

**T.C.**  
**RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

*Helicobacter pylori* **KARAKTERİZASYONU, BAL VE**  
**PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN BAKTERİ VE ÜREAZİ ÜZERİNE**  
**İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**CEMRE TARAKÇI**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. ŞENGÜL ALPAY KARAOĞLU**

**II. DANIŞMANI**

**DOÇ. DR. NİMET BALTAŞ**

**TEZ JÜRİLERİ**

**PROF. DR. SEVGİ KOLAYLI**

**DR. ÖĞR. ÜYESİ YEŞİM AKTÜRK DİZMAN**

**DR. ÖĞR. ÜYESİ MELTEM MALKOÇ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RİZE-2018**

**Her Hakkı Saklıdır**

T.C.  
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Helicobacter pylori* KARAKTERİZASYONU, BAL VE PROPOLİS  
ÖRNEKLERİNİN BAKTERİ VE ÜREAZİ ÜZERİNE İNHİBİSYON  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU danışmanlığında Cemre TARAKÇI tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 05/07/2018 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**Unvanı Adı Soyadı**

**İmzası**

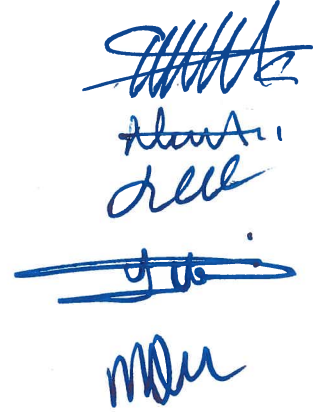
Başkan : Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

Üye : Doç. Dr. Nimet BALTAŞ

Üye : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yeşim AKTÜRK DİZMAN

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Meltem MALKOÇ



Doç. Dr. Ferhat KALAYCI  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



## ÖNSÖZ

Çeşitli bölgelerden elde edilen propolis ve bal örnekleri ile oluşturulan ekstraktların, mide kanserini tetikleyen etkenlerden biri olduğu anlaşılan *Helicobacter pylori* üzerine etkinliğinin araştırıldığı bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır.

*H. pylori* tedavisinde yeni alternatifler arayan ve çeşitli çözüm yollarının denenip çözüm bulunmasına olanak sağlayacak bu çalışmayı yapmama olanak sağlayan, yüksek lisans öğrenimim boyunca, tez aşamasının her anında önerilerini ve paylaşımlarıyla yardımını, desteğini, bilgi ve birikimlerini esirgemeyen çok değerli danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na ve Doç. Dr. Nimet BALTAŞ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarımnda her zaman yanımda olan güler yüzü ile yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Gökhan VEYİSOĞLU'na tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, verdiğim kararlarda desteklerini her zaman arkamda hissettiğim, bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan canım aileme; annem Aymelek, dayılarım Hacı Osman ve Ekrem, dedem Sami, anneannem Aynur ve iki parçadan oluşan ailemi tamamlayan yengem Güller ile kuzenlerim Asena ve Cengizhan'a sonsuz teşekkürler.

Hazırlanan bu Yüksek lisans tezi TÜBİTAK tarafından 114Z370 nolu proje ile desteklenmiştir.

**Cemre TARAKÇI**

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Helicobacter pylori* karakterizasyonu, bal ve propolis örneklerinin bakteri ve üreazı üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması” başlıklı bu tezin, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 05/07/2018



Cemre TARAKÇI

**Uyarı:** Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

### ***Helicobacter pylori* KARAKTERİZASYONU, BAL VE PROPOLİS ÖRNEKLERİNİN BAKTERİ VE ÜREAZI ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Cemre TARAKÇI**

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi  
Danışman: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU**

Bu çalışmada ülkemizin farklı illerinden temin edilen toplam 30 adet bal ve propolis örneklerinin, mide ülseri bakteriyel etkeni olan *Helicobacter pylori*'ye karşı antimikrobiyal ve anti-ürez aktivitesinin belirlenmesi amaçlandı. Mide ülseri şikayeti olan hastalardan alınan mide biyopsi örneklerinden elde edilen *H. pylori* suşları ve standart HP J99 suşu uygun besi ortamı ve şartlarında üretildi. HP1, 11 ve 13 suşlarının dört farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları disk diffüzyon metodu ile test edildi. Yalnızca HP11 suşunun norfloksasine karşı dirençli olduğu belirlendi. Bal örneklerinin tümünün *H. pylori*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesinin var olduğu gözlenirken en güçlü aktivite Kırklareli'den temin edilen sarmaşık balında (60 mm zon çapında) gözlemlendi. HP9'un bal örneklerine karşı nispeten dirençli bir suş olduğu belirlendi. Karaçalı, meşe, kekik ve hayit ballarında da güçlü anti-*Helikobakter* aktivitesi belirlendi. Propolis örneklerinin tümünde genel olarak çok yüksek anti-*Helikobakter* aktivitesi belirlendi. En yüksek etkinlik Ereğli'den (P11) temin edilen numunede (47 mm) gözlenirken bunu sırasıyla P15, P12, P13, P14 ve P6 örnekleri izledi. Elde edilen değerler 2,67 ile 18,12 mg/mL olarak ölçüldü. Kırklareli'den temin edilen sarmaşık (B10) balında en düşük değer (2,67±0,11) belirlendi. Diğer bütün bal örneklerinin AA standartına göre IC<sub>50</sub> değeri <25,32±0,23 olarak gözlemlendi. Propolis örneklerinde tümünde güçlü anti-ürez aktivite belirlendi. En yüksek inhibisyon P11-15 arası örneklerde gözlemlendi. Hem bal hem de propolis örneklerinde en yüksek antimikrobiyal ve anti-ürez aktivitesinin aynı örneklerde gözlenmesi iki ayrı testin birbirini doğruladığını gösterdi. Bal ve propolis örneklerinin *H. pylori* enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir alternatif olabileceği sonucuna varıldı.

**2018, 68 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Helicobacter pylori*, Antimikrobiyal, Anti-ürez, Bal, Propolis

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF *Helicobacter pylori*, RESEARCH OF INHIBITION EFFECTS OF HONEY AND PROPOLIS SAMPLES ON BACTERIA AND UREASE

Cemre TARAKÇI

Recep Tayyip Erdoğan University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology  
Master Thesis  
Supervisor: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU

In this study, it was aimed to determine the antimicrobial and antibiotic activities of *Helicobacter pylori*, a bacterial effect of gastric ulcer in total 30 honey and propolis samples obtained from different sources in our country. *H. pylori* strains obtained from gastric biopsy specimens taken from patients with stomach ulcer complaints and standard HP J99 strains were produced under appropriate conditions. Sensitivities of HP1, 11 and 13 strains to four different antibiotics were tested by disk diffusion method. Only HP11 strains were found to be resistant to norfloxacin. All of the honey samples were found to have antimicrobial activity against *H. pylori*, while the strongest activity was observed in ivy (60 mm zone diameter) obtained from forties. HP9 was found to be a relatively resistant strain against honey samples. Strong anti-helicobacter activity was also detected in shrubs, oak, cow and hay. Overall, very high anti-helicobacter activity was detected in all of the propolis samples. The highest activity was observed in the sample (47 mm) obtained from Ereğli (P11), followed by P15, P12, P13, P14 and P6 samples respectively. The values obtained were measured as 2.67 to 18.12 mg / mL. The lowest value ( $2.67 \pm 0.11$ ) was determined in the vine (B10) obtained from Kırklareli. The  $IC_{50}$  value was measured  $<25.32 \pm 0.23$  according to the AA standard of all other honey samples. Strong anti-urease activity was detected in all of the propolis samples. The highest inhibition was observed in the samples from P11-15. In both honey and propolis samples, the highest antimicrobial and anti-urease activities were observed in the same specimens, indicating that the two separate tests were correct. It was concluded that honey and propolis samples may be an important alternative in the treatment of *H. pylori* infections.

2018, 68 pages

**Key words:** *Helicobacter pylori*, Anti-microbial, Anti-urease, Honey, Propolis

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ .....	II
ÖZET .....	III
ABSTRACT .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLolar DİZİNİ .....	IX
SEMBOLLER ve KISALTMALAR .....	X
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. <i>Helicobacter pylori</i> Tarihçesi .....	2
1.3. <i>Helicobacter pylori</i> Sınıflandırılması .....	3
1.4. <i>Helicobacter</i> Türlerinin Doğal Ortamları .....	5
1.5. <i>Helicobacter pylori</i> Kültürel, Morfolojik, Fizyolojik ve Antijenik Özellikleri. 6	
1.5.1. Kültür ve Üreme Özellikleri .....	6
1.5.2. Görünüm ve Boyanma Özellikleri .....	8
1.6. Biyokimyasal Özellikleri .....	9
1.7. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Hücre Zari, Duvarı ve Antijenik Özellikleri .....	10
1.8. Genomik Özellikler .....	12
1.9. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonları .....	13
1.10. <i>Helicobacter pylori</i> ile İlişkili Hastalıklar .....	13
1.11. Patogenez .....	14
1.12. <i>Helicobacter</i> Enfeksiyonlarında Tanı .....	15
1.13. Epidemiyoloji .....	16
1.14. Midenin Özellikleri .....	18
1.15. Mide Anatomisi .....	19
1.16. Mide Kanseri .....	19
1.17. Arı Ürünleri ve Genel Özellikleri .....	21
1.17.1. Bal .....	21
1.17.2. Bal ve Antibakteriyel Aktivitesi .....	23
1.17.3. Propolis .....	24
1.17.4. Propolis ve Antibakteriyel Aktivitesi .....	25

1.18.	Literatür Özeti.....	26
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1.	Materyal.....	28
2.1.1.	Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar .....	28
2.1.2.	Kullanılan <i>Helicobacter pylori</i> Suşları .....	28
2.1.3.	Kullanılan Besiyerilerinin İçeriği ve Hazırlanışı .....	29
2.1.4.	Brain Heart Infusion Broth .....	29
2.1.5.	Brucella Agar ve Broth .....	29
2.1.6.	Urea Base Agar ve Broth .....	30
2.1.7.	Üreaz Enzim İnhibisyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	31
2.1.8.	Kullanılan Kimyasal Analiz Yöntemleri .....	31
2.1.9.	Oksidaz Testi .....	31
2.1.10.	Katalaz Testi .....	31
2.1.11.	Gram Boyama Seti.....	32
2.1.12.	Kullanılan Bal ve Propolis Numuneleri.....	32
2.2.	Biyopsi Örneklerinin Alınması.....	33
2.3.	Biyopsi Örneklerinin Kültürü ve Mikroskopik İncelemesi .....	34
2.4.	<i>H. pylori</i> Saf Kültürlerinin Hazırlanması ve Saklanması .....	34
2.5.	Standart Suşun Canlandırılması.....	35
2.6.	<i>H. pylori</i> Suşlarının Gram Boyama ve Mikroskopik İncelemesi.....	35
2.7.	<i>H. pylori</i> Suşlarının Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi .....	35
2.8.	<i>H. pylori</i> Suşlarının Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi .....	36
2.9.	Direkt Mikroskopi .....	36
2.10.	Üreaz Testi.....	36
2.11.	<i>H. pylori</i> Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi ve Enzimin Hazırlanması .....	37
2.12.	<i>H. pylori</i> Antibiyogram Testi .....	38
2.13.	Bal ve Etanolik Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması .....	39
2.14.	Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi.....	40
2.15.	Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi .....	40
2.16.	Bal ve Propolis Örneklerinin Üreaz İnhibisyonunun Belirlenmesi .....	40
3.	BULGULAR.....	41
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	48
6.	ÖNERİLER.....	55



