'de, gastrik üreaz aktivitesinin genellikle korpuse yerleşmiş olan bakterilerden kaynaklandığını göstermişlerdir. Steer ve Collin-Jones 1975'de, mide ülseri olan hastaların mide mukozalarından alınan biyopsi örneklerinde bakteri varlığını göstermiş ve bu bakterilerin mukozal direnci kırarak ülseri neden olabileceğini belirtmişlerdir. Ancak bakteriyi üretmedikleri için konu tartışmalı kalmıştır. Warren, 1980'lerde, Avustralya'da aktif gastrit hastası 135 kişinin mide mukozasında, *Campylobacter jejuni* gibi spiral şekilli basillerin varlığını göstermiş, 1982 senesinde ise Warren ve Marshall, seçici *Campylobacter* besiyerine ve seçici olmayan besiyerlerine biyopsi örneklerini ekerek bakteriyi izole etmeyi başarmışlardır. İlk olarak *Campylobacter* benzeri mikroorganizma olarak adlandırılan bu mikroorganizma, daha sonraları öncelikle antrumda yerleşmesinden dolayı *Campylobacter pylori* olarak adlandırılmıştır. Ancak bulunan bu mikroorganizmada enzimatik ve fonksiyonel yönlerden farklı özelliklerinin saptanması nedeniyle helikal görünümünden dolayı *Helicobacter pylori* adı verilmiştir (Arı, 2006).

Helicobacter pylori'nin gastroduodenal hastalıklarla bağlantısının gösterilmeye yönelik çalışmalar, bakterinin gastrik kolonizasyonu ile birlikte MALT (mucosa-associated lymphoid tumors) lenfoma ve gastrik adeno karsinomlar arasındaki ilişkiye dikkat çekmiştir. Eradikasyon tedavisi ardından MALT lenfoma olgularında 1991'de yapılan değişik çalışmalarda remisyon gösterilmiştir. Bu bulguların ışığında, IARC 1994 senesinde *H.pylori*'yi insanlar için kanserojen olarak duyurmuş ve ilk defa bir bakteri Tip I karsinojen olarak sınıflandırılmıştır. Yine 1991 senesinde

National Institute of Health (NIH) konsensusunda *H.pylori*'nin peptik ülserin en önemli etkeni olduğu bildirilmiştir (Yula, 2009).

4.1.1. *Helicobacter pylori*'nin genel özellikleri

Helicobacter pylori, kısa sarmal yapıda ("S" harfi gibi), katalaz, oksidaz, üreaz aktivitesi gösteren, 0,5-0,9 x 3 µm boyutlarında, kamçılı, sporsuz bir bakteridir (Şekil 1) (Altındış ve Özdemir, 2003). Normal şartlarda spiral formdadır. Ancak üremenin uygun olmadığı stres koşullarında yuvarlak ve düzensiz basil şeklinde görülür (Arı, 2006). Hücre duvarının yapısında bulunan lipopolisakkaritlerdeki karbon yan zincirleri sayı ve yapı bakımından diğer gram negatif bakterilerden farklıdır. Buna karşın *Helicobacter*'ler gram negatif basillerdir. *H.pylori* sayısı yediye kadar varabilen, unipolar, kılıflı kamçıya sahiptir (Akgüç, 2011). Kamçısı sayesinde gastrik mukus gibi vizkoz ortamda tirbişon benzeri hareket gerçekleşir. Bu kamçı kılıfının hücre duvarının dış membranının devamı olduğu elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Yula, 2009). *H.pylori* zorunlu mikroaerofildir, üremesi için ortamada bulunması gereken optimum oksijen konsantrasyonu % 2-8'dir (Arı, 2006).



Şekil 1: *Helicobacter pylori* (Akgüç, 2011).

4.1.2. *Helicobacter pylori*'nin doğal ortamı

Helicobacter'ler çoğunlukla insanlarda mide veya bağırsak mukozasına yerleşir. Bunun yanı sıra birçok küçük kemiricinin, köpeklerin, kedilerin, koyunların, sığırların ve kuşların gastrointestinal sistemine de yerleşebilirler. İnsanlarda mide ve bağırsak mukozası dışında kolonizasyonuna çok nadir olarak rastlanır. Buna karşın *H.pylori*'nin tükürük, diş plağı ve atardamar plaklarında görüldüğü bildirilmiş. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar ile de safra taşlarının oluşumu ile ilişkili oldukları ispatlanmıştır. *Helicobacter pullorum* ve *Helicobacter cholecystus*'un da karaciğer ve safra yollarına yerleşebildiği ileri sürülmüştür (Suzuki, 2008). *H.pylori* ve diğer gastrik *Helicobacter* türleri için en önemli doğal yaşam ortamı mide mukoza yüzeyidir. Bakteri gastrik mukozayı kaplayan mukus tabakasının asit yoğunluğundan etkilenmez, ancak mukozal yüzeydeki nötr mukusa kadar gelip, özellikle alkali mukus salgılayan antruma yerleşir. Fakat artmış asit salgısının neden olduğu gastrik hücre metaplazili alanlarda da kolonize olabilir (Kadioğlu, 2011).

4.1.3. *Helicobacter pylori*'nin kültür, üreme ve biyokimyasal özellikleri

Zenginleştirilmiş besiyerinde dahi son derece zor ve yavaş üreyen bir mikroorganizma olan *H.pylori* adi besiyerlerinde üretilemez (Kadioğlu, 2011).

Üremenin sağlanması için çikolata agar, Columbia agar, Brucella agar, beyin kalp infüzyon agar gibi besiyerlerinin içerisine % 5-10 oranında koyun kanı, % 0,25 maya ekstraktı gibi ilaveler yapılarak kullanılmalıdır. Bunun yanında üremeyi arttırmak için besiyeri içerisine hemin, serum, nişasta, kömür ilavesi de yapılabilir. *H.pylori* asit ortamına rağmen mukozaya kolonize olarak üremesine karşın aside dayanıklı değildir. Bakteri oldukça geniş pH (5-8) aralığında üreyebilir, fakat optimum üremenin sağlandığı pH aralığı 6,9 ile 7,6 arasındadır. Ancak güçlü üreaz aktivitesi ve kısa sürede hücre membranında yaptığı adaptif değişiklikler ile midede özellikle pH'ın 1-1,5'a kadar düştüğü parietal hücrelerin yer aldığı oksintik kanalların içerisinde de üreyebilir. *In vitro* şartlarda üremesi için uygun zenginleştirilmiş besiyerleri hazırlandığında optimal üremenin sağlanabilmesi için besiyeri pH'sının 7,2 olması gerekir (Yula, 2009).

Helicobacter pylori mezofilik bir bakteridir ve mikroaerobik koşullar sağlandıktan sonra üremesi için optimum 37°C, minimum 30°C sıcaklık gereklidir. Çok az suşu 42°C'de üreyebilir, 25°C'de üreme yeteneği yoktur. *H.pylori*'nin 4°C'de 14 gün, 25°C'de 2 gün, 40- 42°C'de 1 günden az canlı kaldığı bildirilmiştir (Hancıoğlu Sıkılı ve Karapınar, 2001).

Güçlü katalaz, oksidaz, peroksidaz, superoksit dismutaz ve sitokrom oksidaz aktivitesine sahip olmasına rağmen, hiçbir *Helicobacter* türü aerobik atmosferde üreyemez. *Helicobacter gammani* dışında diğer *Helicobacter* türlerinin üremesi için %5 ile %10 oranları arasında CO₂ içeren mikroaerobik atmosfer gereklidir. *In vitro* üremede en iyi verimi almak için ortamda bulunması gereken oksijen konsantrasyonu %2 ile %8 arasında olmalıdır (Yula, 2009).

Üremenin sağlanabileceği zenginleştirilmiş besiyerlerine ekilen bakteri, uygun atmosfer ve sıcaklık şartlarında inkübasyonun ardından, ekimden sonraki 3. 5. ve 7. günlerde üreme kontrolü yapılması gereklidir. Üremede en iyi netice inkübasyonun 5. gününden sonra elde edilir. İnkübasyon döneminin sonunda besiyerleri üzerinde su damlasına benzeyen, düzgün kenarlı, saydam, çapı 0,5-2 mm arasında koloniler oluşturduğu görülür. İnkübasyon süresi 7 günden fazla süren besiyerlerinde koloni çapları 2 mm'nin üzerine çıkabilir. Kanlı (%5) agarda zayıf hemoliz yapar. Şüpheli koloniler için Gram boyama ile mikroskopik morfolojik özellikleri kontrol edilip bunun ile birlikte oksidaz, katalaz ve üreaz aktivitelerine bakılarak ön tanımlama yapılmalıdır (Kadıoğlu, 2011).

Helicobacter pylori in vitro şartlardaki 3-4 pasajın ardından canlılığını yitirir. *H.pylori* izolatları %20 gliserol ilave edilen Beyin Kalp İnfüzyon Buyyon (BHIB - Brain Heart Infusion Broth) içerisinde ya da skim milk içerisinde -80°C'de veya liyofilize halde +4°C'de saklanabilirler (Kadıoğlu, 2011).

4.1.4. *Helicobacter pylori*'nin epidemiyolojisi

Helicobacter pylori omurgalı canlıların midesindeki zor şartlarda yaşamaya uyum sağlayabilmiş ilgili bakteriler içerisindeki en çok görülen bakteridir (Akgüç, 2011).

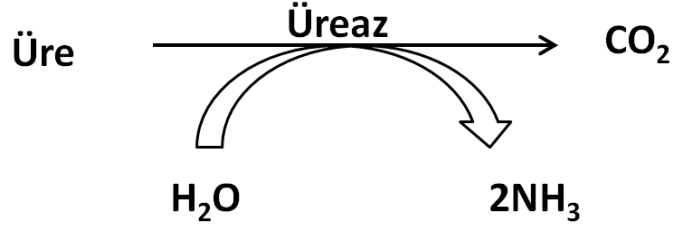
Helicobacter pylori'nin doğal kaynağı bilinmemektedir. İnsan dışı rezervuar kesin olarak gösterilmemiştir. Ancak yaygın kabul enfeksiyon kaynağının insan olduğu doğrultusundadır (Yılmaz ve Okçu, 2006).

Günümüzde dünya nüfusunun yaklaşık olarak yarısının *H.pylori* ile enfekte olduğu kabul edilmektedir (Martínez ve ark., 2016). *H.pylori*'nin prevalansı yaş, ülke ve sosyo-ekonomik koşullara göre değişmektedir (Lehours ve ark., 2015). Bazı ırk ve etnik grupların prevalansının fazla olması genetik yatkınlık olabileceğini düşündürmüştür ancak bu genetik yatkınlığın kesin olarak nedeni belirlenememiştir. Bakterinin kolonizasyonunda cinsiyete dayalı bir ayrım bildirilmemiştir. Ancak bakteri ile enfekte olunan çocukluk çağındaki sosyo-ekonomik koşullar ile prevalans arasında kesin bir ilişki vardır. Avrupa ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ülkelerde çocukluk çağındaki bireylerin %0-5'i, yirmili yaşlardaki bireylerin %10-20'si, yetişkin bireylerin ise %30-50'sinin *H.pylori* ile enfekte olduğu bildirilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde 5 ile 10 yaş arasındaki bireylerde prevalans %60-70 iken yetişkin bireylerde %85-90 arasında olduğu bildirilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde prevalansın yüksek olma nedeni sosyo-ekonomik koşulların yetersizliği ve sağlıklı yaşam koşullarının sağlanamamasından kaynaklanmaktadır (Tünger, 2008).

4.1.5. *Helicobacter pylori*'nin mideye yerleşimi

Helicobacter pylori'nin dış yüzeyi adezyon molekülleri ile kaplıdır. Bu moleküller bakterinin gastrik epitel hücrelerindeki özel reseptörlere tutunmasını sağlar. Bu nedenle bakteri yalnızca mide epiteli olan bölgelere tutunabilmektedir. *H.pylori* gastrik mukusun altında mideyi saran mukus salgılayan epitel hücrelere tutunarak yaşar. Midenin asit ortamı mikroorganizmaların yaşamını genelde

engeller. Midenin bu asidik ortamında yaşayabilecek şekilde gelişen tek organizma *H.pylori*'dir. *H.pylori*'nin sahip olduğu üreaz enzimi midedeki üreyi amonyağa çevirerek mide asiditesinin nötralize edilmesini sağlar ve böylece bakterinin hayatta kalabilmesi için daha uygun bir pH sağlamış olur (Şekil 2) (Akgüç, 2011).



Şekil 2: *Helicobacter pylori* 'nin üreaz enziminin midedeki aktivitesi

Mide içine sürekli eski mukus tabakalarının atılması söz konusudur. Ancak *H.pylori* tirbüşon benzeri hızlı hareketiyle buna zıt yönde hareket ederek epitelyum hücrelerine ulaşmaya çalışıp yeni tabakalara tutunabilmektedir. Epitel hücrelerine ulaştığında, tutunabilmesi için dış membran proteinleri ve diğer faktörler rol oynar (Demiray Gürbüz ve Yılmaz, 2011).

4.1.6. *Helicobacter pylori* enfeksiyonları

Helicobacter pylori enfeksiyonunun neden olduğu klinik tablolar asemptomatik kolonizasyondan, mide kanserine kadar değişen geniş bir yelpaze göstermektedir (Şekil 3).

Akut enfeksiyon: Akut enfeksiyon asemptomatiktir.

Gastrit: *Helicobacter pylori* ile enfekte kişilerin tümünde gelişir. Gastritin olduğu bölge ve meydana gelen zararın şiddetine bağlı olarak duodenum ülseri, gastrik ülser, atrofik gastrit, mide kanseri, MALT gibi patolojiler meydana gelir.

Gastrik ülser: *Helicobacter pylori* kolonizasyonu duodenal ülserli hastalara göre daha azdır. Çeşitli ilaç kullanımları gastrik ülseri neden olmak ile birlikte *H.pylori* ile enfekte olma ikincil etkidir.

Duodenal ülser: Hastaların %90'dan fazlası *H.pylori* ile kolonizedir. Gastrik ve duodenal ülser çoğunlukla peptik ülser olarak da isimlendirilir. Peptik ülser kronik rahatsızlıktır ve uzun seneler ataklar halinde seyrederek. Midede ağrı bu hastalıkta en karakteristik semptomdur. Kanama ve perforasyon gibi ciddi komplikasyonlar gelişebilir.

Gastrik karsinoma: Dünyada en sık görülen solid tümörler içerisinde ikinci sırada yer almaktadır. IARC 1994 senesinde *H.pylori*'yi Tip 1 karsinojen olarak bildirmiştir. Kanser gelişme riskinin *H.pylori* pozitif hastalarda diğer hastalara oranla dört kat fazla olduğu gösterilmiştir.