KAYNAKLAR .....	56
ÖZGEÇMİŞ .....	68

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	<i>H. pylori</i> 'nin A: Işık mikroskobu (orijinal) ve B: Elektron mikroskobu görüntüsü (Owen, 1998).....	6
Şekil 2.	<i>H. pylori</i> 'nin A: Anaerobik kit ile Jar içindeki kültürü, B: Brusella kanlı agarda koloni morfolojisi ve C: Üreaz testin pozitif/negatif sonucun görünümü (orijinal). .....	7
Şekil 3.	<i>H. pylori</i> 'nin A: Martı kanadı (orijinal) ve B: Kokoid formunun mikroskopik görünümü (URL-1). .....	9
Şekil 4.	<i>H. pylori</i> global yaygınlığı (URL-2). .....	18
Şekil 5.	Midenin karın boşluğundaki yerleşimi (URL-3) ve mide mukoza katmanlarından bir kesit (URL-4). .....	18
Şekil 6.	Midenin bölümleri (URL-5) ve anatomik görünümü (URL-6). .....	19
Şekil 7.	Balın fiziksel görünüşü (URL-7), bal arısı <i>Apis mellifera</i> (URL-8) ve kovan görünümü (URL-9). .....	22
Şekil 8.	Ham propolis görünümü (URL-10) ve propolis hasadı (URL-11). .....	24
Şekil 9.	HP11 ve HP13 biyopsi (üst sıra) ve kültür (alt sıra) örneklerinin Gram boyamada direkt mikroskopik görünümünde kıvrık ve kokoid formları (100X büyütme). .....	42
Şekil 10.	Sırasıyla HP1, HP11, HP13 suşlarının Brucella ve Modifiye Agar besiyerinde görünüşleri, Üreaz besiyeri ve testi pozitifliği. ....	43
Şekil 11.	HP1 ve HP13 antibiyogram görünüşleri .....	44
Şekil 12.	Bal örneklerinin antimikrobiyal aktivitesi. ....	45
Şekil 13.	Sırasıyla <i>H. pylori</i> HP1 ve HP13 suşlarına karşı propolis örneklerinin inhibisyon etkinliği. ....	46

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b>	<i>Helicobacter pylori</i> Taksonomisi (Yula, 2009).....	4
<b>Tablo 2.</b>	Farklı canlılarda bulunan bazı <i>Helicobacter</i> türleri ile bakteri-konak tropizmi (Balcılar, 2009). ....	5
<b>Tablo 3.</b>	Bazı <i>Helicobacter</i> türlerinin karakteristik özellikleri .....	10
<b>Tablo 4.</b>	<i>H. pylori</i> 'nin bazı yapısal özellikleri ve etkinlikleri (Balcılar, 2009).....	12
<b>Tablo 5.</b>	Genom sekansı tanımlanan <i>H. pylori</i> 26695 <i>H. hepaticus</i> ATCC 51449 ve J99 suşlarının kıyaslanması .....	13
<b>Tablo 6.</b>	<i>Helicobacter pylori</i> ile ilişkili hastalıklar .....	14
<b>Tablo 7.</b>	<i>H. pylori</i> enfeksiyonu tanısında kullanılan testler ve genel özellikleri.....	16
<b>Tablo 8.</b>	Balın içeriğini oluşturan başlıca bileşenler (Doğaroğlu, 2004). ....	23
<b>Tablo 9.</b>	Propolislerin genel yapısal bileşenleri .....	25
<b>Tablo 10.</b>	Çalışmada kullanılan bal, propolis örnekleri ve temin edilen iller .....	33
<b>Tablo 11.</b>	Kullanılan antibiyotikler, MIC değerleri ve zon çapları. ....	38
<b>Tablo 12.</b>	Biyopsi örneklerinde <i>H. pylori</i> varlığının direk mikroskopik, kültürel ve biyokimyasal testlerle belirlenmesi. ....	41
<b>Tablo 13.</b>	<i>H. pylori</i> suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıkları .....	43
<b>Tablo 14.</b>	Bal örneklerinin <i>H. pylori</i> suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri. ....	44
<b>Tablo 15.</b>	Propolis örneklerinin <i>H. pylori</i> suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri.....	46
<b>Tablo 16.</b>	Propolis örneklerinin <i>H. pylori</i> büyüme ve üreaz inhibisyon değerleri.....	47
<b>Tablo 17.</b>	Bal örneklerinin <i>H. pylori</i> büyüme ve üreaz inhibisyon değerleri. ....	47

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
G	Gram, Dünyanın Yerçekimi İvmesi
Kg	Kilogram
ml	Mililitre
Mm	Milimetre
Mg	Miligram
Vb	Ve benzeri
Vd	Ve diğerleri
LPS	Lipopolisakkarit
GİS	Gastrointestinal Sistem
HP	<i>Helicobacter pylori</i>
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
H <sub>2</sub> S	Hidrojen Sülfür
NH <sub>4</sub>	Amonyum
PFGE	Pulsed-Field Jel Elektroforezi
RFLP	Restriksiyon Fragment Lengt Polymorphism
RAPD	Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
LPS	Lipopolisakkarit

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1. Giriş

*Helicobacter pylori*, bazı yüksek yapılı primatlar ve özellikle insan mide mukozasına yerleşim göstererek dünya nüfusunun yarısını enfekte eden bir bakteridir. Gastrik adenokarsinoma, gastrik ülser ve mukoza ile ilişkili lenfoid dokuda oluşan otoimmün gastrit ve B hücre lenfoması gibi sindirim sistemi ile ilişkili patolojilere sebep olan önemli bir patojendir. Bu patojenin midenin alt bölümünde kanser oluşumu riskini yaklaşık 6 kat arttırdığı yıllardır yapılan çalışmalar sonucunda ortaya konulmuştur. Ancak son birkaç yıl içerisinde yapılan çalışmalar milyonlarca insanın bu bakteri ile enfekte olmasına rağmen kanser gelişmeme sebebini, mide kanseri oluşumunda başka faktörlerin de etkili olduğu fikrini ortaya atmıştır (Eslick vd., 1999; Parsonnet ve Forman, 2004).

*H. pylori* enfeksiyonunun hangi yollarla ve nasıl kazanıldığı konusunda yeterli bilgi bulunmamakla birlikte genellikle çocukluk çağında, aile içi bulaş yolu ile edinildiği ve enfeksiyonun yaşam boyu sürdüğü düşünülmektedir. Bakterinin yayılmasında hijyenik şartların uygun olmaması nedeniyle fekal-oral ve oral-oral yolu ile bulaş oldukça önemlidir. Gastroduodenoskopi esnasında bakteri ile enfekte olmuş hastalardan alınan biyopsilerde kullanılan endoskopların yeterli süre dezenfekte edilmemesi de bakterinin hastadan hastaya bulaşına sebep olmaktadır (Forman, 1992).

Böylesine yaygın olarak görülebilen bu patojenin sebep olduğu hastalıkların yol açtığı iş gücü kaybından ötürü günümüzde *Helicobacter pylori* önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmiş ve Temmuz 1994'te IARC tarafından yerleşim gösterdiği bölgelerdeki hücrelerde kanserleşmeyi tetikleyen unsurlardan biri olduğu belirtilerek Grup 1 insan karsinogeni olarak kabul edilmiştir (Hansen vd., 1999).

Bu patojenin tedavisinde ikili ve üçlü antibiyotik kombinasyonlarının kullanımı oldukça yaygın olmakla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalarda bakteride direnç gelişimi olduğu ve giderek arttığı bildirilmiştir (Brook vd., 1995). Bu nedenle bakteriye karşı etkili yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

## 1.2. *Helicobacter pylori* Tarihçesi

*Helicobacter pylori* ve *Helicobacter* cinsine ait diğer enterohepatik ve gastrointestinal türleri biyoloji tarihindeki ilk canlı organizmalar kadar eskidir. İnsanlığın evrimleşmeye başladığı yıllardan çok daha eski dönemlerde ortaya çıktığı kabul edilen bakterinin, bu dönemlerde yaşamış ilk primatlar ve büyük memelilerin gastrointestinal sistemlerine yerleştiği ve bulaş yolları vasıtasıyla günümüze kadar varlığını sürdürdüğü tahmin edilmektedir (Wirth vd., 2004). 20. yy. başlarında yapılan çalışmalar ile Avrupa'daki patoloğların çoğu gastrik mukozada bulunan birçok spiral şekilli mikroorganizmayı tanımlamıştır. Mide biyopsi örneklerini inceleyen bilim adamları Bottcher ve Letulle (1875), midede oluşan ülser bölgesinin tabanında ve kenarlarında bakterilere rastlamıştır. Gördükleri bu bakterilerin midede oluşan bu hasara sebep olabileceklerini iddia ederek bir bakteri ile mide ülseri arasındaki muhtemel ilişkiye ilk dikkat çeken bilim insanı ünvanını almışlardır. Jaworski (1889), otopsi yaptığı kişilerin mide yıkaması sonrasında elde ettiği örneklerde spiral şekilli organizmaları ayrıntılı olarak tanımlamıştır. Jaworski gördüğü bu organizmaların daha önce incelediği diğer basillerden farklı olarak düzenli sarmallar halinde bulduklarını belirtmiş ve mide ile ilişkili hastalıkların oluşumunda etken olduklarını iddia ettiği bu mikroorganizmaları *Vibrio regula* olarak adlandırmıştır. Bu nedenle Jaworski, gastroduodenal ve gastrointestinal sistem ile ilişkili hastalıklar konusunda bir öncü olarak kabul edilebilir.

Bizzozero (1893), tarafından yapılan bir çalışmada, köpeklerin gastrointestinal sistem örnekleri toplanmıştır. Gastrik mukoza ve salgı bezlerinde bulunan hücrelerden filtreleme yapılarak elde edilen sitoplazma örneklerinde ve bazı parietal hücrelerin vakuollerinde spiral şekilli bakterilerin var olduğu gözlenmiştir. Salomon (1896), köpek ve kedi midelerinde bulunan kolonize haldeki spiral bakterilerin farelere transfer edilmesini sağlayarak günümüzde de hala denemeleri devam eden aşı çalışmalarına ışık tutmuştur. Çeşitli araştırmacılar çalışmalarında patojenin insana dayalı hale gelmesine kadar üreazın, kedi ve köpek gibi çeşitli karnivorların midesinde çoğunlukla var olduğunu saptamıştır (Luck, 1924).

İnsanlar üzerinde yapılan deneylerde mide biyopsi örneklerinin elde edilerek histopatolojik yönden değerlendirilmesini yapan patolog Warren (1979), mide dokusundaki mukus katmanlarının arasında yoğunlaşmış spiral şekilli bakterileri fark etmişlerdir. Devam eden çalışmalarında Warren ile aynı hastanede çalışan arkadaşı Marshall, *in-vitro* ortamda üretebilmeyi başardıkları bu bakterilerle mide ülseri arasındaki ilişkiyi kanıtlayabilmek adına çalışmalarına devam etmiştir. 1983 yılında Warren ve Marshall elde ettikleri bilgileri bir dergide yayınlarak *Helicobakter*'leri bilim ve tıp dünyasına tanıtmışlardır. Marshall ve Warren biyopsi örneklerinin histolojik olarak incelenmesi esnasında gördükleri basillerin, gram negatif kıvrık *Vibrio*'ları andırmaları nedeni ile bu bakterinin elde edilmesinde *Campylobakter*'lere ait türlerin izolasyonu için kullanılan yöntemleri kullanmışlardır. Biyopsi örnekleri ile yaptıkları bu çalışmadan elde ettikleri histopatolojik sonuçlarla yetinmeyen Marshall ve Warren (1985) ile Morris ve Nicholson (1987), Koch önerilerini gerçekleştirmek adına kültüre ettikleri *H. pylori* suşlarını sıvı gıdalar ile birlikte yutmuşlardır. Birkaç gün içerisinde her iki araştırmacıda da gastrik ağrı ve yanma şikayetinde artma olmuştur. Alınan gastik biyopsi örneklerinde de midede oluşan bakteriyel hasara karşı bir akut inflamatuvar cevabın başladığı gözlenmiştir. Histopatolojik ve klinik deneyler sonucu elde edilen bulgularla her iki araştırmacıda da akut yüzeysel gastrit gelişimi var olduğu ortaya konmuş ve yaptıkları bu çalışmalar 2005 yılında Marshall ve Warren'e Nobel Tıp ödülünü kazandırmıştır.

### 1.3. *Helicobacter pylori* Sınıflandırılması

*Helicobacteraceae* familyası içerisinde yer alan mikroorganizmaların "*Helicobacter*" olarak tanımlanan yalnızca tek cinsi bulunmaktadır (Tablo 1). Filogenetik olarak *Arcobacteriler*'e yakın olmalarına rağmen 16S rRNA dizilerinde farklılık gösteren *Helicobacter* familyasının bilinen tek cinsi *Helicobacter*'dir (Yula, 2009). Bu cins içerisinde bulunan diğer mikroorganizmalar farklı hayvan türlerinin gastrointestinal sistem doku ve organlarına karşı konak tropizmi gösterirler (Tablo 2). *Helicobacter pylori* bakterisinin biyolojik özelliklerine dair bilgilere ışık tutan genomunun tamamının dizi analizi 1994 yılında yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen bilgiler hem bakterinin sınıflandırmasında hem de bakteriyel virulansın tespit edilmesi için gerekli olan moleküler çalışmaların önünü açmıştır (Falsen vd., 1991).

**Tablo 1.** *Helicobacter pylori* Taksonomisi (Yula, 2009).

<b>Taksonomik Kategori</b>	<b>Takson</b>
Alem (Domain)	Bacteria
Şube (Division / Phylum)	Proteobacteria
Sınıf (Class)	Epsilon proteobacteria
Takım (Order)	Campylobacterales
Aile (Family)	Helicobacteraceae
Cins (Genus)	<i>Helicobacter</i>
Tür (Species)	<i>Helicobacter pylori</i>

Genomik bilgilere dayalı olarak gerçekleştirilen 16S rRNA-rDNA hibridizasyon çalışmaları ile *Helicobacter*, *Arcobacter*, *Wolinella* ve *Campylobacter* gibi bakteriler süperfamilya IV'e, 16S rDNA'ya dayalı olarak yapılan filogenik analizler sonucunda ise *Helicobacter* ve diğer cinsler *Proteobacteria* cinsi bakteriler ise epsilon alt sınıfına yerleştirilmiştir. Fare çekum keselerinde yaşayan kommensal bir organizma olan *H. muradium* kültüre edilen ilk *Helicobacter* türüdür (Lee vd., 1988). *Helicobacter* cinsi içinde henüz isimlendirilme aşamasında olan ve ileri düzeydeki RNA-DNA analizleri hala devam eden tanımlanmış en az 46 tür bulunmaktadır. Bunun yanı sıra 16S rDNA hibridizasyon çalışmaları ile tiplendirilme yapılmasını bekleyen en az 100 tür debu cins içerisine dahil edilmeyi beklemektedir (Windsor vd., 2000). *Helicobacter* cinsine ait başlıca temel özellikler; kılıflı flagella sayesinde hücre hareketliliği, sıvı besiyerinde salgılanan eksternal glikokaliks ve % 35-44 arası GC yoğunluğuna sahip kromozomal DNA'dır (Owen, 2003).

*Helicobacter* cinsi şu anda adlandırılmış 28 geçerli tür içermekte, gastrik ve enterohepatik *Helicobacter*'ler olmak üzere iki büyük alt gruba ayrılmıştır (Josenhans vd., 2003). *Helicobacter* cinsine dahil olan türlerin birçoğunda konak-doku tropizmi görülmektedir. Doğada yüksek primatlar, kedi, köpek, domuz, kemiriciler ve insan da dahil olmak üzere birçok farklı canlı türünde *Helicobacter* cinsine ait bakterilerin var olduğu gösterilmiştir. Özellikle evcil hayvanlar ve kemiricilerde farklı gastrointestinal *Helicobacter* türleri tanımlanmıştır fakat sıklıkla görülen türlerinin *Gastrospirillum hominis* veya *H. heilmannii* olduğu bildirilmiştir (Fox, 2002).



**Tablo 2.** Farklı canlılarda bulunan bazı *Helicobacter* türleri ile bakteri-konak tropizmi (Balcılar, 2009).

<b>Tür</b>	<b>Konak</b>	<b>Doku</b>	<b>İlk bildirim</b>
<i>H. pylori</i>	İnsan	Mide	1985
<i>H. mustelue</i>	İnsan	GİS	1988
<i>H. cinaedi</i>	İnsan	GİS	1988
<i>H. felis</i>	Kedi	GİS	1991
<i>H. fennelliae</i>	Kedi	GİS	1991
<i>H. nemestrane</i>	<i>M. nemestrina</i>	GİS	1991
<i>H. maridarum</i>	Rodent	GİS	1992
<i>H. acinonychis</i>	Domuz	GİS	1993
<i>H. bilisimbret</i>	Fare	GİS	1993
<i>H. hepaticus</i>	Fare	Karaciğer	1994
<i>H. pametensis</i>	Kuş, Domuz	GİS	1994
<i>H. pullorum</i>	İnsan	GİS	1995
<i>H. bizzozeronii</i>	Köpek	GİS	1996
<i>H. trogontum</i>	Fare	GİS	1996
<i>H. cholecystus</i>	Hamster	GİS	1997
<i>H. rodentium</i>	Laboratuvar faresi	GİS	1997
<i>H. rappini</i>	Fare	GİS	1997
<i>H. salomonis</i>	Köpek	GİS	1997

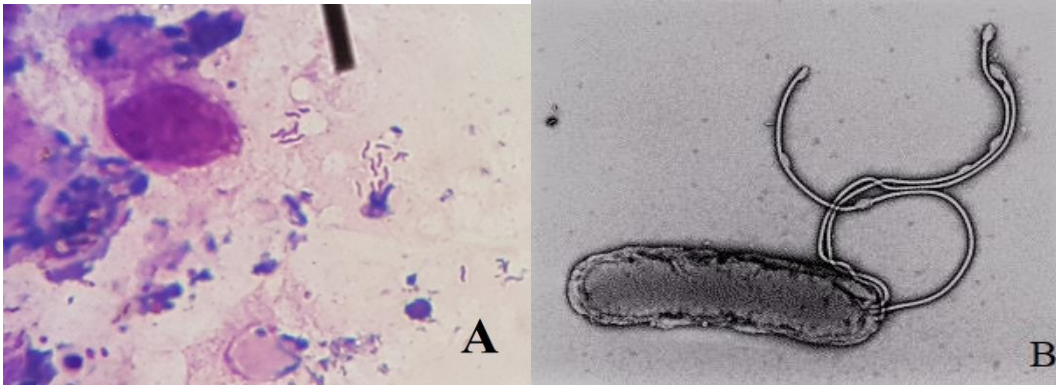
#### **1.4. *Helicobacter* Türlerinin Doğal Ortamları**

İnsan mide veya barsak mukozalarının yanı sıra *Helicobacter*'ler kedi, köpek, koyun, sığır, kemirgen ve kuşların gastrontestinal sistemine de yerleşebilirler. İnsanlarda bulunan *Helicobacter*'in mide ve gastrik alanda iritasyon gerçekleşen kısımlarında bulunan hücrelerin dışında kalan bölgelerden izolasyonu ve kolonizasyonu oldukça nadir olarak görülmekle birlikte; diş plakları, aterom plaklar ve tükürük salgısında da görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca safra kesesinde oluşan safra taşlarının oluşumu ile ilişkili oldukları yapılan moleküler çalışmalarla ispatlanmıştır (Fox, 1998). Aynı zamanda *H. pullorum* ve *H. cholecystus*'unda safra yolları ve karaciğere yerleşerek kolonize olduğu ileri sürülmüştür (Suzuki vd., 2007).

*Helicobacter*'lerin *in-vitro* şartlara aşırı duyarlı olduğu bilinmektedir. Bu sebeple doğadan elde edilen toprak, akarsu ve deniz suyu gibi çevresel kaynaklı örneklerden deneysel çalışmalar dışında bakterinin herhangi bir izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Ancak çevresel kaynaklı bu örneklerde PCR gibi yöntemler kullanılarak bakterinin hedef gen dizilerinin var olduğu gösterilmiş, fakat elde edilen bu sonuçlar ışığında *H. pylori* bakterisinin doğadaki ortamlarda canlı kalıp kalamadığı veya ne kadar süre canlı kaldıkları belirlenememiştir (Goodwin vd., 1986). *H.cinaei* gibi bazı enterohepatik türlerin, birçok memeli türü ile birlikte insan, kuşve kemirgenlerin bağırsaklarına, kolonik salgı bezi kriptlerine ve mukus katmanlarının birleştiği kısımlara yerleşerek enfeksiyona sebep olduğu bildirilmiştir (McNeil vd., 2002).

### 1.5. *Helicobacter pylori* Kültürel, Morfolojik, Fizyolojik ve Antijenik Özellikleri

*H. pylori* basitçe tanımlanması gerekirse virgül veya martı kanadı şeklinde görülen, hareketli, kapsülü olmayan, spor oluşturmayan ve üremesi için az miktarda oksijene ihtiyaç duyan mikroaerofilik kısa spiral şekilli basillerdir. *Helicobacter*'ler hücre duvarında somatik antijenik özelliği veren yan karbon zincirlerinin sayısı ve aynı zamanda yapısı ile diğer gram negatif bakterilerden farklı olmalarına rağmen de gram negatif bakterilerdir (Goodwin ve Worsley, 1993).