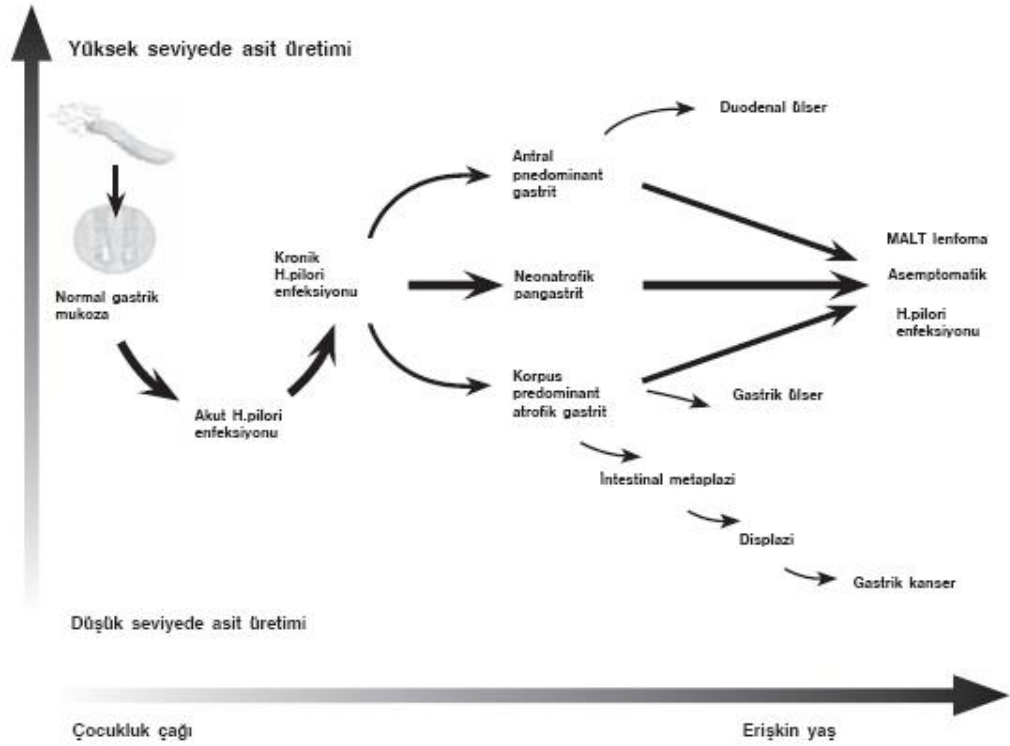
Gastrik lenfoma / MALT lenfoma: *H.pylori* enfeksiyonu ile bağlantılı olan ikinci tümöral oluşum, mide lenfomasıdır. MALT olan hastaların %72-98'inde *H.pylori* pozitif olarak saptanmıştır. MALT'ın *H.pylori* ile ilişkisi mide kanserinden çok daha belirgindir.

Bunların dışında gastro-özofageal reflü hastalığı ve fonksiyonel dispepsi hastalıklarında görülebilmektedir.

Ancak *H. pylori* ile ilişkilendirilen mide hastalıklarının patogenezi tam olarak açıklanamamıştır. *H.pylori* enfeksiyonunda farklı klinik tabloların oluşmasında; bakteriyel, konakçı ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimin rolü olduğu belirtilmiştir (Yılmaz ve Okçu, 2006).

Helicobacter pylori'nin mide dışı hastalıklar ile ilişkisini araştıran çok sayıda araştırma yapılmış ancak kesin sonuçlar bulunamamıştır.

Mide dışı hastalıklar: Raynaud fenomeni, koroner kalp hastalığı, diabetes mellitus, rozasea, demir eksikliği anemisi, pernisiyöz anemi, skleroderma, otoimmün trombositopenik anemi, ürtiker, migren, gıda alerjisi, tiroidit *H.pylori* ile ilişkili olduğu öne sürülen hastalıklardır. Fakat bu hastalıkların *H.pylori* ile ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır (Tünger, 2008).



Şekil 3: *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun doğal gelişimi (Tünger, 2008).

4.1.7. *Helicobacter pylori*'nin bulaşma yolları

Helicobacter pylori enfeksiyonunda genetik yatkınlık mevcuttur. Aile içi fertlerde bulaşma yakın temas ile olabilmektedir. Ancak seksüel aktivite bulaş yolları arasında değildir. Enfeksiyon; düşük sosyo-ekonomik gelir düzeyine sahip toplumlarda, etnik azınlıklarda, geniş ailelerde yaşayan fertlerde, çok kalabalık ortamlarda yaşayan çocuklarda sık görülür (Altındış ve Özdemir, 2003).

Helicobacter pylori'nin dental plak ve tükürükten de izole edildiği yapılan bazı çalışmalar ile gösterilmiştir. *H.pylori*'nin su kaynaklı enfeksiyonlarda görülmesi ve

feçesten izole edilmesi fekal-oral bulaş olduğunu doğrulamaktadır. Kedi ve evcil kümes hayvanlarıyla da bulaş söz konusu olabilir. Gastroenterolojistler ve endoskopistler mesleki risk grupları arasında gösterilmektedir. Bu meslek gruplarına ilave olarak son yıllarda diş hekimleri de mesleki risk grupları arasında sayılmaktadır (Altındış ve Özdemir, 2003).

4.1.8. *Helicobacter pylori*'nin tanı yöntemleri

Tanıda kullanılan testler, invaziv testler ve invaziv olmayan (noninvaziv) testler olarak iki gruba ayrılır (Tablo 1). Bu testler tek başına yapıldığında %100 olarak *H.pylori*'yi saptamak adına özgül ve duyarlı değildir. Mümkün ise tanı koyabilmek için testlerin ikili olarak kombine uygulanması önerilmektedir (Usta ve Özen, 2007).

Tablo 1: *Helicobacter pylori* tanısında kullanılan testler

İnvaziv olmayan testler	İnvaziv testler
Üre nefes testi	Üst gastrointestinal sistem endoskopisi
Fekal antijen testi	Üreaz testi
<i>H.pylori</i> serolojisi	Histopatoloji
	Kültür
	PCR

4.1.9. *Helicobacter pylori*'nin tedavisi

Helicobacter pylori aktif kronik gastrit, peptik ülser ve gastrik kanser gelişiminin önemli etiyolojik etkeni olmasının yanında MALT'a da neden olmaktadır. 1994 yılında IARC tarafından 'Tip I karsinojen' olarak açıklanması nedeni ile *H.pylori* tedavisi oldukça önem taşımaktadır. *H.pylori* tedavisinin temelini antibiyotikler oluşturmaktadır (Akgüç, 2011).

Helicobacter pylori ile enfekte kişilerin yalnızca %20'sinde klinik belirtilere rastlanmaktadır. Kesin olarak tedavi önerilen kişiler *H.pylori* ile enfekte olan peptik ülser hastası ve gastrik lenfoması olan bireylerdir. Aile özgeçmişinde mide kanseri olan kişilerde, uzun süre asit baskılayıcı tedavi alan bireylerde, kronik atrofik gastritte, gastrik mukozal displazide de tedavi önerilmiştir. Ancak kesin olarak tedavi gereklidir denilmemektedir. Buna karşın bazı araştırmacılar *H.pylori* ile enfekte olan tüm bireyler için, semptom olsun ya da olmasın tedavi edilmesini önermektedir (Akgüç, 2011).

4.1.9.1. Tedavide kullanılan ilaçlar

Helicobacter pylori enfeksiyonunun en iyi tedavi şeklini belirlemek oldukça güçtür. Tedavinin güç olmasındaki neden bakterinin canlılığını ilaçlar ile ulaşılması güç olan yerlerde de sürdürebilmesi ve kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirdiği dirençtir (Kadioğlu, 2011).

Helicobacter pylori enfeksiyonunda, nitroimidazoller (metronidazol, tinidazol, ornidazol), nitrofuran türevleri (furazolidon, nitrofuantoin), geniş spektrumlu penisilin türevleri (amoksisilin, ampisilin), tetrasiklinler (doksisiklin, tetrasiklin), makrolid (klaritromisin, eritromisin, roksitromisin) ve linkosamidler gibi çeşitli antibiyotik seçenekleri mevcuttur. Ancak sıklıkla tercih edilen antibiyotikler metronidazol, klaritromisin, amoksisilin ve tetrasiklidir. Bu antimikrobiyal ajanlar tek olarak kullanıldığında eradikasyon oranı hayli düşüktür. Bu nedenle bizmut tuzları, proton pompa inhibitörleri (PPI) (omeprazol, lansoprazol) veya H₂ antagonistleri (ranitidin, ebrotidin vb.) ile kombine olarak kullanılırlar (Akgüç, 2011).

4.1.9.1.1. Tedavi şeması

Günümüzde tek bir ilaç ile tedavi, bakterinin midede ilaçların ulaşması güç yerlerde canlı kalabilmesi ve kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı hızla geliştirdiği direnç gibi nedenlerden dolayı önerilmemektedir. Önceleri klaritromisin

ile yapılan monoterapilerde eradikasyon oranlarının %40 ile %50 arasında olduğu bildirilmiştir. Antibiyotik tedavisine ilave bir PPI veya bizmut tuzu eklenerek yapılan ikili tedavi ile de başarı oranlarının %20 ile %60 arasında olduğu ve bu tedavi sonrası sıklıkla nüks görüldüğü bildirilmiştir. Günümüzde eradikasyon için artık iki antibiyotiğe bir PPI veya bizmut tuzu eklenerek yapılan üçlü tedavi protokolü önerilmektedir. Uygulanan bu üçlü tedavi sayesinde eradikasyon oranı %90'ın üzerine çıkmıştır. Yapılan çalışmalarda 14 günlük tedavi süresi yeterli olduğu gösterilmiştir (Tünger, 2008).

Tedaviden yanıt alınamamasının başlıca nedenleri; ilaçların yan etkilerinden ya da hasta uyumsuzluğundan dolayı ilaçların gerektiği düzende alınmaması ve kullanılan antimikrobiyal ajana karşı bakterinin direnç geliştirmesidir. Tedaviye cevap alınmayan durumlarda direnç gelişimi göz önünde bulundurularak tedavi baştan düzenlenmeli ve yeni tedavi protokolünde farklı bir antibiyotik seçilmesine dikkat edilmelidir (Tünger, 2008).

Üçlü tedaviyle başarı sağlanamayan hastalarda dördü tedavi önerilmektedir. Bu tedavide PPI (veya H₂ reseptör antagonistleri [H₂RA]) + amoksisilin (veya metronidazol) + klaritromisin (veya tetrasiklin) + bizmut subsalisilat kullanılır. Bu dördü tedavi proton-pompa inhibitörlü kombinasyona 14 gün, H₂RA'li kombinasyona ise 28 gün devam etmek uygundur (Tünger, 2008).

4.1.9.2. Antibiyotik duyarlılığı

Helicobacter pylori in vitro şartlarda çoğu antibiyotikten etkilenmesine karşın sadece birkaç antibiyotik klinik olarak etkilidir. Metronidazol, tinidazol ve klaritromisin *H.pylori*'ye karşı tek başlarına kullanıldığı zaman organizma kısa bir zamanda direnç geliştirebilmektedir. *H.pylori* izolatlarının yaklaşık %50'sinin metronidazole direnç geliştirmesinden dolayı bu ilaç tedavide hemen hemen kullanılamaz hale gelmiştir (Akgüç, 2011).

Antibiyotiklere karşı olan dirençte klaritromisine karşı olan rezistansın rRNA

geninin 23. subunitindeki nokta mutasyona dayandığı anlaşılmıştır. Ancak metronidazol direncinin mekanizması çok iyi anlaşılmamış olsa da bakteriyel enzimin nitroredüktaz aktivitesinin inaktivasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Şimşek ve Kayahan, 2005).

Metronidazole direnç bölgelere ve ülkelere göre %15,9 ile %77,9 arasında değişiklik gösteren oranlardadır. Ülkemizde de metronidazol direncinin yüksek olması ilacın yaygın olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalar, metronidazol direncinin ülkemizde %36,4 ile %62,5 oranları arasında değişmekte olduğunu göstermektedir (Çağdaş ve ark., 2012).

Klaritromisin *H.pylori* eradikasyonunda en fazla tercih edilen antibiyotiktir; ancak günümüzde bu antibiyotiğe karşı da giderek artan direnç ile eradikasyon tedavisinin başarısını sınırlamaktadır. Klaritromisin direnci; Fransa'da 2003 senesinde yapılan bir çalışmada %30, Hindistan'da 2003 senesinde yapılan bir çalışmada %44,7, İngiltere'de 2005 senesinde yapılan bir çalışmada %11 ve Tayvan'da 2006 senesinde yapılan bir çalışmada %13,5 oranında saptanmıştır. Ülkemizde ise *H.pylori* suşlarında klaritromisine direnç oranı %18,7, %18,2 ve %54,5 olarak bildirilmektedir (Çağdaş ve ark., 2012).

Amoksisilin direnci ile ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur. Araştırmacılar *H.pylori*'de amoksisilin direnci ile ilgili bazı çalışmalarda direnç saptamazken, bazılarında %0,9, bazılarında ise %36,1 oranda direnç olduğunu bildirmiştir (Çağdaş ve ark., 2012).

Helicobacter pylori suşlarında tetrasiklin direnci ile ilgili yurt dışındaki yayınlarda %0 ile %6,9 arasında değişen oranlar bildirilmektedir. Ülkemizde yapılan iki farklı çalışmanın birinde tetrasiklin direnci %9,4 oranında saptanırken, diğer çalışmada direnç gözlenmemiştir (Çağdaş ve ark., 2012).

Tedavideki başarısızlıklar; hastanın yaşı, sigara kullanım alışkanlığı, tedavi öncesinde midedeki bakteri yükü, bakterinin genotipi, hastanın ilaç ile uyumu gibi

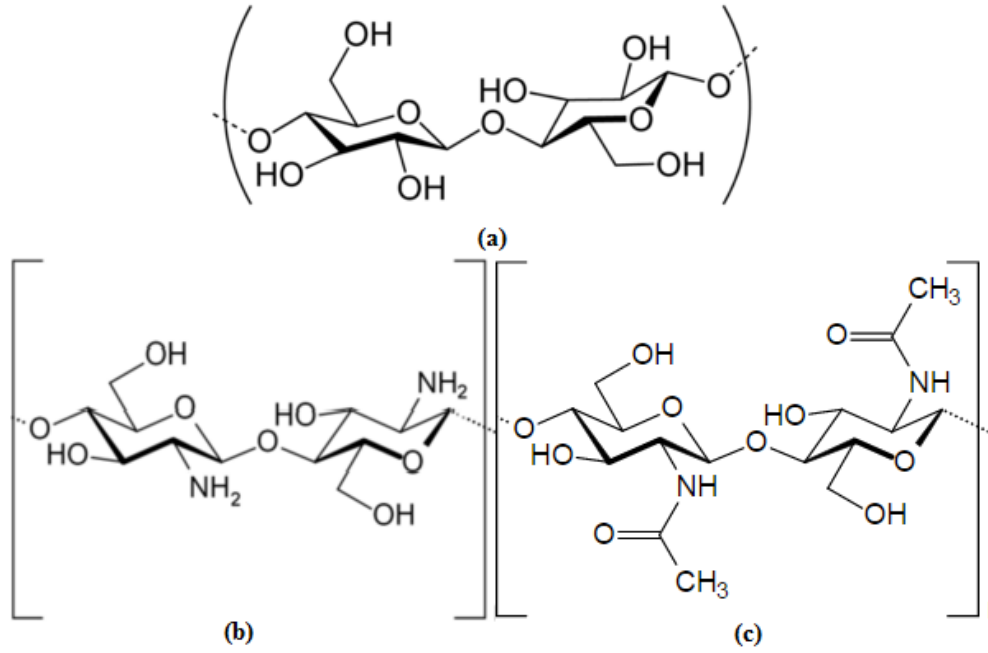
nedenlere bağlanmaktadır. Ancak tedavideki başarısızlıklarının en büyük nedeni tedavide ilk seçenek olan kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı gelişen dirençtir (Çağdaş ve ark., 2012).