**Şekil 1.** *H. pylori*'nin A: Işık mikroskobu (orijinal) ve B: Elektron mikroskobu görüntüsü (Owen, 1998).

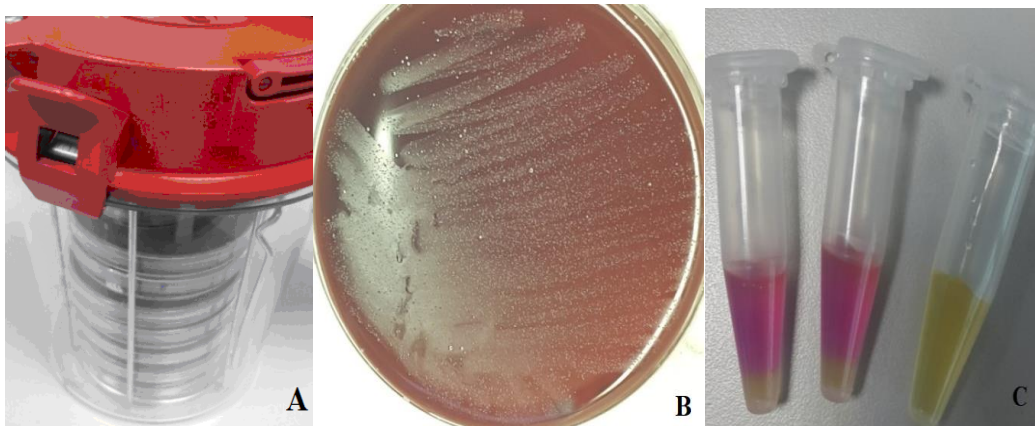
#### 1.5.1. Kültür ve Üreme Özellikleri

Doku örnekleri incelendiğinde spiral şekle sahip olmalarına rağmen kültüre edildiklerinde basil görünümünde, kıvrık küresel şekilde bulunan *H. pylori* örneklerinin

biyopsiden doğrudan kültüre edilmesi mümkündür. Alınan biyopsi örneği anında kültüre edilemeyecekse Nutrient broth, Brucella broth, Beyin-Kalp İnfüzyon broth gibi taşıma besiyerleri kullanılmalıdır. Ekimin ardından inkübasyon nemli, 37 °C, % 5-10 oranında CO<sub>2</sub> içeren mikroaerobik ortamda yapılmalıdır (Dzierzanowska, 2005).

*In-vitro* şartlarda zenginleştirilmiş modifiye besiyerlerinde optimal üremenin gerçekleşebilmesi için besiyerinin pH'sı 7,2 olmalıdır (Goodwin ve Worsley, 1993). Üremenin sağlanabilmesi için % 7-10 oranında eskitilmiş at kanı, % 1 izovitaleks, % 0,25 maya ekstraktı içeren Brucella agar, Çikolata agar, Beyin Kalp İnfüzyon agar, Colombia ve Skirrow agar gibi zenginleştirilmiş modifiye besiyerleride kullanılabilir (Humberto vd., 2003). Ayrıca besiyerlerine yapılan hemin, serum, nişasta, kömür gibi ilaveler üremeyi artırırken, *C. jejuni* üremesini artırmak amacı ile ilave edilen ferrözsülfat-sodyummetabisülfid-sodyumpürivat'daki bisülfid'in, safra tuzlarının ve koyun kanının *H. pylori*'nin üremesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Vega vd., 2003).

*H. pylori* asidofilik bir bakteri olmamasına rağmen midenin asitli ortamında mide mukozasına tutunup kolonize olarak üreyebilmektedir. Optimum üreme pH'ları 6,9-7,6 olan bakterinin oldukça geniş pH (5-8) aralıklarında üreyebildiği görülmektedir. Midenin parietal hücrelerin yer aldığı oksintik kanalların içerisinde pH 1-1,5'e kadar düşer. Bakterinin böylesine asidik bir ortamda üreyebilmesi bakterinin güçlü üreaz aktivitesine ve hücre membranında çok kısa sürede gerçekleştirdiği adaptif değişikliklere bağlıdır (Dunn vd., 1997).

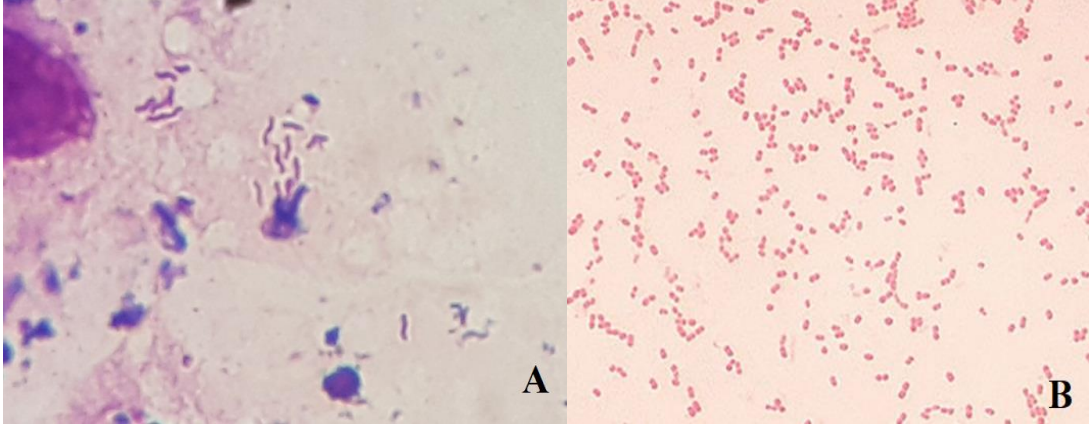


**Şekil 2.** *H. pylori*'nin A: Anaerobik kit ile Jar içindeki kültürü, B: Brusella kanlı agarda koloni morfolojisi, C: Üreaz testin pozitif/negatif sonucun görünümü (orijinal)

*Helicobacter pylori* kültüründe en iyi sonuç 7 günlük inkübasyon süresi sonunda elde edilir ve inkübasyon sonrasında kanlı agarlı besiyerlerinde düzgün, pigmentsiz, 0,5–2 mm çapında saydam su damlasına benzer koloniler oluşur. Bir haftadan daha uzun süre inkübasyona tabi tutulan besiyerlerinde ise *H. pylori* kolonilerinin çapı 2 mm'yi geçebilir. *İn-vitro* şartlarda bakteri 3-4 pasaj yapıldıktan sonra canlılığını kaybeder. *H. pylori* izolatları % 0,25 maya ekstraktı, % 10 at kanı ve % 15 gliserol içeren Beyin Kalp İnfüzyon besiyerinde -70 °C de aylarca korunabilir veya liyofilize halde +4 °C'de saklanabilirler (Dunn vd., 1997).

### 1.5.2. Görünüm ve Boyanma Özellikleri

*H. pylori* 0,5-1,0 µm eninde, 2,5-5,0 µm boyunda, küt ve yuvarlak uçlu, unipolar kılıflı flagellalı, üremek için 33-40 °C ve pH 6,9-8 arasında olduğu, üremesi için hafif alkali bir ortama gereksinim duyan mikroorganizmadır (Worsley,1993). Mukus ve epitel yüzeyinden elde edilerek hazırlanan bakteriyal preparatlarda balık sürüleri halinde, nispeten daha uzun ve kıvrımlı bir görünüm baskınken, besiyerinde üretilmiş kolonilerden elde edilen preparatlarda nadir olarak spiral şekilli formlar, sıklıkla da kısa, kıvrımlı ve tekli basil formlar şeklinde görülürler. Antibiyotik kullanımı sonrasında oksidatif strese maruz bırakılmış gastrik doku örnekleri veya dışkı örneklerinden hazırlanan preparatlarda ise düzensiz çubuklar veya kokoid formdaki şekillerde görülürler. Dormond form olarak tanımlanan kokoid formdaki bakterilerin *in-vivo* şartlarda ürediklerinde tekrar spiral şekle dönerek çoğalıp çoğalmadıkları ise hala tartışılmaktadır (Goodwin ve Worsley, 1993). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarla bakterinin mikro çevrenin şartlarına bağlı olarak dinamik ve değişken durumlara adapte olabilen bir biyolojiye sahip olduğu kanıtlanarak, oluşan bu farklı formların reaktivasyonlardan sorumlu olabileceğine dair güçlü kanaat oluşmuştur (Dworkin vd., 2006).



**Şekil 3.** *H. pylori*'nin, A: Martı kanadı (orijinal) ve B: Kokoid formunun mikroskobik görünümü (URL-1).

*Campylobacter* türlerinin aksine *Helicobacter*'lerin çoğunluğunda özellikle *H. pylori*'de, flagellalarda kılıf bulunur ve flagellaların uç kısımlarında topaça benzeyen bir şişkinlik vardır. Sahip olduğu bu yapı bakterinin gastrointestinal sistemdeki gastrik mukus gibi viskoz ortamlarda kolay şekilde hareket etmesini sağlar. *H. pullorum* ve *H. rodentium* gibi bazı *Helicobacter* türlerinin ise kılıfsız flagellaları vardır (Stanley vd., 2006).

*H. pylori* kültürden alınan örneklerinin Gram boyanmasının yanı sıra, dokudan alınan kesit örneklerinin incelenmesi gibi durumlarda ayırt edilebilirliğinin sağlanabilmesi açısından çeşitli histolojik boyalar yardımıyla boyanabilmektedir. Bu boyalar; Hematoksilen-Eozin, Modifiye Giemsa, Warthin-Starry gümüş boyası, Akridin oranj (floresan boya), Cresil-fast Moru, Gimenez ve Brown-Hopps moru gibi çeşitli histolojik boyalardır ve bakterinin farklı durumlarda farklı renklerde boyanmasına olanak sağlarlar (Dunn vd., 1997).

### 1.6. Biyokimyasal Özellikleri

*Helicobacter* cinsine ait bakteri türlerinin biyokimyasal aktiviteleri oldukça düşüktür. *H. canis* ve *H. winthamensis* dışında kalan türler güçlü oksidaz ve katalaz aktivitesi gösterirken, geriye kalan bütün türler DNaz, lösinaminopeptidaz ve gama-glutamilaminopeptidaz aktivitesine sahiptir. Ancak oksidaz, katalaz ve üreaz gibi birkaç enzimatik aktivite dışında, diğer bakterilerin tanısında kullanılan klasik biyokimyasal ve enzimatik testlerin çoğu *Helicobacter* türlerinde aktivite olmasına rağmen *in-vitro*

şartlarda tanı amaçlı olarak kullanılamaz (Yula, 2009). Diğer taraftan nitratların nitrite indirgemeleri, alkalin fosfataz, üreaz, indoksil asetat hidrolizaz, gama-glutamil transpeptidaz aktiviteleri, 42 °C’de üreme, nalidiksik asit ve sefalotine duyarlılık gibi özellikler de tür tanımının yapılmasında kullanılmaktadır (Tablo 3).

*H. pylori* karbonhidratları oksidatif ve fermentatif yollarla parçalayamaz. Oldukça güçlü bir üreaz, katalaz ve alkalin fosfataz aktivitesine sahiptir, nitratları redükte edemez, sülfürlü bileşikler kullanarak H<sub>2</sub>S oluşturabilir, hippuratu hidrolize edemez, nalidiksik aside dirençli ve sefalotine duyarlıdır (Goodwin ve Lee, 1993).

**Tablo 3.** Bazı *Helicobacter* türlerinin karakteristik özellikleri.

Türler	Kat	NR	Alk	Ür.	In	42°C	G	NA	SE	FL.S	FL.Y	GC
<i>H. felis</i>	+	+	+	+	-	+	-	R	S	14-20	B	42
<i>H. bizzozeroni</i>	+	+	+	+	+	+	-	R	S	10-20	B	ND
<i>H. pylori</i>	+	-	+	+	-	-	-	R	S	4-8	B	37-39
<i>H. canis</i>	-	-	+	-	+	+	-	S	I	2	B	48
<i>H. bilyi</i>	+	+	ND	+	-	+	V	R	R	3-14	B	ND

Kat: Katalaz; NR: Nitrat redüksiyonu; Alk: Alkalinefosfataz; Ür: Üreaz; Ind.: İndoxylasetat Hidrolizi; G: Glisin; In: İndol, NA: Nalidiksik asit; SE: Sefalotin, FL.S: Flajella sayısı; FL.Y: Flajella yerleşimi; GC: Guanine-sitozinoranı; (+): Pozitif reaksiyon; (-): Negatif reaksiyon; S: Duyarlı; R: Dirençli; I: Orta duyarlı; ND: Belirlenmemiş; V: Değişken; B: Bipolar

### 1.7. *Helicobacter pylori*'nin Hücre Zarı, Duvarı ve Antijenik Özellikleri

*Helicobacter* cinsine ait türlerin hücre duvarında bulunan protein ve aynı zamanda yağ asitlerinin dağılımı kendileri gibi gram negatif olan diğer bakterilerden özellikle de *Campylobacter*'lerden oldukça farklılık gösterir. Ancak hücreye somatik antijenik özellik kazandıran lipopolisakkaritlerin varlığı, ince peptidoglikan tabakadan meydana gelen yarı geçirgen dış duvarın olması ve fosfolipitlerce zengin sitoplazmik membran sebebiyle tipik gram negatif bakteri özelliği gösterirler (Jones vd., 1984). Lipit içeriklerine bakıldığında ağırlıklı olarak % 73,4 oranında fosfolipitlerden, % 20,6 oranında glikolipitlerden ve % 6'lık kısım ise nötral lipitlerden oluşmaktadır. Hücresel yağ asitleri arasında % 31-45 oranıyla en çok rastlanılan miristik asit ve % 20-24 oranıyla karbon siklopropan yağ asitidir. Bulundurduğu majör fosfolipidler ise fosfatidiletanolamin, kardiyolipin ve fosfatidilgliserol'dür (Eldridge vd., 1984).

*H. pylori* LPS'leri incelendiğinde içerdiği Lipid A'nın yapısında sürekli mutasyonlar görüldüğü bildirilmiş ve diğer gram negatif bakterilerden önemli farklılıklar gösterdiği kanıtlanmıştır (Walsh vd., 1997). *H. pylori* suşlarında Lipid A'nın yapısında birçok bakteriden farklı olarak 3-hidroksi dekanoik asit bulunmaz. Buna karşılık olarak alışlagelmişin dışında biyolojik yönden daha düşük aktivitelere sahip fosforillenmiş veya açillenmiş yağ asitleri bulunur. Bakıldığında bu yağ asitleri genel anlamda LPS'nin düşük biyolojik aktivitesinden sorumlu tutulmaktadır (Moran vd., 1997).

*H. pylori*'nin özellikleri en iyi tanımlanmış ve dış zarına yerleşmiş proteinleri porinlerdir. Şimdiye kadar 5 porin proteini belirlenmiş, fonksiyonel olarak karakterizasyonu yapılmış ve HopA'dan HopE'ye kadar isimlendirilmesi yapılmıştır (Richard vd., 2000). Anyon ve katyonlar için düşük düzeyde seçicilik gösteren bu porin proteinleri içleri su dolu non-spesifik kanallardır. Bu kanallar hidrofilik moleküllerin, besinlerin ve bazı antibiyotiklerin bakteriyel dış zardan pasif geçişine izin verirken, kanalların kaybedilmesi hidrofilik antibiyotiklere karşı direnç gelişimine sebep olur (Hessey vd., 1990). *H. pylori* bakterisinin ultrastrüktürel yapısı 1 ile 8 arasında bulunan unipolar kılıflı flagellaları ile karakterizedir. Türler içerisinde korunmuş olan bu flagellar kılıfın epitoplardan bakterinin konak immün sisteminden etkilenmeden kaçabilmesinde ve mide ortamındaki asitliğe direnci arttırmada rol oynadıkları düşünülmektedir (Alm, 1999). *H. pylori*'nin virulans ve patojenitesinde önemli rol oynayan bazı proteinler ve işlevleri Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 4.** *H. pylori*'nin bazı yapısal özellikleri ve etkinlikleri (Balcılar, 2009).

Özellik	Etki
Spiral şekil	Mukus içerisinde hareketi sağlar.
Flagella	Bakteri hareketinin etkin şekilde oluşumunu sağlar.
Lipopolisakaritler; GM3 gangliozid ve Lewis B antijenlerine özgül bağlanmayı sağlar.	Gastrik mukus salgılayan hücrelere selektif kolonizasyon
Üreaz A ve B	Gastrik ortamdaki varlığını sürdürme (bazı deneysel çalışmalarda amonyağın epitel hücresine toksik etkisi gösterilmiştir)
Katalaz	Gastrik ortamda ve fagositik vakuollerde (Hidrojen peroksitten korunarak) yaşama
Fosfolipaz A ve B	Mukusun epitelial hücre membranını sindirimi, mukus salgısının ıslaklığının artışı
Proteaz	Mukusun ve epitelial hücre membranını sindirimi, mukusun eriyebilirliğinin artışı.
Vakuol yapıcı sitotoksin (Vac A)	Epitel hücresi zararlanması
Düşük molekül ağırlıklı kemoatraktif proteinler (porinler)	Nötrofil ve mononükleer hücreleri kendine çekerek reaktif oksijen bileşiklerini ve interlökinlerin salınması
Cag A (Cytotoxin Associated gen A)	Sitotoksin oluşumu ve peptik ülserle ilişkili olduğu düşünülüyor.
Isı şok proteinleri (Hsp A ve B)	Otoimmünitede rol oynar.

## 1.8. Genomik Özellikler

*H. pylori*'nin sahip olduğu genomik yapı ve çeşitlilik PFGE, Ribotipleme, RAPD-PCR ve PCR-RFLP gibi teknikler yardımıyla incelenerek suşlar arasındaki nükleotitlerin oldukça fazla çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir (Dawn, 2001).

Tomb vd. (1997), *H. pylori*'nin 26695 nolu suşunun tam genom dizisinin bildirilmesiyle genomik yapı hakkında ki bilgilerde hızlı bir artış gerçekleşmiştir. Toplam 1.667.867 baz çiftine ve % 39 GC oranına sahip tek bir halkasal yapıda kromozoma sahip olan bu suş toplam 1590 gen ve her biri ortalama 1049 baz çifti taşımaktadır. Çalışmamızda kullanılan *H. pylori* J99 suşu ve bazı ATCC tip suşlarının genomik özellikleri Tablo 5'te verilmiştir.



**Tablo 5.** Genom sekansı tanımlanan *H. pylori* 26695 *H. hepaticus* ATCC 51449 ve J99 suşlarının kıyaslanması.

	<i>H. pylori</i> 26695	J99	<i>H. hepaticus</i> ATCC 51449
Baz çifti	1.667.867	1.643.631	1.799.146
% G/C	39	39	35,9
<b>Gen kopyaları</b>			
23S-5S rRNA	2	2	1
16S rRNA	2	2	1
Tahmini kodlanan sekanslar	1590	1496	1825
Fonksiyonu belirlenmiş protein	899	877	1022
Fonksiyonu belirlenmemiş protein	325	347	487

### 1.9. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonları

*H. pylori* insanlarda sıklıkla midenin antrum ve korpus bölgelerinde asemptomatik olarak kolonize olabilen nadir mikroorganizmalardandır. *H. pylori* enfeksiyonları, konağın özellikleri, beslenme alışkanlıkları, genetik özellikleri, enfekte eden suşun sayısı ve varsayılan virülans faktörleri, yerleşim alanı, reenfeksiyon veya reaktivasyon sayısı ile tedavi başarısızlıkları gibi değişkenlere bağlı olarak, subklinik bir enfeksiyondan gastrik kanserlere kadar değişen geniş bir gastroduodenal patolojiye sebep olurlar (Yula, 2009).

### 1.10. *Helicobacter pylori* ile İlişkili Hastalıklar

*H. pylori*'nin neden olduğu klinik patolojileri Tablo 6'de gösterildiği gibi gastrointestinal sistem hastalıkları ve gastrointestinal sistem dışı hastalıkları olarak iki ana başlığa ayırabiliriz (Goodwin vd., 1993).

Son yıllarda yapılan araştırmalar akut ya da kronik viral ve bakteriyel enfeksiyonlarla bazı idiyopatik hastalıkların ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yapılan gözlemlere bağlı olarak *H. pylori* enfeksiyonunun kalp-damar sistemi, deri, bağışıklık sistemi gibi sindirim sistemi dışı idiyopatik hastalıklardaki olası rolünü araştırmışlardır (Lorber vd., 2012). *H. pylori*'nin kronik aktif gastrit, peptik ülser, mide

karsinomu ve MALT lenfoması ile ilişkisi birçok araştırmada ortaya konmuştur (Marshall, 1994).

**Tablo 6.** *Helicobacter pylori* ile ilişkili hastalıklar.

<b>Gastrointestinal sistem hastalıkları</b>	<b>Gastrointestinal sistem dışı hastalıklar</b>
Gastroözefajial reflü hastalığı (GÖRH)	Kardiyovasküler sistem
Gastrit	Solunum yolları hastalıkları
Mide ülseri (MÜ)	Merkezi sinir sistemi hastalıkları
Peptik ülser	Deri ve yumuşak doku hastalıkları
Duodenal (peptik) ülser (DÜ)	Otoimmün hastalıklar
Nonülser dispepsi (NÜD)	Karaciğer ve safra yolu hastalıkları
Mide kanseri ve MALT (Mucosa Associated Lenfoid Tissue) Lenfoma	İnflamatuvar bağırsak hastalıkları

### 1.11. Patogenez

Dünya genelinde çok sayıda insanda kolonize olması *H. pylori* bakterisinin oldukça güçlü bir yayılma stratejisi oluşturduğunu göstermektedir. İnsanlarda fekal-oral yolla, ağız içi salgılarının bulaşı ile yani oral-oral yolla, ev hayvanlarından insanlara, insan-hayvan-insan yolu ile, bakteri ile kontamine olmuş çeşitli gıda ve su yolu ile kontaminasyon gerçekleştiği bilinmektedir (Falush vd., 2003).

Bakterinin midenin antrum bölgesindeki mukozada rahatça üreyebilmektedir. Midenin bu kısmında bakterinin üremeyi sevmesinin nedeni, mukus salgısı yapan yerlerde daha kolay şekilde üreyebilmesidir. *H. pylori* midenin bu bölgesinde herhangi bir doku invazyonuna sebep olmadan yüzeye tutunarak çoğalır ve yaşar (Hocker ve Hohenberger, 2003). Mide mukozasını örten mukus tabakasındaki nötrale yakın pH, bakterinin yaşamasını olanaklı hale getirir. Ancak bakterinin sahip olduğu yetenekler arasında gastrointestinal sistemin özellikle intestinal mukozasında üreyebilme yeteneği yoktur (Forman, 1991).