4.2. Kitin ve Kitosan

Kitin ilk olarak 1811'de mantarın yapısında tespit edilerek tanımlanmış bir polisakkarittir. İsmi Yunanca'da zarf anlamına gelen "chiton" kelimesinden türemiştir. Yeryüzünde selülozdan sonra en fazla bulunan doğal biyopolimer olarak bilinmektedir (Kurt ve Zorba, 2005). Kitin; yengeç, istakoz ve karides gibi deniz kabuklularının dış iskelet yapılarından, böceklerden ve fungusların hücre duvarlarından elde edilmektedir (İmamoğlu, 2011).

Dünyadaki yıllık kitin üretimi yaklaşık 150×10^3 ton civarında olduğu belirtilmektedir. Bunun 56×10^3 tonu karidesten, 39×10^3 tonu çeşitli deniz kabuklularından, 32×10^3 tonu mantarlardan ve 23×10^3 tonu istiridyelerden elde edilmektedir. Karideste yaklaşık %32, böcek kabuklarında yaklaşık %23,5 yengeçte yaklaşık %17 oranında kitin bulunmaktadır (Demir ve Seventekin, 2009).

Kitosan, kitinin deasetillenmesi sonucu elde edilen katyonik bir aminopolisakkarittir (Jumaa ve ark., 2002). Kitosanın kimyasal yapısı; poli- $[\beta-(1,4)-2\text{-amino-2-deoksi-}\beta\text{-D-glukopiranoz}]$ şeklindedir (Wang ve ark., 2015). Kitin ve kitosan kimyasal yapı olarak selüloza benzerdir (Şekil 4). Ancak kendi aralarında birtakım farklılıklar gösterirler. Selülozdaki ikinci karbon atomuna hidroksil (-OH) grubu bağlıyken, kitinde asetamid (-NHCOCH₃), kitosanda ise amin (-NH₂) grubu bağlı bulunmaktadır (Demir ve ark., 2008).



Şekil 4: (a) selüloz, (b) kitosan, (c) kitin'in kimyasal yapısı

4.2.1. Kitinden kitosan elde edilmesi

Kitosan üretiminde kullanılacak su ürünlerinin kabukları öncelikli olarak kum ve diğer yabancı maddelerin uzaklaştırılması için iyice yıkanır. Daha sonra kabuk üzerinde kalmış doku kalıntılarının uzaklaştırılması için deproteinizasyon işlemi uygulanır. Bu işlem sırasında kabuklar % 3 NaOH ile 30 dakika kadar kaynatılır. Kaynatma işleminin ardından kabuklar soğutulurak hiçbir alkali kalıntısı kalmayacak şekilde su ile iyice durulanır. Bir sonraki işlem demineralizasyon işlemi olup kabuklara %3 HCl ile 30 dakika boyunca muamele edilmesinden ibarettir. Bu işlemin sonunda da kabuklar iyice yıkanır ve ardından su oranı % 6'ın altına düşecek şekilde preslenir. Tüm bu işlemlerin sonunda kitin elde edilmiş olur. Kitosan eldesi için kitin, asıl işlem olan deasetilasyon amacıyla kostik soda içinde 90-95°C'de 1,5 saat kadar ısıtılır. Ardından süzdürülür ve üzerinde alkali kalıntı kalmayacak şekilde su ile iyice yıkanır. Fazla su preslenerek uzaklaştırılır. Bu aşama sonucunda kitosanın yaş formu elde edilmiş olur. Yaş kitosan bir kurutucu içinde bekletilerek veya nem oranı %5'in altında olacak şekilde güneşte kurutulabilir. İnce tabakalar halinde elde

edilen kitosan toz haline getirilerek ardından paketlenir. Kuru ortamda 3 ay kadar saklanır. Bin gram kuru kabuktan yaklaşık 140 gram kitin, 100 gram kitosan elde edilebilmektedir. Ticari olarak satılan kitosanların asetilasyon derecesi %70'in üzerinde olup molekül ağırlıkları 100 000 ile 1,2 milyon Da arasında değişmektedir (Bostan ve ark., 2007).

4.2.2. Kitosanın genel özellikleri

Beyaz renkte, tatsız, kokusuz, yarı şeffaf, toz veya partikül şeklinde bir maddedir. Sindirim enzimlerine dayanıklıdır. Ancak bazı bakteriler kitosanı parçalayabilir. Suda çözünmez. Çözündürmek için asidik çözücüler (<6,0 pH) gereklidir ve genellikle asetik, formik, laktik gibi organik asitler kullanılır. İnorganik asitlerde çözünme sınırlıdır (%1 hidroklorik asitte çözünür; sülfürik ve fosforik asitte çözünmez). Çözünürlük özelliği; kitosanın elde edilme yöntemine, asetilasyon derecesine, molekül ağırlığına, sıcaklığa, pH'a, çözmek için kullanılan asitin özelliğine ve çözeltildeki iyon konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir (Erkan Koç ve Özkan, 2011). Kitosan solüsyonlarının stabilitesini pH'ın 7,0 ve üzerinde olması, oda sıcaklığında uzun süre muhafaza edilmesi gibi etkenler olumsuz etkilemektedir (Bostan ve ark., 2007).

Kitosanın yenilenebilir çevre dostu doğal bir biyopolimer olması en büyük avantajıdır. Bu özellikleri sayesinde kitosan son yıllarda pek çok farklı sektörde kullanım alanı bulmuştur. Yapılan *in vivo* testler kitosanın insan vücudu için bir yan etkisinin bulunmadığını göstermiştir (İmamoğlu, 2011). Ancak yapılan bazı çalışmalarda çok düşük toksisite oluşturabilmesine ilave olarak antioksidan ve antikanser aktivite gösterdiği de bildirilmiştir (Lee ve ark., 2014). Uzun süreli kitosan kullanımının bağırsağın mikrobiyal florası üstüne etkilerinden dolayı ayrıca koruyucu bir tedavi alınması gerektiği de gösterilmiştir. Buna ilave olarak kitosanın yağda eriyen vitaminlerin kaybına yol açabileceği, minarel emilimini azaltabileceği, kemik doku kaybına neden olabileceği de bildirilmiştir (Raafat ve Sahl, 2009).

4.2.3. Kitosanın kullanım alanları

Kitosan günümüzde tıp, gıda, ziraat, kozmetik, eczacılık, atık su arıtımı, tekstil sektörü gibi çok çeşitli alanlarda; biyolojik uyumluluğu, canlı doku ile reaksiyona girmemesi, patojen gelişimini azaltması gibi özellikleri nedeni ile kullanım alanı bulmaktadır (Tablo 2) (Beykia ve ark., 2014). Kitosan farklı ülkelerde büyük ölçüde kullanım alanı bulmasına rağmen ülkemizde kullanımını henüz çok yaygın değildir. Tekstil sanayiinde de birçok amaç için kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak kumaşa antimikrobiyal özellik katılması, yünlü kumaşlarda çekmemeyi sağlama, pamuğa asit boyar maddelerle boyanabilirlik kazandırma, antistatik özellik kazandırılma, reaktif boyamada tuz miktarını azaltma, deodorant maddesi olarak kullanılması sayılabilmektedir (Demir ve Seventekin, 2009).

Tablo 2: Kitin, kitosan ve türevlerinin uygulama alanları

UYGULAMA ALANI	KULLANIM
SU ARITIMI	Kirlenmiş atık sular için koagülasyon ve flokülasyon Atık sulardan metal iyonlarının uzaklaştırılması
ZİRAAT	Çimlenme hızını arttırmak Bitki patojenlerine karşı Bitki tohumu kaplaması Gübre yapımı Bitki katkı maddesi
BİYOTEKNOLOJİ	Kromatografik yöntemlerde Enzim immobilizasyonunda
GIDA	Doğal kıvam verici Yiyecek katkı maddesi Gıda paketleri / Koruyucu Filtreleme ve temizleme Hipokolesterolemik madde (zayıflama maddesi) Atık gıdaların tekrar işlenmesi
KOZMETİK	Saç şekillendirici yapımı Cilt nemlendirici kremlerde Antikolesterol ve yağ bağlayıcı madde olarak Deodorantlarda koku giderici madde
MEDİKAL ALAN	Yara bandı yapımında Sargı bezi yapımında Yanık tedavisinde (acıyı dindirme ve iyileştirme etkisi) Antikoagülan madde Hidrojel yapımı Antitrombojenik materyaller Hemostatik madde Kontakt lens yapımı İlaç kaplama maddesi

(İmamoğlu, 2011).

Kitin ve kitosanın yara iyileştirici özellikleri uzun süre araştırılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Kitosanın yara iyileşmesini hızlandırmadaki etkinliği vücuttaki yaraların iyileşme hızı yavaş olan hastalar için oldukça önemlidir. Kitosan heparin (- yüklü) ile polielektrolit kompleks oluşturma özelliğindedir ve bu sayede yara tedavisinde etkili rol oynamaktadır. Heparin, kanın pıhtılaşmasını önleyen bir polisakkarittir. Oluşan bu kitosan heparin kompleksi beraberinde artan hücre büyüme faktörleri ile doku gelişimi desteklenmektedir. Son senelerde, kitosandan elde edilen bandajlar bu nedenle daha fazla önem kazanmıştır (Demir ve Seventekin, 2009).

Kitosan, yara iyileşme sürecinde; polimorfonükleer (PMN) hücre ve makrofajların aktivasyonu, fibroblast aktivasyonu, sitokin üretimi, dev hücre göçü ve kollajen sentezinin uyarılması gibi aşamalarda önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermekte ve doku yenilenmesini uyarmaktadır. Yara iyileşme sürecinin önemli bir aşaması PMN göçüdür. Bu aşamada meydana gelen sorunlar yara iyileşmesinin gecikmesine ve bu gecikmeye bağlı olarak enfeksiyon oluşumuna neden olacaktır. Kitin ve kitosanın PMN aktivitesini arttırdığı hayvan deneyleri ile gösterilmiştir. Kitosanın büyük açık yaraların da iyileşmesine yardımcı olduğu hayvanlar üzerinde yapılan deneyler ile gösterilmiştir (Demir ve Seventekin, 2009).

Buna ilave olarak ilaçların kontrollü salınımı da son derece önemlidir. Biyolojik uyumluluk gösteren ve yenilebilen kitosan, ilaçlar için matriks olarak da kullanılabilir (Bie ve ark., 2013). İlaçlar kitosan matriksi içerisine film, mikrokapsül, kaplanmış tablet gibi çeşitli şekillerde yerleştirilmektedir. İlaçlar bunlardan farklı şekilde de kitosan içerisine hapsedilebilir. Jel oluşturabilme özelliği, kopolimer gibi çeşitli formlarda bulunabilmesi ilaç salım sistemlerinde büyük avantaj olmaktadır. Midede tahrişi engelleyen antiasit ve antiülser etkinliğe sahip olması da kitosani bu alanda ideal bir materyal haline getirmektedir (Demir ve Seventekin, 2009).

Kitosan film oluşturma özelliği ile yapay böbrek zarı yapımında da kullanılmaktadır (Demir ve Seventekin, 2009).

Ambalaj malzemesi olarak plastik kullanımı gıda korunması için etkilidir. Ancak; gıda güvenliği, tüketici sağlığı ve çevresel konusundaki endişeler nedeni ile yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilen doğal polimerlerden gıda ambalajı geliştirilmek için çok sayıda araştırma yapılarak paketlemelere doğal antioksidan ve antimikrobiyal etkinliği olan maddelerin dahil edilmesi üzerine odaklanılmıştır. Çeşitli bakteri ve mantar türleri üzerine antimikrobiyal aktivitesi bulunan ve biyofilm oluşturabilen kitosan gıda paketleme alanında da kullanım alanı bulmuştur (Wang ve ark., 2015). Japonya 1983, Kore 1995 yıllarından bu yana gıda katkı maddesi olarak kitosanı kullanmaktadır (Jeon ve ark 2014).

Azot içeriği bakımından zengin olması kitosanın şelat oluşturuğu ajan olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Özdemir, 2014).

Kitosan, zirai mücadelede sahip olduğu antifungal, antimikrobiyal, insektisidal özelliklerinden dolayı koruyucu olarak kullanılmaktadır (İmamoğlu, 2011).

Başta Japonya olmak üzere birçok Asya ülkesinde 1960'lı yılların ortalarından bu güne kadar kitosanın medikal tekstil alanında kullanımı ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış ve günümüzde yapılmaya devam etmektedir. Özellikle; medikal yapay deri, cerrahi dikiş ipleri, yapay kan damarları, kontrollü ilaç salımı, kontakt lens yapımı, yara bandı, sargı bezi yapımı gibi alanlarda da kitosan kullanılmaktadır (Demir ve Seventekin, 2009).

Kitosanın fonksiyonel gruplarının, kalsiyum esaslı birçok materyal ile bileşik oluşturabilme özelliği ile ortopedik ve periodontal uygulamalarda da kullanım alanı bulmuştur. Bu şekilde oluşturulan kitosan kalsiyum kompozitinin sert doku yerine kullanılabilirliğini araştırın çalışmalar devam etmektedir. Kalsiyum-kitosan esaslı bileşikler, kemik protezlerinde kaplama materyali olarak kullanılıp vücuda implante edilerek kemik hücrelerini güçlendirmektedir. Bir diğer kullanım alanı ise direkt kemik veya sert doku ile yer değiştirmesi şeklindedir. Ayrıca, kemikte zaman içerisinde oluşın aşınmalar neticesinde meydana gelen boşlukları doldurabilmektedir (Demir ve Seventekin, 2009).

Kısaca kitosan, bahsedilen bu antimikrobiyal aktivitesi, biyolojik uyumluluğu, farklı materyaller ile bileşik oluşturabilme yeteneği, hücresel tutunmaya ve çoğalmaya olanak sağlaması gibi özellikleri sayesinde pek çok farklı alanda kullanım olanağı bulmuştur (Demir ve Seventekin, 2009).

4.2.4. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi

Kitosan çeşitli bakteri ve mantar türlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Demir ve ark., 2008). Ancak antimikrobiyal aktivitesi tespit edilmesine rağmen, bu etki mekanizmasının nasıl çalıştığı henüz tam olarak belirlenememiştir (Gürel İnanlı ve Karaton Kuzgun, 2012).

Bu etkinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte çeşitli teoriler ileri sürülmüştür. Bunlardan ilki; kitosandaki pozitif yüklü amino ($-NH_3^+$) gruplarının bakterinin hücre membranı üzerindeki negatif yüklü karboksilat ($-COO^-$) gruplarını bağlaması sonucu hücre membranının işlevini bozup intrasellüler içeriğın dışarı sızmasına neden olması ve aynı zamanda besin elementlerinin hücreye girişinin inhibe edilmesidir. Diğer bir teori; şelat yapıcı bir ajan olarak rol oynayarak iz elementlere bağlanması ve bu suretle mikrobiyal gelişme ile toksin üretiminin inhibe edilmesidir. Bunlara ilave olarak su bağlayıcı ve enzim inhibitörü olarak çalışıp mikrobiyal gelişmeyi engellemesi, bakteri DNA'sına bağlanarak mRNA ve protein sentesizini durdurulması gibi etki mekanizmaları olduğu ileri sürülmüştür (Erkan Koç ve Özkan, 2011).

4.2.4.1. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesine etki eden parametreler

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesine etki eden değişkenler; deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, viskozite, çözünürlük ve renk şeklinde sıralanabilir (Bostan ve ark., 2007).

4.2.4.1.1. Molekül ağırlığı

Kitinin molekül ağırlığı, 1 000 000 Da'dan yüksektir. Piyasada satılan kitosanın molekül ağırlığı ise 100 000 – 1 200 000 Da arasında değişiklik göstermektedir. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi ile molekül ağırlığı arasındaki ilişki kesin olarak belirlenememiştir. Bu ilişkinin belirlenmesi için aynı veya çok yakın deasetilleme derecesine sahip ancak farklı molekül ağırlıkta çok sayıda kitosan ile çalışılması gerekmektedir. Kitosanın maksimum aktivite gösterdiği molekül ağırlığı hakkında şimdiye kadar yapılan çalışmalarda kesin bir kanıya ulaşılamamıştır (Demir ve ark., 2008).

Ortamda bulunan çözünmüş oksijen kitosanın parçalanmasına neden olmaktadır. Buna ilave olarak 280°C'nin üzerinde çok yüksek sıcaklıklarda da kitosan termal olarak parçalanmaya başlar. Dolayısı ile bu parçalanmalar sonucunda molekül ağırlığında da düşüş meydana gelmektedir (Özdemir,2014).

Antimikrobiyal aktivite haricinde diğer fiziksel aktivitelerinin ve fonksiyonel özelliklerinin de molekül ağırlığı ile ilgili olduğuna dair güçlü kanıtlar toplanmıştır. Kitosanın molekül ağırlığı birkaç farklı yöntem ile ölçülebilir. Bu yöntemler; spektrofotometre, jel geçirgenlik kromatografi, viskozimetri olabilir (Raafat ve Sahl, 2009).

4.2.4.1.2. Deasetillenme derecesi (DD)

Deasetillenme derecesi (DD) kitosanın antimikrobiyal aktivitesi ile doğrudan bağlantılıdır. DD'nin artması kitosanın molekül ağırlığı üzerindeki amin gruplarının artması anlamına gelmektedir. Bu artış ile, kitosan asidik koşullarda daha fazla sayıda protonlanmış amin gruplarına sahip olur ve bu sayede kitosanın mikroorganizmaların negatif yüklü hücre duvarı ile reaksiyona girme oranı artar (Demir ve ark., 2008).

Deasetilasyon derecesi kitosanın hazırlık aşamasından etkilenmektedir. Örneğin kitosanın üretim süresinin uzaması DD'ni etkilemektedir. DD'ni ölçmek için; FTIR spektroskopisi (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi / Fourier Transform Infrared Spectroscopy), UV spektrofotometresi, çeşitli titrasyon yöntemleri, element analizi, termal analiz gibi yöntemler kullanılabilir (Raafat ve Sahl, 2009).

4.2.4.1.3. pH

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesini etkileyen parametrelerden biri de pH değeridir. Yapılan incelemelerde, en iyi antimikrobiyal aktivitenin pH 5 civarında gerçekleştiği bildirilmiştir. pH arttıkça antimikrobiyal aktivite azalmaktadır. pH 9'da ise neredeyse hiç antimikrobiyal aktivite gözlemlenmemektedir (Demir ve ark., 2008).

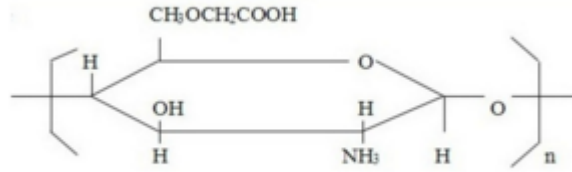
Farklı araştırmacılar ise kitosan suda çok az miktarda çözündüğü için pH 7'de herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediğini iddia etmişlerdir. Bu durum, kitosanın antimikrobiyal aktivitenin katyonik özelliğinden kaynaklandığı fikrini desteklemektedir (Demir ve ark., 2008).

4.2.4.1.4. Sıcaklık

Yapılan araştırmalar antimikrobiyal aktivitenin sıcaklık ile orantılı olarak değiştiğini göstermiştir. *E.coli* ile yapılan bir çalışmada 25°C'de 5 saatte ve 37°C'de 1 saatte mikroorganizmanın tamamen yok olduğu görülmüştür. Sıcaklık 4 ve 15°C olduğunda ise *E.coli* miktarı ilk 5 saatte bir miktar azalmış ancak ardından herhangi bir değişiklik olmamıştır. Araştırmacılar, antimikrobiyal aktivitedeki bu düşüşün nedeni olarak, kitosan ve hücre arasındaki etkileşimin daha düşük sıcaklıklarda azalmasından kaynaklandığını düşünmüşlerdir (Demir ve ark., 2008).

4.2.5. Suda çözünen kitosan / Karboksimetil kitosan

Seyreltik asitlerde çözünebilir kitosanın suda çözünebilir formda türevlerini elde etmek üzere yapılan çalışmalar sonuç vermiş olup kitosanın karboksimetil formu geliştirilmiştir (Şekil 5) (Demir ve Seventekin, 2009). Kitosan, N,O-karboksimetil kitosan ve O-karboksimetil kitosan ile yapılan çalışmalarda *E. coli* üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Venkatesan ve ark., 2014).



Şekil 5: Karboksimetil kitosanın kimyasal formülü (<http://www.scbt.com/datasheet-358091.html>, Erişim Tarihi:8 Mart 2016).

4.3. Antibiyotikler

4.3.1. Klaritromisin

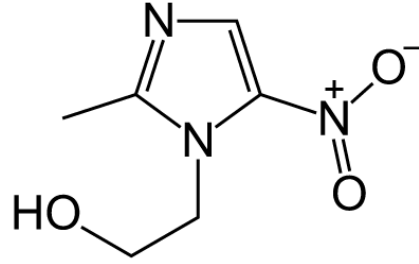
Makrosiklik lakton çekirdeği taşımaları nedeniyle makrolidler diye adlandırılan antibiyotik grubuna ait semi sentetik bir antibiyotiktir (Şekil 6). Makrolid antibiyotikler bakteri ribozomunun 50S alt birimindeki 23S birimine bağlanarak, bu bölgeye tRNA molekülünün bağlanmasını ve peptid zincirinin uzamasını engeller. Böylece bakteri protein sentezini inhibe ederler (Abbasoğlu ve ark., 2011).

Klaritromisin geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Gram pozitif ve gram negatif, aerob ve anaerob gibi çok çeşitli mikroorganizmalar üzerine bakteriyostatik etki göstermektedir

(http://www.mn.com.tr/tr/products/p_detail_Uniklar.aspx?productID=11, Erişim Tarihi:24 Ocak 2016).

4.3.2. Metronidazol

Anaerop bakteriler ve protozoalar için kullanılan 5-nitroimidazol türevi antimikrobiyal bir ajandır (Şekil 7). Bakteriyostatik etkilidir. Ticari olarak ilk defa 1960 yılında Fransa'da da kullanılmaya başlanmıştır (https://en.wikipedia.org/wiki/Metronidazole#Stevens.E2.80.93Johnson_syndrome, Erişim Tarihi:14 Ocak 2016). Metronidazolün nitro grubu, elektron transport zincirindeki flavoprotein gibi proteinlerden elektron alır ve elektron transport zincirinin normal döngüsünü engeller. Gebelerde de kullanılabilir ancak ilk trimester içerisinde kullanımı önerilmez (Abbasoğlu ve ark., 2011).



Şekil 7: Metronidazolün kimyasal formülü

(<https://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Metronidazol.svg>, Erişim Tarihi: 24 Ocak 2016).

4.3.2.1. Metronidazolün etki spektrumu

In vitro olarak birçok bakteriye etkilidir; *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides bivius*, *Bacteroides disiens*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius*, *Bacteroides oralis*, *Bacteroides oralis ovatus*, *Bacteroides oralis thetaiotaomicron*, *Bacteroides oralis ureolyticus*, *Bacteroides oralis vulgatus*, *Bacteroides oralis asaccharolyticus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter fetus*, *Gardnerella vaginalis*, *Fusobacterium* ve *Veillonella* gibi mikroorganizmalara karşı etili olduğu gözlemlenmiştir (<http://www.ilacrehberi.com/v/nidazol-500-mg-film-tablet-92b6/kub/farmakolojik-ozellikler/>., Erişim Tarihi:24 Ocak 2016).

In vitro çalışmalarda metronidazol mantarlara karşı etkisiz bulunmuştur (<http://www.ilacrehberi.com/v/nidazol-500-mg-film-tablet-92b6/kub/farmakolojik-ozellikler/>., Erişim Tarihi:24 Ocak 2016).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Mikroorganizmalar

Helicobacter pylori ATCC 43504 standart suşu

Escherichia coli ATCC 11229 standart suşu

5.1.2. Besiyerleri

Colombia Agar %5 Sheep Blood	BD
Brain Heart Infusion Agar	Merck
Brain Heart Infusion Broth	Oxoid
Mueller Hinton Agar	Merck
Urea Agar	Merck

5.1.3. Çözeltiler

Lugol çözeltisi:

I	5 g
KI	10 g
Distile su	100 mL

Magnezyum (Mg) stok çözeltisi:

MgCl ₂ .6H ₂ O	8,36 g
Distile su	100 mL

Kalsiyum (Ca) stok çözeltisi:

CaCl ₂ .2H ₂ O	3,68 g
Distile su	100 mL

5.1.4. Boyalar**Kristal viyole**

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

Bazik fuksin (stok)

Bazik fuksin	10 g
Etil alkol	100 mL

Sulu fuksin

Bazik fuksin (stok)	10 mL
Distile su	100 mL

5.1.5. Antibiyotikler

Klaritromisin	(Toprak İlaç ve Kim. Mad. San. ve Tic. A.Ş.)
Metronidazol	(Türktıpsan A.Ş.)

5.1.6. McFarland bulanıklık tüpleri

Standart bulanıklık elde etmek için laboratuvarımızda hazırlanan McFarland 2 standart tüpleri esas alınmış olup; McFarland 2, 0,2 mL %1 1,175 BaCl₂.2H₂O'ya 9,8 mL %1 H₂SO₄ ilave edilerek hazırlanmıştır (UMS AMD-TP-02 Sürüm 1, 2014).

5.1.7. Kimyasal maddeler

Düşük molekül ağırlıklı kitosan	(SIGMA)
Orta molekül ağırlıklı kitosan	(SIGMA)
Karboksimetil kitosan	(Santa Cruz)
Etil alkol (%96)	(Labkim)
İmmersiyon yağı	(Merck)
H ₂ O ₂ (%36)	(Merck)
MgCl ₂ .6H ₂ O	(SIGMA)
CaCl ₂ .2H ₂ O	(Merck)
BaCl ₂ .2H ₂ O	(Riedel-de Haen)
H ₂ SO ₄ (%96)	(Merck)
Kristal viyole	(Merck)
Asit-fenik kristali (fenol kristali)	(Merck)
Bazik fuksin	(SIGMA)
I	(SIGMA)
KI	(Riedel-de Haen)
Gliserol	(Merck)
N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendiamin	(SIGMA)
dihidroklorür	
Metanol	(SIGMA)
Dimetik Sülfoksit	(SIGMA)

5.1.8. Kullanılan araç ve gereçler

Mikroaerofilik Gas pack (Oxoid)

Anaerobik jar (Oxoid)

Kaba terazi (Kern 0,1 g)

Hassas terazi (Precisa XB220A 0,0001 g)

Mikroskop (Olympus CX21)

Karıştırıcı (IKA)

Buzdolabı (Arçelik)

Derin dondurucu (Uğur)

Otoklav (OT 4060 Nüve)

Pastör fırını (Electro-mag)

Su banyosu (Nüve ST 402)

Otomatik pipetler (2-20 µL, 10-200 µL, 100-1000 µL) (Rainin)

Steril pipetler (2, 5, 10 mL) (TPP)

Pastör pipeti (LP)

Lam (Isolab)

Enjektörler (2,5mL, 5mL, 10 mL) (Tibset)

Membran filtre (0.22-0.45 µm) (Whatman)

Petri kutuları (Isolab)

Otomatik pipet uçları (Isolab)

Mikroplak (Steril, 96 kuyucuklu, U tabanlı) (TPP)

5.2.Yöntemler

5.2.1. Mikroorganizma kültürü ve biyokimyasal özellikleri

Helicobacter pylori ATCC 43504 standart suşu %5 koyun kanlı agarda mikroaerofilik koşullarda (%10 CO₂, %5 O₂, %85 N₂), 37°C'de, 72 saat inkübe edilerek üretilmiştir. Üremesi için mikroaerofilik koşullar, anaerobik jar ve mikroaerofilik ortam sağlayıcı gas packler (Oxoid) ile sağlanmıştır. Primer izolasyon sonrasında maksimum 3 kez pasaj yapılmıştır. Üreyen yaklaşık 1-1,5 mm çapında, yuvarlak, dış bükey, şeffaf kolonilerden Gram boyama yapılarak mikroskopta ince kıvrık şekilli bakteriler incelenmiştir. *H.pylori* standart suşu %20 gliserol içeren Brain Hearth Infusion Broth (BHIB) içinde -80°C'de saklanmıştır.

5.2.1.1. Kanlı agarda hemoliz tespiti

Helicobacter pylori ATCC 43504 suşu koyun kanlı agara inoküle edilerek 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında mikroorganizmanın koloni morfolojisi ve hemoliz tipi değerlendirilmiştir. Etrafında zayıf hemoliz zonu yapan, düzgün kenarlı, saydam, gri renkte su damlasına benzeyen koloni oluşturan örnekler hemoliz varlığı olarak değerlendirilmiştir (Kadioğlu, 2011).

5.2.1.2. Gram boyama

Gram boyamada kullanılacak olan lam ekmek keser gibi 3 kez alevden geçirilmiştir. Daha sonra örnek konulacak yüzeye 1 damla serum fizyolojik (SF) damlatılıp, mikroorganizma kültüründeki kolonilerden iğne uçlu öze ile alınarak, lam yüzeyindeki SF içinde homojen olarak süspansedilmiştir. Örnek havada kuruyana kadar bekletilip, sonrasında 3 kez alevden geçirilerek tespit edilmiştir. Boyama işlemi için preparat üzerine kristal viyole damlatılıp 1 dakika bekletilmiştir. Ardından preparat lugol ile yıkanıp yıkama işlemi sonrasında tekrar üzerine lugol damlatılarak 1 dakika bekletilmiş ve süre sonunda su ile yıkanmıştır. Daha sonra preparat üzerine %96'lık etik alkol damlatılarak 10-30 saniye bekletilip su ile yıkanmıştır. Ardından

preparat üzerine sulu fuksin damlatılarak 30 saniye bekletilmiş süre sonunda su ile yıkanarak filtre kağıdı ile kurutulmuş ve immersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi ile incelenmiştir. Mikroskopta gözlenen pembe renkli, ince kıvrık şekilli bakteriler *H.pylori* olarak değerlendirilmiştir (Phillips ve Nash, 1985).