*H. pylori*, salgıladığı üreaz enziminin aktivitesi sonucu CO<sub>2</sub> ve NH<sub>4</sub> oluşturarak mide sıvısı içindeki düşük pH'dan kendini korumayı başarmaktadır. NH<sub>4</sub>, mide epitel hücreleri için toksik bir bileşiktir, hücreler arasında tutunmayı azaltır ve etkenin

salgıladığı sitotoksinlerin etkisini artırır. Öte yandan, mukus salgılayan hücreler üzerindeki sitotoksik etki, koruyucu mukus salınımını azaltır (Blaser, 2004). Böylece bakteri bulunduğu ortama daha kolay bir şekilde tutunmaya devam ederek canlılığını sürdürür. *H. pylori*'nin duodenumda nasıl ülser yaptığı tam açıklık kazanmamış fakat antrum mukozasında yerleşen mikroorganizmanın duodenal bikarbonat salınımını engellediği, salgıladığı mediyatörler aracılığı ile de mukoza kayıplarına yol açtığı kabul edilmektedir (Graham vd., 1998).

*H. pylori* patogenezinde konak, çevre ve mikroorganizmaya ait birçok virülans faktörünün rol oynadığı düşünölmektedir. Tablo 6'da *H. pylori* patogenezi üzerinde en çok çalışılan çeşitli faktörler özetlenmiştir.

### **1.12. *Helicobacter* Enfeksiyonlarında Tanı**

*H. pylori* enfeksiyonunun gastroduodenal hastalıklar ile bazı başka hastalıklarda göz önüne alınması gereken temel konulardan biri olduğunun anlaşılması, basit ve doğru tanı testlerine duyulan gereksinimi arttırmıştır. Tanı için kullanılan testler invaziv ve non-invaziv testler olarak iki grupta toplanmıştır (Jalava vd., 1998). İnvaziv testler, endoskopik olarak elde edilen biyopsi örneğinin bakteriyoloji, üreaz testi, histolojik testler ve moleküler teknikler ile incelenmesine dayalıdır (Köksal vd., 2002). Tanıda "altın standart" olarak kabul edilmekte olan kültürün duyarlılığının % 70-95, spesifitesinin % 100 olduğu bildirilmiştir (Hachem vd., 1995).

*H. pylori*'nin tespitinde altın standart araştırmacının deneyimine göre kültür veya histopatolojik inceleme olarak tanımlanabilir. Tanıyı optimize etmek için genellikle birkaç testin birlikte kullanılması önerilmektedir (Poddar ve Yachha, 2007). Tablo 7' de çeşitli tanı testlerin genel özellikleri tanımlanmıştır.

**Tablo 7.** *H. pylori* enfeksiyonu tanısında kullanılan testler ve genel özellikleri.

Test	Sensitivite (%)	Spesivite (%)	Maliyet	Endoskopi	Yorum
<b>Histoloji</b>	90-95	95-99	++	Evet	Bakterinin düzensiz dağılımı nedeniyle çoklu biyopsi gerektirir. İnflamasyonun derecesi belirlenebilir.
<b>Kültür</b>	75-90	100	+++	Evet	Laboratuvarın deneyimine göre değişkenlik gösterir. Antibiyogram için gereklidir.
<b>Hızlı Üre Testi</b>	85-95	90-95	+	Evet	Hızlı sonuç. Antibiyotik tedavisinden sonra duyarlılık düşer.
<b>G.Biyopsi</b>	95	100	+++	Evet	İleri düzey laboratuvarlarda
<b><sup>13</sup>C nefes testi</b>	95	98-100	++	Hayır	Hamileler ve çocuklarda tercih edilebilir. Tedavinin erken dönem takibinde kullanışlıdır.
<b><sup>14</sup>C nefes testi</b>	95	90-100	++	Hayır	Düşük doz radyasyon maruziyeti. Tedavinin erken dönem takibinde kullanışlıdır.
<b>Seroloji</b>	80-95	85-95	+	Hayır	Endoskopi öncesi taramada ve epidemiyolojik kullanışlıdır. Tedavinin erken dönem takibinde önerilmez.
<b>Dışkıda antijen tespiti</b>	94	97	++	Hayır	Pediyatrik hastalarda kullanışlı. Tedavi öncesi ve sonrası aktif enfeksiyonu tespit etmeye uygun.

G. Biyopsi: Gastrik doku biyopsi

### 1.13. Epidemiyoloji

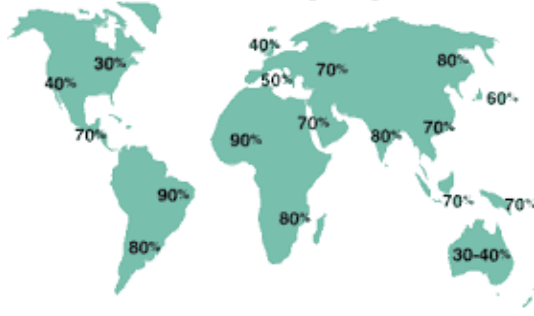
*H. pylori* varlığı bazı primatlarda da gösterilmiş fakat esas rezervuarı insan olan dünyanın en yaygın enfeksiyonlarından birisidir. Bakterinin kedilerde de görülmüş olması, bulaşta en azından evcil hayvanlarında etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca bakterinin su yoluyla bulaşması sonucunda oluşan enfeksiyonlarda görülmesi ve feçesten izole edilmesi fekal-oral bulaş da doğrulamaktadır (Borriello vd., 2006). *H. pylori*'nin prevalansının yaş ve ülkelere göre

değişiklik gösterdiği fakat kadın ve erkeklerde kolonizasyonun benzer olduğu bildirilmiştir (Megraud, 2007).

Gelişmekte olan ülkelerde enfeksiyon çocukluk çağının erken dönemlerinde edinilmekte ve 10 yaşına kadar % 50-60, erişkin dönemlerde % 90 enfeksiyon oranına kadar ulaşabilmektedir (Suerbaum ve Michetti, 2002). Ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde sosyo-ekonomik koşulların yetersizliği ve sağlıklı yaşam koşullarının sağlanamaması gibi nedenlerle 5-10 yaş arasında prevalans % 60-70 iken yetişkinlerde bu oran % 85-90'dır (Bardhan, 1997).

Gelişmiş ülkelerde çocukluk çağında çok az enfeksiyon olmakta ve bakterinin prevalansı yaşla birlikte kademeli artış (yılda % 0,5-1) göstermektedir (Pounder, 1995). 20'li yaşlarda % 20-30 olan bu oran ve 50'li yaşlarda % 50 civarında olmaktadır. Prevalans değişik etnik kökenliler arasında farklılıklara sahiptir. Örneğin; ABD'de sağlıklı İspanyol ve siyah popülasyondaki seropozitiflik, İspanyol olmayan beyaz popülasyondan cinsiyet, yaş, coğrafi bölge ve eğitim düzeyinden bağımsız olarak birkaç kat daha yüksektir (Graham vd., 1991). Etnik gruplar arasındaki bu yüksek farklılığın nedeni tam olarak anlaşılamamış, ancak çocukluk dönemindeki sosyo-ekonomik durum, kötü sanitasyon ve enfekte kişilerle yakın temasın risk faktörü olabileceği açıklanmıştır. Son yıllarda yapılan incelemelerde, prevalans ile bakterinin alındığı çocukluk dönemindeki sosyo-ekonomik koşullar arasında kesin bir ilişkinin olduğu sonucuna varılmıştır (Lehours ve Yılmaz, 2007).

Gelişmemiş ülkelerde ise yaşam koşullarının kötü olması, bakteri enfeksiyonunun yaygınlığını oldukça etkilemektedir. Bu ülkelerde *H. pylori* asemptomatik taşıyıcılarının en az % 10'unun yaklaşık 10 yıl içerisinde klinik olarak yakınmalarının ortaya çıkacağı, klinik yakınması olan kişilerde en az % 2-4' ünün 10 yıl içerisinde mide karsinoması geliştirebileceği gösterilmiştir (Suerbaum ve Michetti, 2002).

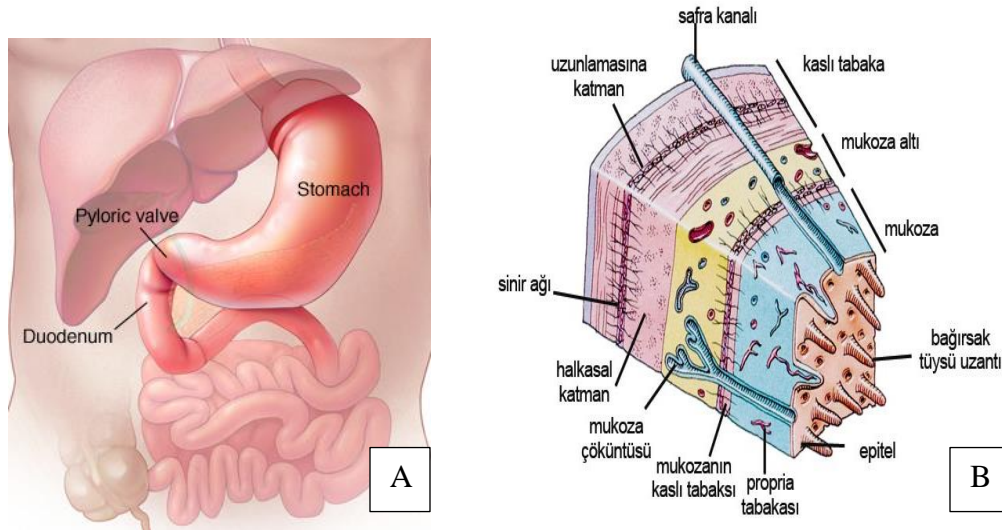


Şekil 4. *H. pylori* global yaygınlığı (URL-2).

#### 1.14. Midenin Özellikleri

Mide, embriyonik hayatta (gebeliğin 4. haftasında) ön bağırsağın distal kısmından gelişim gösteren, kabaca J harfi şeklinde tanımlanan, kan damarları ve lenf bezleri açısından zengin, yiyecekleri sindiren ve hormon salgılayan hem ekzokrin hem de endokrin bir gastrointestinal sistem organıdır (Williams vd., 1996).

Sindirim borusunun en geniş kısmı olan mide, karın boşluğunda, özofagus ve duodenum arasında bulunmaktadır (Şekil 5). Ağız boşluğunda parçalanmış besinler özofagustan geçerek mideye toplanarak, buradaki salgı bezlerinin salgıları ve mide duvarındaki kasların hareketi ile gıdalar kimyaya dönüştürülürler (Clemente, 2000).