5.2.1.3. Katalaz deneyi

Koyun kanlı Columbia agar besiyerinde üretilmiş tek düşmüş bakteri kolonisi besiyeri yüzeyine değdirmeden platin öze ile alınarak lam üzerine aktarılmış ve bunun üzerine bir damla %3'lük H₂O₂ damlatılmıştır. 10-20 saniye içinde hava kabarcıklarının oluşması katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan, 2002).

5.2.1.4. Oksidaz deneyi

Oksidaz ayıracı (N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür), %95 etil alkol içinde %1 oranında taze olarak hazırlanarak, steril petri kutusu içine yerleştirilmiş olan filtre kağıdı üzerine damlatılmıştır. Koyun kanlı Columbia agar besiyerinde üretilmiş bakteri kolonileri steril eküvyon ile alınarak petri kutusundaki ayıraç içeren filtre kağıdı üzerine sürülmüştür. Filtre kağıdı ya da eküvyon ucunun lacivert-mor renge dönüşmesi oksidaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan, 2002).

5.2.1.5. Üreaz deneyi

Üreaz aktivitesi için *H.pylori* ATCC 43504 suşu üre besiyerine ekildikten sonra mikroaerofilik koşullarda (%10 CO₂, %5 O₂, %85 N₂), 37°C'de, 72 saat inkübe edilmiştir. Besiyeri renginin sarıdan pembeye dönmesi üreaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bilgehan, 2002).

5.2.2. Stok *Helicobacter pylori* suşunun canlandırılması

Stok *H.pylori* suşu -80°C'den alındıktan oda sıcaklığına gelip tam olarak çözündükten sonra steril eküvyon yardımı ile %5 koyun kanlı agar besiyerine ekilerek 37°C'de, 72 saat inkübe edilmiştir. Tüm çalışma boyunca 3. pasajdan sonra canlandırma tekrar yapılmıştır.

5.2.3. Kitosanların hazırlanması

Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosanlar %1 asetik asit içerisinde oluk difüzyon testi için 10 000-78,125 µg/mL konsantrasyon aralığında, agar dilüsyon testi için 1000-15,62 µg/mL konsantrasyon aralığında, sıvı mikrodilüsyon testi için 4000-31,25 µg/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde seri dilüsyonları hazırlanmış ve pH değerleri ölçülmüştür. Kitosan çözeltilerinin dilüsyon işlemi distile su ile yapılmıştır.

Karboksimetil kitosan suda çözündükten sonra 40 000-39,062 µg/mL ve 40 000-5 000 µg/mL konsantrasyon aralıklarında seri dilüsyonları hazırlanmıştır.

5.2.4. Antibiyotik çözeltilerinin hazırlanması

Antibiyotiklerin çözeltileri aşağıdaki formüle göre uygun konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Klaritromisin metanol, metronidazol ise dimetil sülfoksit içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözeltiler 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilerek kullanılmıştır.

$$\text{Tartılacak antibiyotik miktarı (mg)} = \frac{\text{İstenilen konsantrasyon (µg/mL)} \times \text{Çözücü hacmi (mL)}}{\text{Potens (µg/mg)}}$$

5.2.5. Antimikrobiyal etkinin saptanması

5.2.5.1. Oluk difüzyon yöntemi

Kitosan'ın *H.pylori* ATCC 43504 suşu üzerine olan antibakteriyal etkisi öncelikle oluk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. *H.pylori* ATCC 43504, %5 koyun kanlı agar besiyerine pasajlanarak mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Kültürden fizyolojik tuzlu su içinde McFarland 2 (10^7 - 10^8 kob/ml) bulanıklığına eşdeğer süspansiyon hazırlanıp koyun kanlı agar besiyeri üzerine bu süspansiyondan 100µL konularak yayılmıştır. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra oluk açıcı ile 8 mm çapında oluklar açılıp, oluk içine kitosanların seri dilüsyonlarından (10 000-78,125 µg/mL) 100µL konulmuştur. Aynı işlem kontrol olarak kitosanı çözmek için kullandığımız %1 asetik asit seri dilüsyonları (%1-%0,25) için de uygulanmış ve pH kontrolleri yapılmıştır. Daha sonra petriyer mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 72 saat inkübe edilmiş ve oluşan inhibisyon zonlarının çapları kumpas ile mm olarak ölçülmüştür. Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır (NCCLS; 2006).

5.2.5.2. Agar dilüsyon yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) tayini

Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) tayini NCCLS önerilerine uygun olarak agar dilüsyon yöntemi ile yapılmıştır. *H.pylori* ATCC 43504, %5 koyun kanlı agar besiyerine pasajlanarak mikroaerofilik koşullarda 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Kültürden fizyolojik tuzlu su içinde McFarland 2 (10^7 - 10^8 kob/mL) bulanıklığına eşdeğer süspansiyon hazırlanmıştır. Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosanlar (1000-15,62 µg/mL), karboksimetil kitosan (40 000-39,062 µg/mL), klaritromisin (0,5-0,0078 µg/mL) ve metronidazol (512-4 µg/mL) ile kombinasyon çalışması için karboksimetil kitosan (10 000 µg/mL) içeren %5 koyun kanlı Mueller Hinton Agar besiyeri hazırlanarak besiyeri üzerine 3 µL bakteri süspansiyonundan konulmuştur. İnokülasyon yapılan besiyerleri 37°C'de mikroaerofil koşullarda, 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda inoküle edilen bakteri süspansiyonu

bölgesinde üremenin olup olmadığına bakılarak, üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak belirlenmiştir. Aynı işlemler klaritromisin (0,5-0,0078 µg/mL) ve metronidazol (512-4 µg/mL) içinde tekrarlanmıştır (NCCLS; 2007).

Aynı işlem, karboksimetil kitosanın kontrol *E.coli* ATCC 11229 suşu üzerine antimikrobiyal aktivitesini araştırmak üzere tekrar edilmiştir.

5.2.5.3. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) tayini

Kasyon ayarlı MHB besiyerinin hazırlanması

Besiyerinin kasyon ayarı için magnezyum (Mg) ve kalsiyum (Ca) stok çözeltileri hazırlanmıştır.

Magnezyum stok çözeltisinin hazırlanması

Magnezyum stok çözeltisinin hazırlanmasında 8,36 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 100 mL distile suda çözülmüş ve 10 mg/mL Mg^{++} iyonu içeren bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Kalsiyum stok çözeltisinin hazırlanması

Kalsiyum stok çözeltisinin hazırlanmasında 3,68 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 100 mL distile suda çözülmüş ve 10 mg/mL Ca^{++} iyonu içeren bir çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

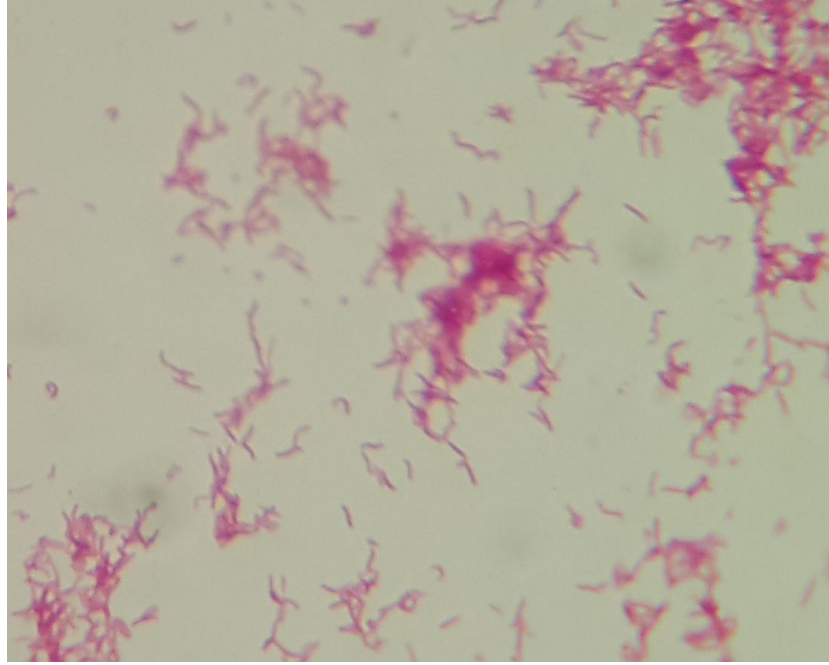
Besiyerinde istenilen Ca^{++} iyonu miktarı 20-25 mg/mL, Mg^{++} iyonu miktarı 10-12,5 mg/mL olduğu için, iyon miktarlarını sağlamak için 1 litre %5 koyun kanlı BHIB besiyeri besiyerine Ca stok çözeltisinden 2,1 mL, Mg stok çözeltisinden 1,1 mL ilave edilmiştir (British Standard ISO 20776-1, 2006).

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK tayini NCCLS önerilerine uygun olarak yapılmıştır. *H.pylori* ATCC 43504 suşu %5 koyun kanlı agar besiyerine pasajlanarak mikroaerofilik koşullarda 37°C’de 72 saat inkübe edilmiştir. Kültürden katyon ayarlı BHIB besiyeri içinde McFarland 2 (10^7 - 10^8 kob/mL) bulanıklığına eşdeğer süspansiyon hazırlanmıştır. Kitosan (4000-31,25 µg/mL) ve kontrol antibiyotiği metronidazol (2000-15,62 µg/mL), %5 koyun kanlı katyon ayarlı BHIB besiyerinde istenilen konsantrasyonlarda hazırlandıktan sonra mikroplak kuyucuklarına yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru 200’er µL dağıtılmıştır. Daha sonra tüm mikroplak kuyucuklarına 50 µL bakteri süspansiyonu ilave edilmiştir. Aynı deney, kitosanı çözmek için kullandığımız %1 asetik asitin seri dilüsyonları için *H.pylori* ATCC 43504 ve kontrol *E.coli* ATCC 11229 suşlarına karşı da yapılmıştır.

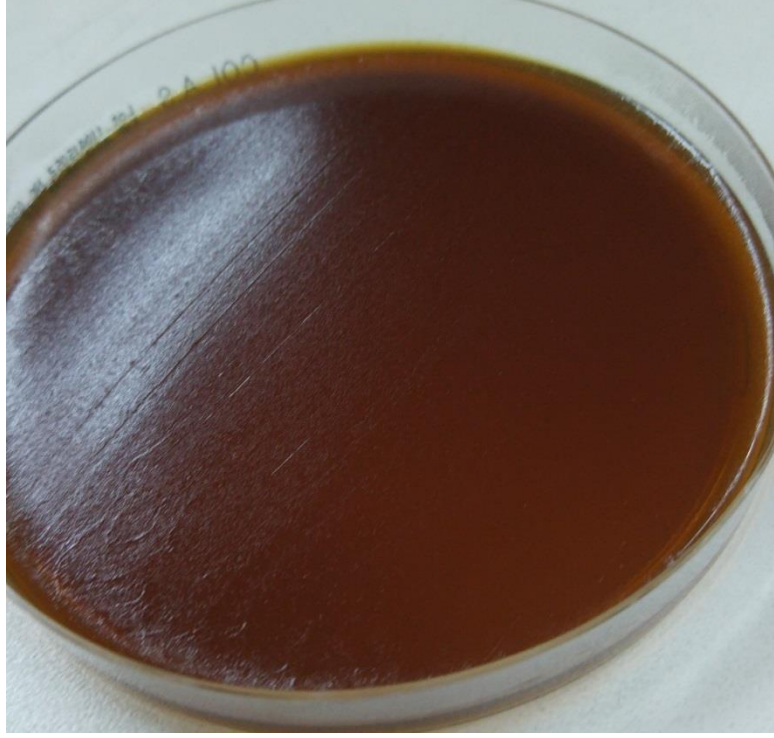
6. BULGULAR

6.1. *Helicobacter pylori*'nin mikroskop görüntüsü, koloni morfolojisi ve biyokimyasal özellikleri

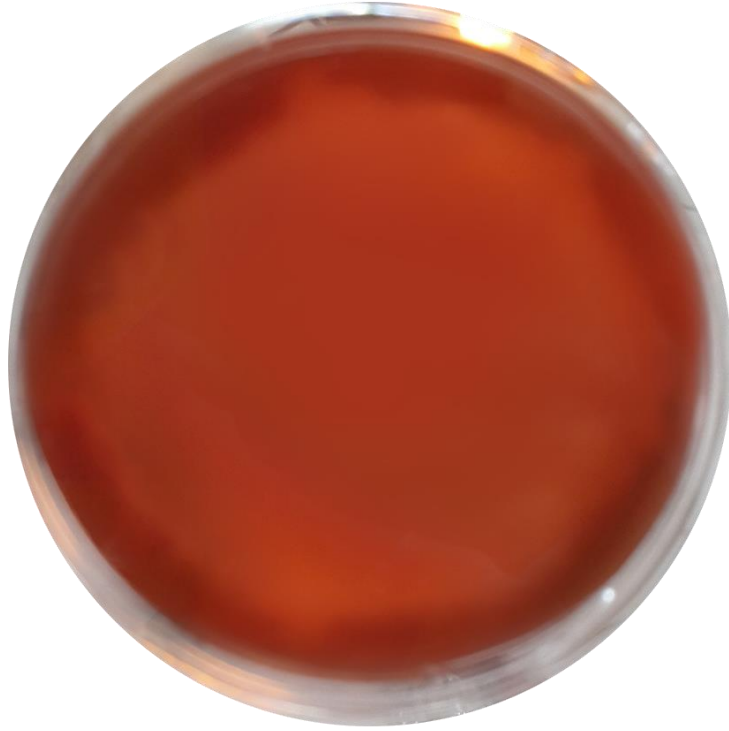
Helicobacter pylori ATCC 43504 suşunun ışık mikroskopunda gram negatif, kısa sarmal yapıda olduğu, %5 koyun kanlı Columbia agarda düzgün kenarlı, saydam gri renkte su damlasına benzeyen koloniler yaptığı, hemoliz, katalaz, oksidaz ve üreaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır (Resim 1, 2, 3, 4, 5, 6).



Resim 1: *Helicobacter pylori*'nin ışık mikroskobu görüntüsü (Gram boyama, x1000)



Resim 2: *Helicobacter pylori*'nin kolonilerinin görünümü (Columbia agar)



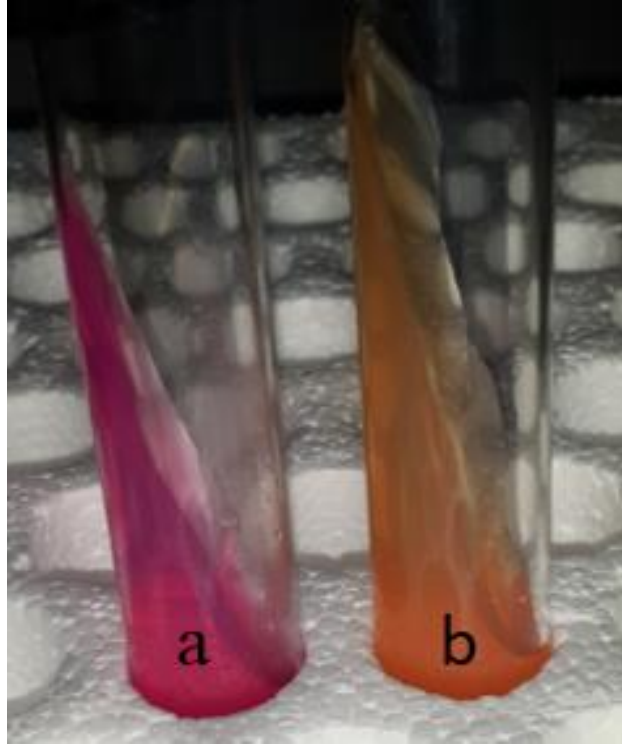
Resim 3: *Helicobacter pylori*'nin hemoliz aktivitesi (Columbia agar)



Resim 4: *Helicobacter pylori*'nin katalaz aktivitesi (Lam testi)



Resim 5: *Helicobacter pylori*'nin oksidaz aktivitesi (N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür)



Resim 6: *Helicobacter pylori*'nin üreaz aktivitesi (a: Üreaz pozitif, b:Üreaz negatif)

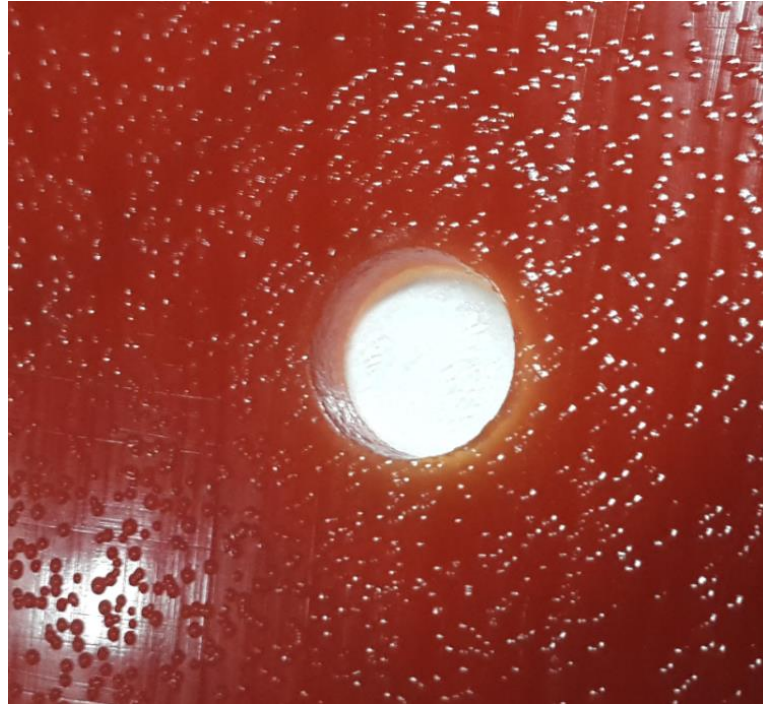
6.2. Oluk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinin saptanması

Oluk difüzyon yöntemi ile; düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosanın %1 asetik asit içerisinde çözülen ve steril distile su ile seyreltilen 10 000-78,125 µg/mL konsantrasyon aralığında *H.pylori* ATCC 43504 suşu üzerine antimikrobiyal aktivite göstermediği saptanmıştır. Asetik asitin %1 ve % 0,5 konsantrasyonlarda *H.pylori* ATCC 43504 suşuna karşı (sırasıyla 2,28 mm ve 2,24 mm zon çapları) antimikrobiyal aktivite gösterdiği (Resim 7, 8), ≤ %0,25 konsantrasyonlarda ise antimikrobiyal aktivitesinin olmadığı görülmüştür. %1, %0,5, %0,25 ve %0,125 konsantrasyonlardaki asetik asitlerin pH'ları sırası ile 2,63, 2,79, 2,95 ve 3,1 olarak bulunmuştur (Tablo 3).

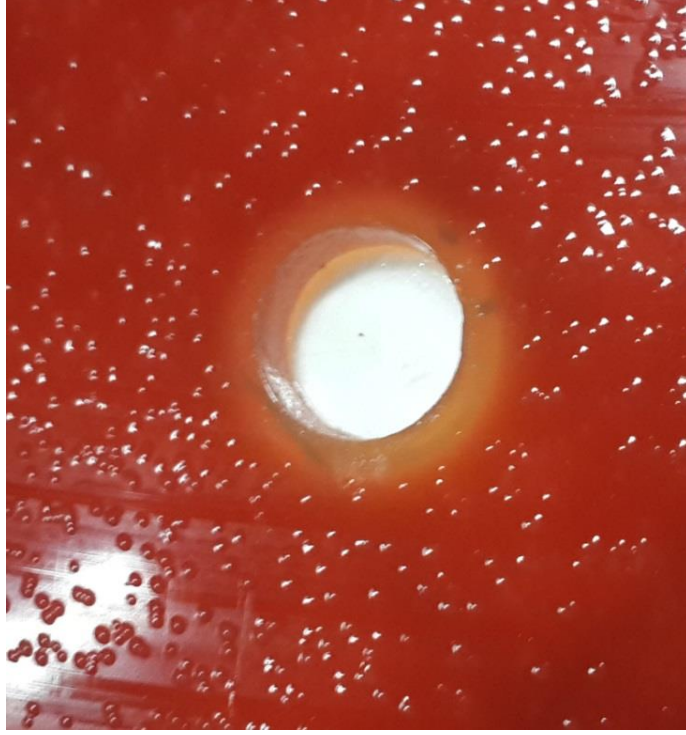
Tablo 3: Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan ve asetik asitin *H.pylori* ATCC 43504 suşu üzerine oluk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi

Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan				
	10 000 µg/mL	5000 µg/mL	2500 µg/mL	1250 µg/mL
<i>H.pylori</i> ATCC 43504	Etkili	Etkili	Etkisiz	Etkisiz

Asetik asit				
	% 1(pH: 2,63)	%0,5(pH: 2,79)	%0,25(pH: 2,95)	%0,125(pH: 3,1)
<i>H.pylori</i> ATCC 43504	Etkili	Etkili	Etkisiz	Etkisiz



Resim 7: Kitosanın *H.pylori* ATCC 43504 üzerine etkisi (Oluk difüzyon yöntemi)



Resim 8: %0,5 asetik asitin *H.pylori* ATCC 43504 üzerine etkisi (Oluk difüzyon yöntemi, inhibisyon zon çapı: 2,24 mm)

6.3. Agar dilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinin saptanması

Agar dilüsyon yöntemi ile; düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosanın %1 asetik asit içerisinde çözölen ve steril distile su ile seyreltilen 1000-15,62 µg/mL konsantrasyon aralığında *H.pylori* ATCC 43504 üzerine antimikrobiyal aktivite göstermediği saptanmıştır. Aynı yöntem ile klaritromisin MİK değeri 0,015 µg/mL, metronidazol MİK değeri 64 µg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 4). Suda çözünen karboksimetil kitosanın da *H.pylori* ATCC 43504 suşuna karşı 40 000-39,062 µg/mL konsantrasyon aralığında antimikrobiyal aktivite göstermediği bulunmuştur (Tablo 5). Karboksimetil kitosanın (10 000 µg/mL) klaritromisin (0,5-0,0078 µg/mL) ve metronidazol (512-4 µg/mL) ile kombine kullanıldığında antagonist etki gösterdiği saptanmıştır. Karboksimetil kitosanın (40 000-5 000 µg/mL) *E. coli* ATCC 11229 suşuna karşı MİK değeri 40 000 µg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 6) (Resim 9).

Tablo 4: Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan ile klaritromisin ve metronidazolün *H.pylori* ATCC 43504 suşu üzerine antimikrobiyal aktivitesi

Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan			
1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL
Etkisiz	Etkisiz	Etkisiz	Etkisiz
Antibiyotik MİK (µg/mL)			
Klaritromisin			0,015
Metronidazol			64

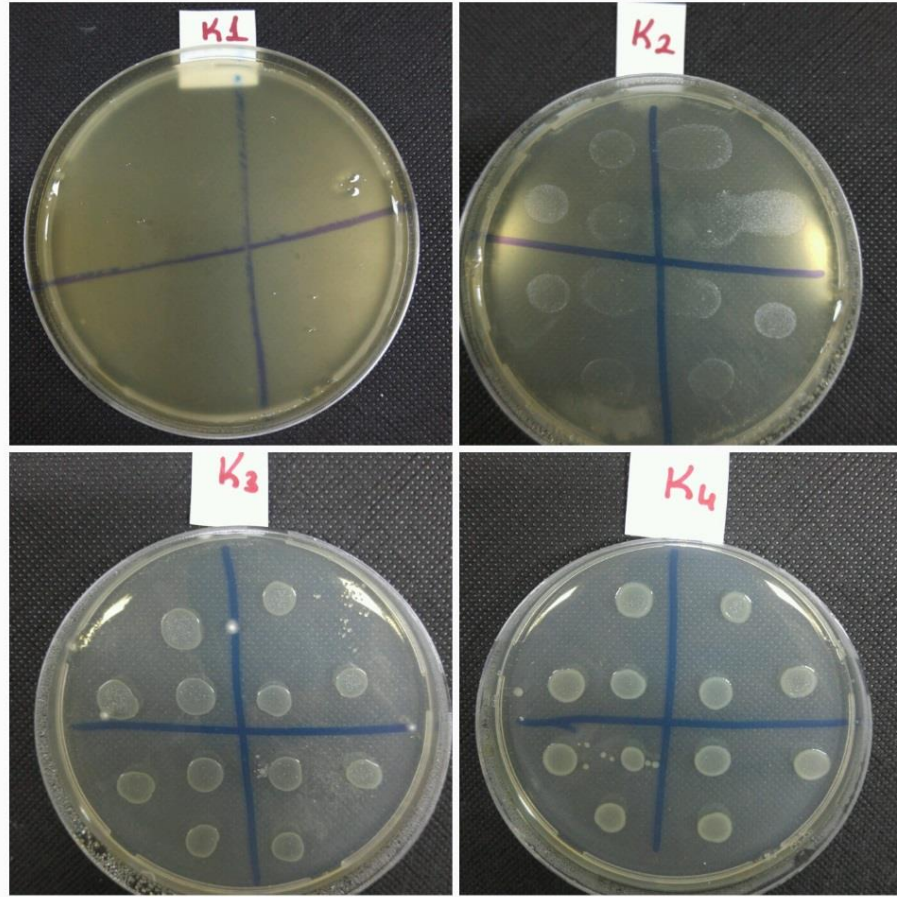
Helicobacter pylori ATCC 43504 MİK aralığı: Klaritromisin: 0,016-0,12 µg/mL, metronidazol: 64-256 µg/mL'dir (CLSI. Ek17; Sf:134).

Tablo 5: Karboksimetil kitosanın agar dilüsyon yöntemi ile *H.pylori* ATCC 43504 suşu üzerine antimikrobiyal aktivitesi

Suda çözünen	40 000 µg/mL	20 000 µg/mL	10 000 µg/mL	5 000 µg/mL
karboksimetil kitosan				
<i>H.pylori</i> ATCC 43504	Etkisiz	Etkisiz	Etkisiz	Etkisiz

Tablo 6: Karboksimetil kitosanın agar dilüsyon yöntemi ile *E.coli* ATCC 11229 suşuna etkili olduğu MİK değeri

Suda çözünen	40 000 µg/mL	20 000 µg/mL	10 000 µg/mL	5 000 µg/mL
karboksimetil kitosan	Etkili	Etkisiz	Etkisiz	Etkisiz
<i>E.coli</i> ATCC 11229	Etkili	Etkisiz	Etkisiz	Etkisiz



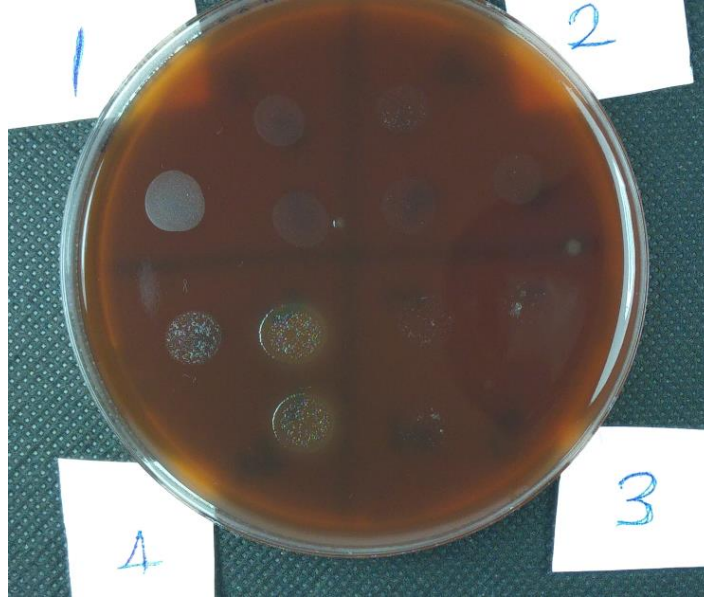
Resim 9: Karboksimetil kitosanın *E.coli* ATCC 11229 üzerine etkisi (Agar dilüsyon yöntemi; K1:40 000 µg/mL karboksimetil kitosan, K2:20 000 µg/mL karboksimetil kitosan, K3:10 000 µg/mL karboksimetil kitosan, K4:5 000 µg/mL karboksimetil kitosan)

6.4. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinin saptanması

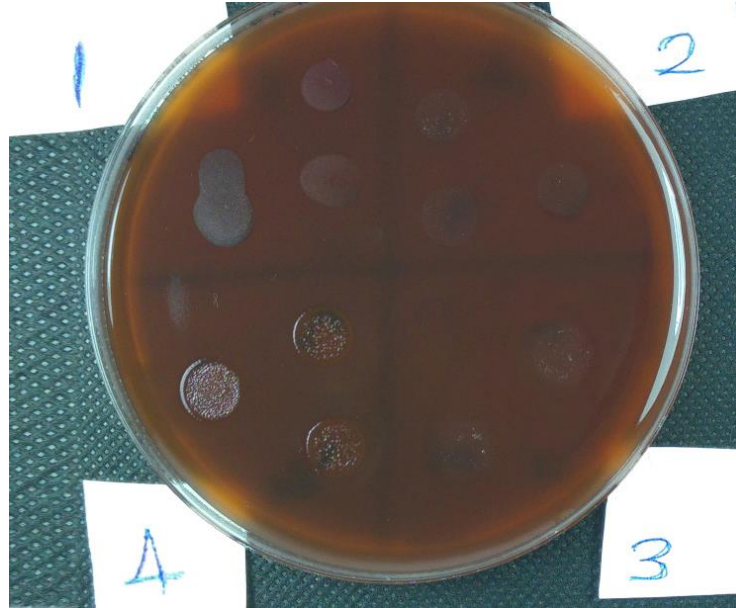
Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle; düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosanın %1 asetik asit içerisinde çözölen ve steril distile su ile seyreltilen 4000-31,25 µg/mL konsantrasyon aralığında *H.pylori* ATCC 43504 üzerine antimikrobiyal aktivite göstermediği, asetik asitin ise ≤ %0,125 konsantrasyondan itibaren etkisiz olduğu saptanmıştır (Tablo 7). Bulgularımız sıvı mikrodilüsyon kuyucuklarından %5 koyun kanlı Columbia agar üzerine nokta ekim yöntemi ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır (Resim 10-11).