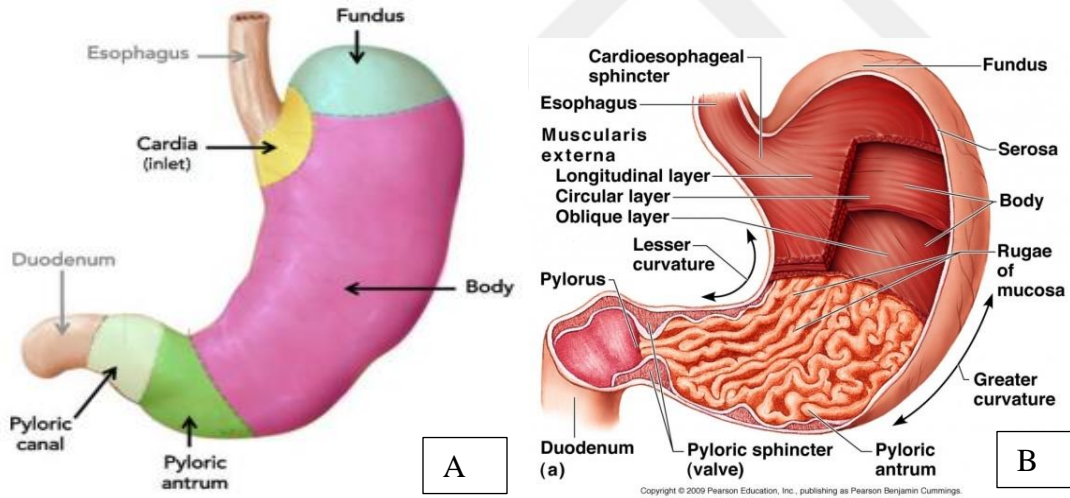


Şekil 5. A: Midenin karın boşluğundaki yerleşimi (URL-3), B: Mide mukozası katmanlarından bir kesit (URL-4).

## 1.15. Mide Anatomisi

Anatomik olarak mide; kardiya, fundus, korpus, antrum ve pilor olmak üzere beş bölgeye ayrılır (Şekil 6). Kardiya; özofagus ile midenin birleşim yeridir. Fundus; kardiya bölgesinin solu ve üst kısmında kalan midenin en üst kısmıdır. Korpus; fundus ile midenin 1/3 alt ve orta kısmının birleştiği çentikten geçen yatay hat arasında kalan kısımdır. Bu yatay hat ile pilor arasında kalan bölüm antrum, mideden duodenuma geçiş bölgesi ise pilordur (Fawcett, 1994).

Mide duvarı içten dışa doğru mukoza, submukoza, muskularis propriya ve seroza olmak üzere dört tabakadan oluşur ve bu tabakalar gıda sindirimi ve depolamadan sorumludur. Midede sekresyon faaliyeti lokal, otonomik (parasempatik, sempatik) ve hormonal uyarıların kontrolünde gerçekleşir. Mide sekresyonu; mukus hücreleri, gastrik bez hücreleri ve pilorik bez hücreleri tarafından sağlanır (Whitehead vd., 2005).



Şekil 6. A: Midenin bölümleri (URL-5) ve B: Anatomik görünümü (URL-6).

## 1.16. Mide Kanseri

Dünya’da özellikle 30’lu yaşlardan sonra erkeklerde ikinci kadınlarda dördüncü sırada en sık görülen kanser çeşidi olan mide kanseri (Farin ve Graca, 2006). Türkiye’de kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümlerden sonra ikinci en sık görülen bu hastalıkta, saptanan tüm kanserlerin erkeklerde % 7,4’ünün, kadınlarda % 6’sının mide kanseri

olduğu bilinmektedir. Mide kanseri epidemiyolojisi coğrafi farklılıklar gösterir ve dağılım uniform değildir. Coğrafi farklılığın yanı sıra, sosyo-ekonomik durum ile mide kanseri oluşumu arasında belirgin bir ilişki vardır (Bray vd., 2002). Yaygınlık ve mortalite kötü hijyenik koşullar ve çevre kirliliğinin artmış olduğu düşük sosyo-ekonomik sınıfta, üst sınıftan 3 kat daha yüksektir. Bu nedenle mide kanserinin endüstrileşmiş ülkelerden çok, gelişmekte olan ülkeleri etkilediği görölmektedir (Boyle ve Ferray, 2004).

Önceleri alkolün mide kanseri için risk faktörü olduğu düşünölrken, son zamanlarda yapılan çalışmalarda alkolün mide kanseri için bağımsız bir risk faktörü olmadığı ortaya konulmuştur (Langerhan vd., 2000). CRC tarafından yapılan araştırmalarla; karbonhidratların, turşuların, tuzlanmış et ve balıkların mide kanseri riskini arttırdığı, öte yandan süt, taze sebzeler ve C vitaminince zengin diyetin riski azalttığı gösterilmiştir.

Kan grubu A olan kişilerde mide kanserinin daha sık görölmesi, ailesinde mide kanseri olanlarda 2-3 kat daha sık mide kanserine rastlanması ve ikizlerde de görölmelerinden dolayı hastalığın oluşumunda genetik faktörlerinde rolü olduğu öne sürölmüştür (Faggiona vd., 1997). Fakat bu durumda aynı çevre koşullarında yaşamalarının da rol oynaması büyük olasılıktır. Ancak bu konudaki genel yargı, çevresel faktörlerin genetik yatkınlık üzerine superpoze olmasıdır.

*H. pylori* basilinin epidemiyolojik olarak enfeksiyonun yüksek olduğu bölgelerde kanser oluşumunun da yüksek olması, bu bakterinin de mide kanseri oluşumunu etkilediğini ortaya koymuştur. Bakteri içerdđi üreaz enzimi ile üreden amonyak üreterek midede hücre çoğalmasını uyararak, mutajen etki yaratmaktadır (Arif ve Syed, 2007).



## 1.17. Arı Ürünleri ve Genel Özellikleri

### 1.17.1. Bal

Bal; bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarının veya bu kısımlarda yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının *Apis mellifera* tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirilerek değişikliğe uğratılan ve petekte depolanarak olgunlaştırılan koyu kıvamdaki tatlı bir üründür (Anonim 2005). Balın rengi açık sarıdan koyu esmere kadar değişiklik göstermekte ve bu değişikliğin sebebinin bileşimindeki maddelerle ilişkili olduğu bilinmektedir (Şekil 7). Rengin yanı sıra balın kalite düzeyini tanımlamada kullanılan diğer başlıca fiziksel özellikleri; granülasyon, viskozite, yoğunluk, özgül ağırlık ve elektriksel iletkenliğidir (Gonzalez vd., 1999).

Ballar arıların kullandıkları kaynağa göre çiçek ve salgı balı olarak sınıflandırılır. Çiçek balı arıların bitki çiçeklerindeki nektarlarından yaptıkları baldır ve başlıca örnekleri ıhlamur balı, yonca balı, turunçgil balı, akasya balı, püren balı ve karaçalı balıdır. Salgı balı bitkilerin canlı kısımlarından salgılanan veya canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarından elde edilen baldır. Bu grubun tipik örnekleri ise; çam balı, meşe balı, köknar balı ve yaprak balıdır.

Yüzyıllar boyu insanoğlu için önemli besin kaynağı olan bal, antimikrobiyel aktivitesi nedeniyle Hipokrat zamanından beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Özellikle yara ve yanıkların tedavisinde, cilt ve mide rahatsızlıklarında yoğun olarak halen kullanılmaktadır. Ancak bilimsel araştırmaların yetersizliği nedeniyle günümüzde modern ilaç endüstrisinde yeterince kullanılmamaktadır (Dunford, 2000).



**Şekil 7.** Sırasıyla balın fiziksel görünüşü (URL-7), bal arısı *Apis mellifera* (URL-8) ve kovan görünümü (URL-9).

Balın yapısındaki bileşenler arıların ziyaret ettiği bitkilere, coğrafi konum ve iklim koşullarına göre değişmekle birlikte, yaklaşık 200 çeşit bileşen içermektedir. İçerdiği vitaminler, mineraller, organik asitler, flavonoidler, fenolik asitler, aminoasitler ve enzimler nedeniyle sindirimi kolay ve pek çok hastalığa karşı koruyucu bir gıdadır (Özmen ve Alkın, 2006). Mikrobiyolojik çalışmalarda, hidrojen peroksit gibi pek çok önemli antibakteriyel ajanında balın bileşimini oluşturduğu görülmüştür. Antibakteriyel araştırmalarda 10 veya daha fazla sulandırılmalarda bile balın bazı bakteri türlerinin gelişmesini tamamen inhibe ettiği belirtilmiştir (Dunford, 2000).

Balın tanımlanmasında kullanılan başlıca kimyasal özellikleri; nem içeriği, pH değeri, kül içeriği, mineral madde profili, protein ve prolin miktarı, karbon izotop oranı, enzim aktivitesi, hidroksi metil furfural içeriği ve antioksidan aktivitesidir. Balın tatlı olmasının sebebi içindeki üzüm şekeri, sakkaroz ve meyve şekeridir. Bunlardan başka balın % 17-20'sini su, geri kalan bölümü ise demir, sodyum, sülfür, magnezyum, fosfor, polen, manganez, alüminyum, gümüş, albümin, dekstrin, nitrojen, protein ve asitler oluşturmaktadır. Balın kalitesini belirleyen kısım bu karışımdır (Tablo 8).

**Tablo 8.** Balın içeriğini oluşturan başlıca bileşenler (Doğaroğlu, 2004).

<b>Bileşimi oluşturan maddeler</b>	<b>Yüzde oranlar ve çeşitler</b>
Su	>% 17,2
Karbonhidratlar	79,5
Fruktoz	38,1
Glukoz	31,2
Sakaroz	1,3
Mineraller	2,21
Vitaminler	B grubu vitaminleri, C, E ve K
Enzimler	Diastaz, invertaz, katalaz vb.

### **1.17.2. Bal ve Antibakteriyel Aktivitesi**

Balın antibakteriyel etkisinin, % 76 oranında bulunan şekerin oluşturduğu osmotik basınç ve içerdiği glukonik, bütirik, asetik, formik, laktik, süksinik, malik, sitrik ve okzalik asitler gibi organik asitlerin sebep olduğu düşük pH (ortalama 3,9) ve flavonoidler, hidrojen peroksit, fenolik asitler gibi bileşikler de yapısında bulundurmasından kaynaklı olduğu bildirilmektedir (Anonim, 2003). Bu özellikleri sayesinde bal, insanlarda hastalık oluşturan patojen bakterilerin gelişimini engelleyici bir ortam oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda balın yalnızca bakterilere karşı değil aynı zamanda virüs, mantar ve parazitlere karşı da inhibe edici özelliklerini bildiren çalışmalar vardır (Mundo vd., 2004).

Balda bulunan glukozoksidaz enzimi su ve oksijen varlığında glukozu glukonik asit ve hidrojen peroksit parçalar. Oluşan hidrojen peroksit ve asidik ortam, olgunlaşma sırasında balı korur ve antibakteriyel özellik kazandırır. Daha sonra ortamda oluşan düşük pH nedeniyle enzim inaktif olurken, hidrojen peroksit, askorbik asit ve bazı iyonlar tarafından su ve oksijene parçalanmaktadır ve bu durum da balın sulanmasına neden olmaktadır. Ayrıca balda bulunan katalaz enzimi hidrojen peroksidi parçalayarak balın antimikrobiyal özelliğini azaltmaktadır (Lusby vd., 2002). Balın, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloaca*, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella*

*pneomoniae* gibi bakteriler üzerine inhibe edici özellik gösterdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Tomoi ve Miyata, 2000).