Tablo 7: Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan ile asetik asitin *H.pylori* ATCC 43504 suşu üzerine sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi

Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan				
	4000 µg/mL	2000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL
<i>H.pylori</i> ATCC 43504	Etkili	Etkili	Etkili	Etkisiz
Asetik asit				
	%1	%0,5	%0,25	%0,125
<i>H.pylori</i> ATCC 43504	Etkili	Etkili	Etkili	Etkisiz



Resim 10: Kitosanın *H.pylori* ATCC 43504 üzerine etkisi (sıvı mikrodilüsyon kuyucuklarından %5 koyun kanlı Columbia agar üzerine nokta ekim yöntemi, 1: 4000 $\mu\text{g/mL}$, 2: 2000 $\mu\text{g/mL}$, 3: 1000 $\mu\text{g/mL}$, 4: 500 $\mu\text{g/mL}$)

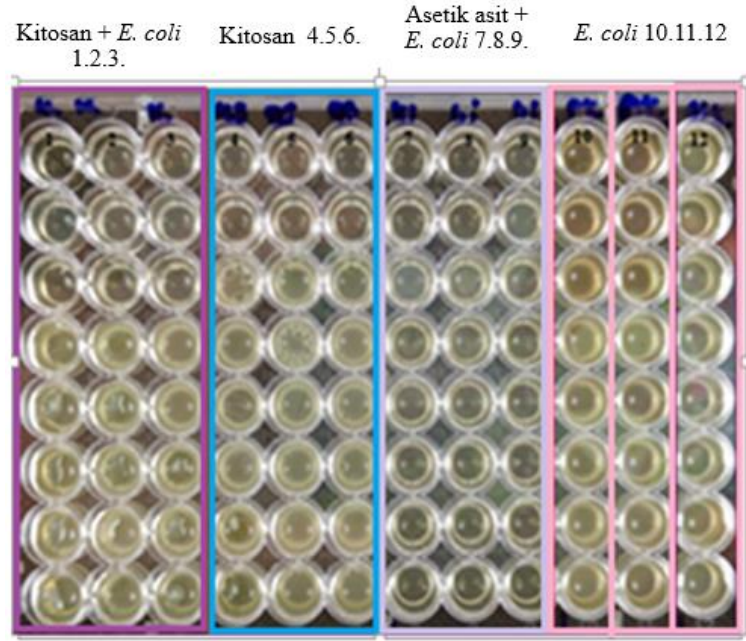


Resim 11: Asetik asitin *H.pylori* ATCC 43504 üzerine etkisi (sıvı mikrodilüsyon kuyucuklarından %5 koyun kanlı Columbia agar üzerine nokta ekim yöntemi, 1:%1, 2:%0,5, 3:%0,25, 4:%0,125)

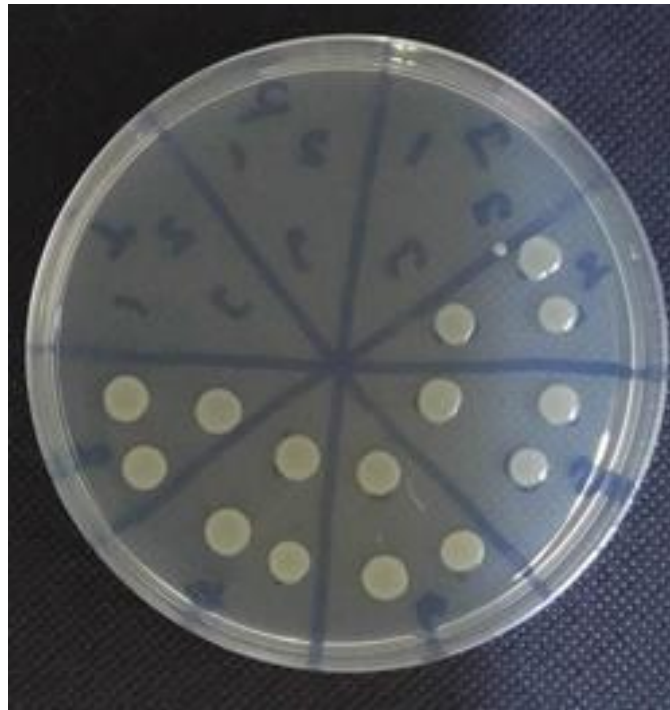
Kitosanın (4000-31,25 µg/mL) kontrol *E.coli* ATCC 11229 suşu üzerine MİK değeri 1000 µg/mL olarak bulunmuştur. Kitosanın çözücüsü olarak kullandığımız %1 asetik asitin kontrol *E.coli* ATCC 11229 suşu üzerine \leq %0,5 konsantrasyonundan itibaren etkisiz olduğu görülmüştür (Tablo 8) (Resim 12). Bulgularımız sıvı mikrodilüsyon kuyucuklarından MHA besiyeri üzerine nokta ekim yöntemi ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır (Resim 13, 14).

Tablo 8: Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosanın MİK değeri ve asetik asitin *E.coli* ATCC 11229 suşu üzerine antimikrobiyal aktivitesi

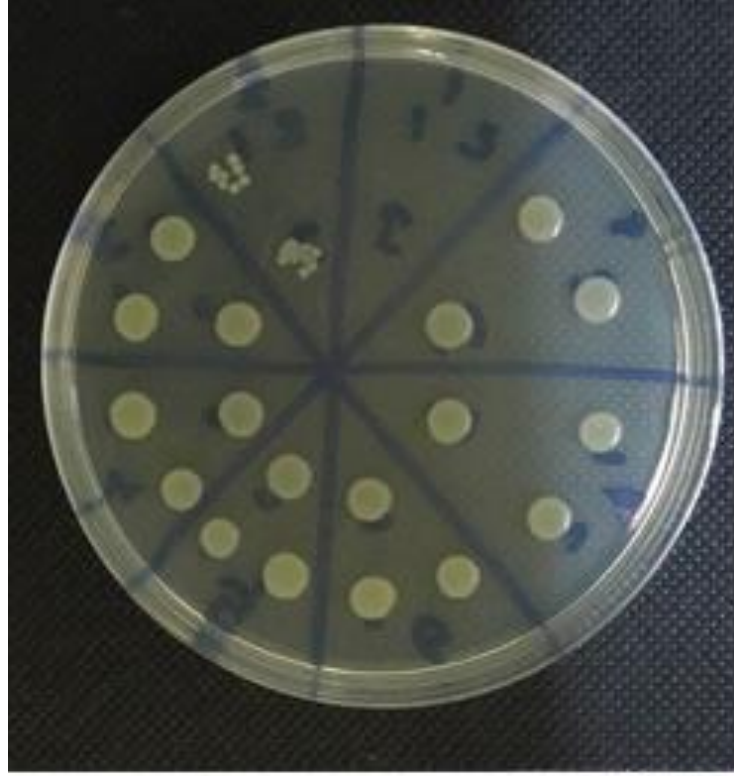
Düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan				
	4000 µg/mL	2000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL
<i>E.coli</i> ATCC 11229	Etkili	Etkili	Etkili	Etkisiz
Asetik asit				
	%1	%0,5	%0,25	%0,125
<i>E.coli</i> ATCC 11229	Etkili	Etkisiz	Etkisiz	Etkisiz



Resim 12: Kitosanın *E.coli* ATCC 11229 üzerine etkisi (Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, MİK: 1000 µg/mL)



Resim 13: Kitosanın *E.coli* ATCC 11229 üzerine etkisi (sıvı mikrodilüsyon kuyucuklarından MHA üzerine nokta ekim yöntemi)



Resim 14: Asetik asitin (%1) *E.coli* ATCC 11229 üzerine etkisi (sıvı mikrodilüsyon kuyucuklarından MHA üzerine nokta ekim yöntemi)

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyada en yaygın görülen enfeksiyon etkenlerinden biri olan *H.pylori* midede yerleşmekte ve ülserden kansere kadar ulaşabilen klinik tablolara neden olabilmektedir. Bakterinin nasıl bulaştığı tam olarak bilinmemek ile birlikte, insanlar için oldukça ciddi sağlık sorunlarına yol açabilen önemli bir patojendir. Nitekim IARC *H.pylori* 'yi 1994 yılında insanlar için Tip I karsinogen olarak sınıflandırmıştır (Yula, 2009).

Helicobacter pylori enfeksiyonlarının görülme sıklığı ve tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen direnç artmaktadır. Bu nedenle tedavide yeni arayışlar ve bileşikler aralıksız olarak geliştirilmeye çalışılmakta, doğal ve sentetik birçok bileşik üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

Helicobacter pylori enfeksiyonlarının tedavisinde en çok tercih edilen antibiyotik klaritromisin ve metronidazoldür. Ancak günümüzde bu antibiyotiğe karşı artan direnç nedeni ile tedavi başarısı azalmaktadır. Yapılan çalışmalar ile ülkemizde klaritromisin direncinin %18,2 ile %54,5, metronidazol direncinin ise %36,4 ile %62,5 oranları arasında olduğu bildirilmiştir (Çağdaş ve ark., 2012).

İspanyol çocuklar ile yapılan bir çalışmada E-test yöntemi kullanılarak klinik *H.pylori* suşlarının metronidazole olan direnç oranı %35,7 klaritromisine olan direnç oranı %54,6 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada metronidazol için MİK aralığı 0,016 – 256 µg/L, klaritromisin için MİK aralığı 0,008-256 µg/L olarak saptanmıştır (Agudo ve ark.,2009).

İsrail’li çocuk ve yetişkinler ile yapılan bir çalışmada E-test yöntemi ile *H.pylori* suşlarına karşı metronidazol direnci yetişkinlerde %70,5 çocuklarda %24,4 olarak; klaritromisin direnci yetişkinlerde %22,3 çocuklarda ise %24,4 olarak saptanmıştır (Peretz ve ark., 2014).

Kore’de 16 yıllık periyotta *H.pylori* suşlarına karşı antibiyotiklerin MİK değişimleri izlenmiştir. Agar dilüsyon yöntemi ile yapılan çalışmada klaritromisin MİK değerinin 1987 yılında 0,0625-0,05 µg/mL arasında iken 2003 yılında 0,0625-64 µg/mL aralığına yükseldiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada metronidazolün MİK değerini 1-256 µg/mL aralığında saptamışlar ve ≥ 8 µg/mL MİK değerlerini dirençli olarak kabul ederek MİK değeri ≥ 8 µg/mL olan suş oranının 16 yılda %52,9’dan %66,2’ye yükseldiğini göstermişlerdir (Kim ve ark.,2004).

Helicobacter pylori ATCC 43504 suşu ile yapılan başka bir çalışmada E-test ve agar dilüsyon yöntemleri ile klaritromisin MİK aralığının 0,016-0,125 µg/mL, metronidazol MİK aralığının ise 64-256 µg/mL olduğu gösterilmiştir (Best ve ark., 2003).

Çalışmamızda *H.pylori* ATCC 43504 standart suşu üzerine klaritromisin için MİK değeri 0,015 µg/mL, metronidazol MİK değeri 64 µg/mL olarak bulunmuş ve literatürlerde bildirilen MİK aralığında olduğu görülmüştür.

Kitin ilk olarak 1811’de mantarın yapısında tespit edilerek tanımlanmış bir polisakkarittir. İsmi Yunanca’da zarf anlamına gelen “chiton” kelimesinden türemiştir. Yeryüzünde selülozdan sonra en fazla bulunan doğal biyopolimer olarak bilinmektedir (Kurt ve Zorba, 2005). Kitin; yengeç, istakoz ve karides gibi deniz kabuklularının dış iskelet yapılarından, böceklerden ve fungusların hücre duvarlarından elde edilmektedir (İmamoğlu, 2011).

Kitosan, kitinin deasetillenmesi sonucu elde edilen bir polisakkarittir ve doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Kitosan günümüzde tıp, gıda, ziraat, kozmetik, eczacılık, atık su arıtımı, tekstil sektörü gibi çok çeşitli alanlarda kullanılabilmektedir (Tablo 2) (İmamoğlu, 2011).

Kitosan çeşitli bakteri ve mantar türlerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Demir ve ark., 2008) Ancak antimikrobiyal aktivitesi tespit

edilmesine rağmen, bu etki mekanizmasının nasıl çalıştığı henüz tam olarak belirlenememiştir (Gürel İnanlı ve Karaton Kuzgun, 2012).

Kitosanın patojen mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal aktivitesi çeşitli araştırmacılar tarafından araştırılmıştır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda kitosanın %1-1,5 konsantrasyon aralığında *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), % 0,5-1 konsantrasyonlarda *E. coli* üzerinde tam inhibisyon oluşturduğu bildirilmiştir. Kullanılan kitosanın molekül ağırlığı arttıkça gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus* üzerinde antimikrobiyal etkisinin arttığını; bunun tam tersine molekül ağırlığı azaldıkça gram negatif bir bakteri olan *E. coli* için antimikrobiyal etkisinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca kitosan konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal etkinin kuvvetlendiğini; kitosanın % 1,0 konsantrasyonunun hem *E. coli*, hem de *S. aureus*'a karşı % 100 etkili olduğu bildirilmiştir (Bostan ve ark., 2007).

Çalışmamızda; orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan ve suda çözünen karboksimetil kitosanın *H.pylori* ATCC 43504 suşu üzerine antimikrobiyal aktivitesinin olmadığı görülmüştür. Orta ve düşük molekül ağırlıklı kitosan ve suda çözünen karboksimetil kitosanın kontrol *E.coli* ATCC 11229 suşu üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve MİK değerlerinin sırasıyla 1000 µg/mL, 1000 µg/mL ve 40 000 µg/mL olduğu bulunmuştur.

Literatürlerde *in vitro* şartlarda *H.pylori* üremesi için uygun zenginleştirilmiş besiyeri hazırlandığında optimal üremenin sağlanabileceği ve besiyeri pH'sının 7,2 olması gerektiği bildirilmiştir (Yula, 2009). Çalışmamızda kullandığımız %5 koyun kanlı MHA besiyeri içerisine kitosanı çözmek için kullandığımız %1 asetik asit ilave edildiği için besiyeri pH'ı 6,53 olarak ölçülmüştür. Yapılan incelemelerde kitosanın en iyi antimikrobiyal aktivitesinin pH 5 civarında gerçekleştiği, pH arttıkça antimikrobiyal aktivitenin azaldığı, pH 9'da ise hiç antimikrobiyal aktivite göstermediği bildirilmiştir. Farklı araştırmacılar ise kitosan suda çok az miktarda çözüldüğü için pH 7'de herhangi bir antimikrobiyal aktivite göstermediğini iddia etmişlerdir. (Demir ve ark., 2008).

Çalışmamızda; %1 asetik asit içerisinde çözünen kitosanın *H.pylori* ATCC 43504 suşuna etkisiz olduğu konsantrasyonlarını elde etmek için asetik asit dilüsyonlarının distile su ile yapılması sonucu ortam pH'sının artması nedeni ile düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan ve karboksimetil kitosanın *H.pylori* ATCC 43504 suşuna karşı antimikrobiyal aktivite göstermediğini düşünmekteyiz.

Yapılan diğer çalışmalarda gram pozitif bakteriler için minimum inhibe edici kitosan konsantrasyonunun gram negatif bakterilerden daha düşük olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda gram negatif bakteriler ile karşılaştırıldığında kitosanın gram pozitif bakterilere karşı daha etkili olduğu bildirilmiştir; *E. coli*, *E. coli* O157, *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* gibi çoğu bakteri için MİK değerleri % 0,1'in altında bulunmuş, aynı değer *Pseudomonas aeruginosa* için % 0,25 olarak belirlenmiştir (Bostan ve ark., 2007).

Farklı molekül ağırlıklı kitosanların dört tane gram negatif bakteri (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium* ve *Vibrio parahaemolyticus*), yedi tane gram pozitif bakteri (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus bulgaricus*) üzerine antimikrobiyal etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, kitosanın test edilen bakterilerin çoğunun üremesini engellediği, %0,1 konsantrasyonunda ise gram pozitif bakterilere karşı gram negatif bakterilerden daha güçlü bakterisidal etki gösterdiği saptanmıştır (Bostan ve ark., 2007).

Bakteriler kadar küf ve mayalar da kitosandan etkilenmektedir. Çoğu küf türlerinin %1'in altındaki kitosana hassas oldukları, buna karşılık *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) gibi türlerin ise %1'in üstünde konsantrasyonlarda bile kitosana karşı dirençli oldukları rapor edilmiştir. Ancak ortama (pH 5.4) 0,1-5 mg/mL kitosan ilavesinin *Aspergillus niger*'in üremesini durdurduğu; fakat 2 mg/ml'den daha düşük konsantrasyonlarda *A. flavus*'un üremesini ve aflatoksin üretimini inhibe etmede etkisiz olduğu sonucuna varılmıştır. Farklı araştırmacılar kitosanın *A. flavus* ve

Aspergillus parasiticus üremesini yarı yarıya; bu küflerin toksin üretimini ise % 90'ın üzerinde bir oranda azalttığını rapor etmişlerdir (Bostan ve ark., 2007).

Bu çalışmalara ilave olarak yapılan diğer çalışmalarda da kitosanın gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerine etkili olmasının dışında mantarlar üzerine de antimikrobiyal etkili olduğu gösterilmiştir. *E. coli*, *S. aureus*, *A. niger*, ve *Fusarium solani* ile yapılan çalışmada kitosanın antimikrobiyal aktivitesi olduğu gösterilmiştir (Saita ve ark., 2012).

Kitosanın zirai mücadelede düşük konsantrasyonlarda dahi bitkilerde patojen saldırılara karşı koruyucu mekanizmayı tetiklediği, fındık ve mısırdaki *A. flavus*'un aflatoksin üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Çileklerde hasat sonrası fungal patojenlerin gelişimi üzerine yapılan bir çalışmada *Botrytis cinerea* ve *Rhizopus stolonifer* ile inoküle edilen çileklerin bir kısmı kitosan çözeltisiyle kaplanmış bir kısmı ise kaplanmamıştır. Bu çileklerin her iki şekli, 13°C'de depolanıp günlük olarak kontrol edildiklerinde kitosan ile kaplanmayan test grubunda bir gün sonra fungal gelişim gözlenirken; kitosan ile kaplanmış test grubunda beş gün sonra fungal gelişim başlamıştır (İmamoğlu, 2011).

Yapılan çalışmalarda kitosanın mantarlar üzerine etkisinin bakterilerden daha düşük olduğu gösterilmiştir (Bostan ve ark., 2007).

Yukarıda bahsedilen literatür bilgilerine bakıldığında kitosanın bazı mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkinlik gösterdiği açıktır. Ancak bu konuda yapılan çalışmalar oldukça sınırlı olup, daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda;

1.Oluk difüzyon, agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri ile yapılan deneylerde düşük ve orta molekül ağırlıklı kitosan ile suda çözünen karboksimetil kitosanın *H.pylori* ATCC 43504 suşuna karşı antimikrobiyal aktiviteleri olmadığı görülmüştür.

2.Düşük ve orta molekül molekül ağırlıklı kitosanın *E.coli* ATCC 11229 suşuna karşı MİK değeri 1000 µg/mL, karboksimetil kitosanın MİK değeri ise 40 000 µg/mL olarak bulunmuştur.

3.Suda çözünen karboksimetil kitosan + klaritromisin ve karboksimetil kitosan + metronidazol kombinasyonlarının *H.pylori* ATCC 43504 suşuna karşı antagonist etki gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak;

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi ile molekül ağırlığı arasındaki ilişkinin kesin olarak belirlenemediği literatürlerde bildirilmiştir. Buna rağmen günümüzde gıda, kozmetik, ziraat, su arıtımı, biyoteknoloji ve medikal alanda pek çok yerde kullanılan kitosanın antimikrobiyal aktivitesini etkileyen çözünürlük, viskozite, deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı gibi faktörlerin tespiti konusunda daha fazla araştırma yapılmasının alternatif ilaç arayışları açısından yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

8. KAYNAKLAR

Abbasoğlu U., Onurdağ Kaynak F. Antimikrobiyal Ajanlar. İçinde: Abbasoğlu U., Çevikbaş A., Editörler. Farmasötik Mikrobiyoloji. 1.Basım. İstanbul: Efil Yayınevi; 2011, p:96.

Abbasoğlu U., Onurdağ Kaynak F. Antimikrobiyal Ajanlar. İçinde: Abbasoğlu U., Çevikbaş A., Editörler. Farmasötik Mikrobiyoloji. 1.Basım, İstanbul: Efil Yayınevi; 2011, p:129.

Agudo S., Alarcn T., Cibrelus L., Urruzuno P., Martnez M.J., Lpez-Brea M. High percentage of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* clinical isolates obtained from Spanish children. Rev Esp Quimioter 2009;22(2): 88-92.

Akgüç M., *Helicobacter pylori*'de Caga Antikoru'nun Serumdan *In Vitro* Tespiti İçin Rekombinant Bir Caga Antijeninin Üretilmesi. A.Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü, 2011, Yüksek Lisans Tezi, Ankara (Danışman: Prof. Dr. A. M. Bozdayı).

Altındış M., Özdemir M. *Helicobacter pylori* Ve Tanısı. Kocatepe Tıp Derg 2003;2: 1-12.

Arı A. Histolojik Olarak Mide Kanseri İle *Helicobacter Pylori* Arasındaki İlişki. T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Eğitim Hastanesi II.Genel Cerrahi Kliniği. Uzmanlık Tezi, 2006, İstanbul (şef: Op. Dr. A. Kaygusuz).

Best L.M., Haldane D.J.M., Keelan M., Taylor D.E., Thomson A.B.R., Loo V., Fallone C.A., Lyn P., Smaill F.M., Hunt R., Gaudreau C., Kennedy J., Alfa M., Pelletier R., Veldhuyzen van Zanten S.J.O. Multilaboratory Comparison of Proficiencies in Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori* and Correlation between Agar Dilution and E Test Methods. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(10): 3138-3144.

Beykia M., Zhaveha S., Khalili S.T., Cheratic T.R, Abollahic A., Bayatd M., Tabatabaeie M., Mohsenifar A. Encapsulation of Mentha piperita essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products* 2014;54: 310–319.

Bie P., Liu P., Yu L., Li X., Chen L., Xie F. The properties of antimicrobial films derived from poly(lactic acid)/starch/chitosan blended matrix. *Carbpol* 2013;98: 959– 966.

Bilgehan H.Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, İzmir; 2002, p:673-709.

Bostan K., Aldemir T., Aydın A. Kitosan ve Antimikrobiyal Aktivitesi. *Turk Mikrobiyol Cem Der* 2007;37(2): 118-127.

British Standard (BS) EN ISO 20776-1. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). Aerob Üreyen Bakteriler İçin Dilüsyon Yöntemleri ile Antimikrobik Duyarlılık Testleri; Onaylanmış Standart. 7. Basım. M7-A7. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2006, p:12-13.

Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). Antibiyotik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; Onyedinci Bilgi Eki. 1. Basım. M100-S17. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2007, p:134.

Çağdaş U., Otağ F., Tezcan S., Sezgin O., Aslan G., Emekdaş G. Mide Biyopsi Örneklerinden *Helicobacter pylori*'nin Tanımlanması Ve Antimikrobiyal Direncinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(3): 398-409.

Demiray Gürbüz E.,Yılmaz Ö. *Helicobacter pylori*'nin Yaşam Stratejisi. Turk Mikrobiyol Cemiy Der 2011;41(2): 149-156.

Demir A, Seventekin N, Öktem T. Kitosanın Tekstil Sanayiinde Antimikrobiyal Madde Olarak Kullanımının Araştırılması. Tekst Konfeks 2008;2: 94-102.

Demir A, Seventekin N. Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları. TTED 2009;3(2): 92-103.

Erkan Koç B, Özkan M. Gıda Endüstrisinde Kitosanın Kullanımı. Gıda 2011;36(3): 161-168.

Güral İnanlı A., Karaton Kuzgun N. Uçucu Yağlarla Zenginleştirilmiş Kitosan Filmlerin Antimikrobiyal Aktivitesi. GTED 2012;7(1): 8-35.

Hancıoğlu Sıkılı Ö., Karapınar M. *Helicobacter pylori* Bulaşında Gıdaların Rolü. Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi 2001;2(1): 1-7.

İmamoğlu Ö. Biyokontrolde doğal ürünlerin kullanılması; Kitosan. Turk Hij Den Biyofl Derg 2011;68(4): 215 – 222.

Jeon S.J., Oh M., Yeo W., Galva K.N., Jeong K.N. Underlying Mechanism of Antimicrobial Activity of Chitosan Microparticles and Implications for the Treatment of Infectious Diseases. PLoS One. 2014; 9(3): e92723.

Jumaa M., Furkert F. H., Müller B. W. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. Eur J Pharm Biopharm 2002;53: 115–123.

Kadioğlu L. Anti *Helicobacter pylori* Terapileri. K. 7 A. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011, Yüksek Lisans Tezi, Kilis (Danışman: Yard. Doç. Dr. G. Güzeldağ).

Kim J.M., Kim J.S., Jung H.C., Kim N., Kim Y.J., Song S. Distribution of Antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* Strains over a 16-Year Period in Patients from Seoul, South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(12): 4843-4847.

Kurt Ş, Zorba Ö. Kitin, Kitosan ve Türevlerinin Gıdalarda Kullanım Olanakları. *Gıda* 2005;30(6): 371-378.

Lee D.S., Woo J.Y., Ahn C.B., Je J.Y. Chitosan–hydroxycinnamic acid conjugates: Preparation, antioxidant and antimicrobial activity. *Food Chem* 2014;148: 97–104.

Lehours P., Bessède E., Mégraud F., Varon C. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and Mechanisms of Carcinogenesis. In: Droz J.P., Carme B., Couppié P., Nacher M., Thiéblemont C. *Tropical Hemato-Oncology*. Springer International Publishing Switzerland 2015, p:171-179.

Martínez L.E., Hardcastle J.M., Wang J., Pincus Z., Tsang J., Hoover T.R., Bansil R., Salama N.R. *Helicobacter pylori* strains vary cell shape and flagellum number to maintain robust motility in viscous environments. *Mol Microbiol* 2016;99(1): 88-110.

Özdemir Z, Kitin; Kitosanın Fonksiyonel Özellikleri ve Kullanım Alanları. *Kimya ve Sanayi Dergisi*. 2014;44(323): 104-117.

Peretz A., Paritsky M., Nasser O., Brodsky D., Glyatman T., Segal S., On A. Resistance of *Helicobacter pylori* to tetracycline, amoxicillin, clarithromycin and metronidazole in Israeli children and adults. *J Antibiot (Tokyo)* 2014;67(8): 555–557.

Phillips E, Nash P. Culture Media. In: Balows A, Hausser J W, Shadomy J, eds. *Manual of clinical microbiology*. 4th edition, Washington: American Society for Microbiology; 1985, p:1051-1092.

Raafat D., Sahl H.G. Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey. *Microb Biotechnol* 2009;2: 186–201.

Saita K., Nagaoka S., Shirosaki T., Horikawa M., Matsuda S., Ihara H. Preparation and characterization of dispersible chitosan particles with borate crosslinking and their antimicrobial and antifungal activity. *Carbohydr Res* 2012;349: 52–58.

Suzuki, N., Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the saliva of patients complaining of halitosis. *JMM* 2008;57(12): 1553-1559.

Şimşek İ., Kayahan H. *Helicobacter pylori* Tedavisine Genel Bakış. *Dahili Tıp Bilim Derg* 2005;12(3): 113-116.

Tünger Ö. *Helicobacter pylori* İnfeksiyonları. *İnfeks Derg* 2008;22(2): 107-115.

Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS). McFarland Baryum Sülfat Bulanıklık standardı hazırlanması. AMD Testleri Test Prosedürleri AMD-TP-02 Sürüm 1, 2014.

Usta Y., Özen H. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu. *Cocuk Sag HastDerg* 2007;50: 136-145.

Venkatesan J., Jayakumar R., Mohandas A., Bhatnagar I., Kim S.K. Antimicrobial Activity of Chitosan-Carbon Nanotube Hydrogels Materials. 2014;7: 3946-3955.

Wang Q., Tian F., Feng Z., Fan X., Pan Z., Zhou J. Antioxidant activity and physicochemical properties of chitosan films incorporated with Lycium barbarum fruit extract for active food packaging. *International Journal of Food Science and Technology* 2015;50: 458–464.

Yılmaz Ö., Okcu N. *Helicobacter pylori* ve Gastrointestinal Sistemle İlişkili Hastalıklar. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Erzurum. 2006;38: 13-17.

Yula E. Bölgemizden İzole Edilen *Helicobacter Pylori* Suşlarının Moleküler Epidemiyolojik Özelliklerinin Tespiti. Ç. Ü. Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2009, Adana (Danışman: Prof Dr. F. Köksal).

9.EK

Hatice Merve Altındağ, Ümran Soyogul Güner, Erkan Rayaman, Pervin Rayaman, Esra Dalkılıç. Farklı Molekül Ağırlıklı Kitosanın *Helicobacter pylori* Üzerine Antimikrobiyal Aktivitesi (poster sunumu, P-072). 2. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 27-29 Kasım, 2015.

10.ÖZGEÇMİŞ

Adı	Hatice Merve	Soyadı	Altındağ
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	08.12.1989
Uyruğu	T.C	Tel	0553 626 09 30
E-mail	mervealtindag@marun.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	
Lisans	Balıkesir Üniversitesi-Fen Edebiyat Fakültesi-Biyoloji	2010
Lise	Sağmalcılar Lisesi	2006

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Eczane Teknisyeni	Medical Park Bahçelievler Hastanesi	2013-2014
Provizyon Görevlisi	Compugroup Medical Türkiye	2014-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Orta	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	71,580	70.163	67,241

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word, Excel, Power Point	Çok iyi