### 1.17.3. Propolis

Propolis, işçi arıların çeşitli bitkilerin tomurcuk, yaprak ve gövdelerinden topladığı, reçinemsi maddeleri ve bitki salgılarını başlarında bulunan salgı bezlerinden salgılanan enzimlerle biyokimyasal değişikliğe uğratarak oluşturdukları, kirli sarıdan koyu kahverengiye kadar değişen renklerde ve oda sıcaklığında yarı katı halde bulunan reçinemsi bir karışımdır. Propolis, Çin basta olmak üzere Arjantin, Uruguay, Sili, Brezilya, Kanada ve Doğu Avrupa ülkelerinde oldukça yaygın bir şekilde üretilmektedir. İçerisindeki bileşikler toplandığı bitkilerin tür ve çeşitlerine göre farklılık gösterir. Arı bitkinin özsuğunu veya reçinesini parçalayarak, corbiculae denilen torbada biriktirir (Şekil 8). Daha sonra bu maddeler kovana taşınarak, oradaki çatlak ya da yarıkların kapatılması ve kovanın dezenfekte edilmesinde kullanılmaktadır (Chowdhury ve Humayyad, 1991).



**Şekil 8.** Ham propolis görünümü (URL-10) ve propolis hasadı (URL-11).

Propolis üzerine yapılan çalışmalarda, bu maddenin birçok antimikrobiyel özellik taşıdığını, aynı zamanda insan sağlığı için önemli ve gerekli olan B1, B2, C ve E vitaminleri, Cu, Ca, Al, V, Sr gibi elementleri ve çeşitli mineralleri içerdiği gösterilmiştir (Bankova vd., 1982). Propolis anti-bakteriyel özelliğinin yanı sıra anti-fungal, anti-viral, anti-protozoa, lokal anestezik, anti-inflamatuar ve bağışıklığı uyarıcı gibi çok farklı biyolojik ve farmakolojik özelliklere de sahiptir (Azza, 2009).

Propolisin antimikrobiyal özelliklerinin sahip olduğu flavonoidler, pinosembrin, galangin ve pinobanksinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Pinosembrin aynı zamanda anti-fungal özellikte göstermektedir. Diğer aktif bileşikler ise kumarik ve kafeik asit esterleridir (Castolda ve Capasso, 2002) Propolisteki fenolik bileşikler hücrelerin oksidatif stresinötrale etme kapasitesini artırarak, anti-inflamatuar ve anti-oksidan etkileriyle hücre ölümlerini engellemeye yardım eder (Nirala ve Bhadauria, 2008). Propolisin içerisinde bulunan maddeler ve oranları Tablo 9'da verilmiştir.

**Tablo 9.** Propolislerin genel yapısal bileşenleri.

<b>Maddeler</b>	<b>Miktar (%)</b>
Reçine ve zamksı maddeler	40-50
Bitkisel mumlar	20-30
Esansiyel yağlar	5-10
Polen	1-5
Organik bileşikler ve mineral maddeler	1-15

#### **1.17.4. Propolis ve Antibakteriyel Aktivitesi**

Propolisin düzenli ve sürekli kullanımı durumunda sindirim, solunum, dolaşım sisteminde ve tüm vücuttaki patojenlere karşı etkin bir savunma gerçekleştirir. Propolis, sentetik antibiyotiklerin aksine uzun süre kullanımında zararlı bakterilere karşı direnç oluşturmamakta, yararlı bakterileri de olumsuz etkilememektedir. Propolisin bağışıklık sistemini önemli derecede arttırdığı ve antikor salgılanmasını artırarak ilaçların etkilerini arttırdığı gösterilmiştir (Korkmaz vd., 2006). Yapılan çalışmalarda propolisin laboratuvar ortamında *Bacillus*, *Proteus*, *Salmonella* ve *Escherichia* gibi çeşitli bakteri türlerine karşı etkili olduğu rapor edilmiştir (Marcucci, 1995).

Birçok araştırmacı propolis ve ondan elde edilen ekstraktların gram pozitif ve negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkisini incelemiş ve gram pozitif çubuk bakterilere karşı geniş etkili olduğunu, fakat gram negatif basillere karşı kısıtlı etkiye sahip olduğunu bulmuştur (Hegazi vd., 2000). Aerobik bakterilerin yanı sıra 267 anaerobik bakteri suşuna karşı antimikrobiyel etkiside incelenmiştir. Bakteri kültürü genellikle en yüksek duyarlılığı 1 mg/ml propolis etanol ekstraktına karşı göstermiş ve

mevcut antibiyotiklerin etkisini de artırdığı gözlenmiştir. *Staphylococcus aureus* (çeşitli suşları) ve *Escherichia coli*'ye karşı kullanılan antibiyotiklerin etkisinin besiyerine eklenen propolis ekstraktı ile arttığı gözlenmiştir (Marcucci, 1995 ). Propolis etanol ekstraktının *Staphylococcus aureus* gibi gram pozitif koklara karşı yüksek antibakteriyel etki gösterdiği fakat *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram negatif bakterilere karşı düşük etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Silici vd., 2005).

Propolisin antibakteriyel aktivitesine içerdiği flavonoidler ile reçine içindeki aromatikbileşikler ve esterlerin neden olduğu düşünülmektedir. Galangin, pinosembrin ve pinostrobin bakterilere karşı en etkili olan flavonoidler olarak tanımlanmıştır ve ferulik ile kafeik asit de propolisin bakterisit etkisinde rol oynamaktadır (Marcucci, 1995).

### 1.18. Literatür Özeti

*H. pylori* kolonileri midede kolonize olur ve midenin uzun süreli enflamasyonu kronik gastrit oluşmasını tetikler. Birçok insanda on yıllarca midede varlığını sürdürür. *H. pylori* ile enfekte birçok kişi kronik gastritleri olsa dahi hiç klinik semptom göstermez. *H. pylori* kolonilerinin yaklaşık % 10-20'si er geç mide ve duodenum ülserinin gelişmesine neden olur. Ayrıca bu enfeksiyon, mide kanseri için ömür boyu % 1-2 ve gastrik MALT lenfoma gelişmesi açısından % 1'den az oranda risk faktörüdür.

John vd. (2008), yaptıkları çalışmada *H. pylori*'nin abiotik yüzeylere yapışmasında serumun etkisi incelenmiştir. *H. pylori* içeriği bilinen kimyasal besiyerlerinde kültüre alındığı zaman abiotik yüzeylere yapışıp mikro koloniler oluşturabilmektedir. Yapışmanın başlamasında esas olarak proteinler rol oynamakta daha ileriki aşamalarda ise farklı moleküller etkili olmaktadır. Çalışma sonucunda ortama serum eklendiğinde *H. pylori*'nin abiotik yüzeylere yapışmasının engellendiği bildirilmiştir.

Ohno vd. (2003), yaptıkları bir çalışmada gastroduodenal hastalıkları geliştiren *H. pylori*'nin yok edilmesinde antibiyotiklerin kullanılması ve bu antibiyotiklere karşı hızlı bir şekilde direnç kazanmalarından dolayı *in-vitro* olarak yağların % 1'lik

konsantrasyonda kullanıldığında *H. pylori*'nin çoğalmasını tamamen inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Farelerde yapılan *in-vivo* çalışmalarda ise lemongrassla muamele edilen farelerin midesindeki *H. pylori*'nin yoğunluğu, muamele edilmeyenlere oranla düşmüştür. Bu çalışma sonucunda *H. pylori*'ye karşı dirençlilik gelişimini önlemede uçucu yağların kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar

Çalışmada *Helicobacter* mikroorganizmasının incelenmesi için kullanılan laboratuvar gereçleri; otoklav, inkübatör, pastör fırını, ışık mikroskopları (koloni mikroskobu ve olimpus Bx51 araştırma mikroskobu görüntü analiz sistemli araştırma mikroskobu, anaerobik kavanozlar, santrifüj, mikrosantrifüj, hassas terazi, buzdolabı, -20 ve -80 °C'lik derin dondurucular, vorteks, sınıf II güvenlik kabineti, saf su cihazı, ultrasonik su banyosu (Heidolphpromax 2020, Schwbach, Almanya), PCR cihazı, görüntü analiz sistemi, bunzen beki, elektroforez, cam ve plastikpetri kutuları, çeşitli cam malzemeler (cam fanus, cam erlen, cam pipetler, pastör pipeti, vida kapaklı tüpler, mavi kapaklı şişeler, mezür, erlenmayer, lam, lamel, cam baget), eppendorf tüpleri, PCR tüpleri, eküvyon çubukları, enjektörler, cam pipetler, otomatik pipetler, otomatik mikro ve makro pipet uçları, mikro kuyucuklu eliza plakaları, yuvarlak uçlu öze, filtre kağıdı, etüvdür.

Çalışmamızda kullanılan besiyerileri ve kimyasallar çeşitli ticari firmalardan sağlanmıştır. Brucella Agar, Brucella Broth, üre, ve Urea Base Broth, Agar agar, *H. pylori* selective supplement (Dent), Campygen Compact mikroaerofilik kit ürünleri (Oxoid), Brain Heart Infusion, Bovine Serum Albumin (BSA), gliserin, gliserol, casitone, etanol, metanol, Dimetil sülfoksit (DMSO), hekzan, nişasta, sodyum klorür, sodyumsulfat, safranin, lügol, kristal viyoleto ürünleri (Merck) ticari firmalardan temin edilmiştir.

#### 2.1.2. Kullanılan *Helicobacter pylori* suşları

Bu çalışma 2016 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirildi. Çalışma grubu; Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Bölümü'ne mide şikayeti ile başvuran ve klinik tanıda *H. pylori* şüpheli 17 hastadan endoskopi ile alınan



örneklerle oluşturuldu. Örneklerden izole edilen *H. pylori* suşları ve Refik Saydam Kültür Koleksiyonu'ndan satın alınan *H. pylori* (HP-J99) kontrol suşu çalışmada bakteriyel materyal olarak kullanıldı.

### 2.1.3. Kullanılan Besiyerilerinin İçeriği ve Hazırlanışı

#### 2.1.4. Brain Heart Infusion Broth

Sığır kalp infüzyon	5 g
Dana beyin infüzyon	12,5 g
Disodyumhidrojen fosfat	2,5 g
D-glukoz	2 g
Pepton	10 g
Sodyum Klorür	5 g (pH; 7,4 ± 0,2)

Yukarıda verilen maddeleri ihtiva eden Brain Heart Infusion Broth ticari besiyeri olarak temin edildi. Firmanın önerisi doğrultusunda 37 g tartılarak 1000 ml distile su içinde çözüldü. 1,1 atm basınçta, 121 °C'de 20 dakika otoklav edildi. Kullanılacak süreye kadar buzdolabında +4 °C'de bekletildi. Hazırlanan besiyeri *H. pylori* suşlarının saklanması için kullanıldı.

#### 2.1.5. Brucella Agar ve Broth

Kazein pepton	10 g
D- glukoz	1 g
Et peptonu	10 g
Maya ekstresi	2 g
Sodyum klorür	5 g (pH; 7,0± 0,2)

Yukarıdaki maddeleri ihtiva eden besiyeri ticari olarak temin edilmiş olup, firmanın önerisi doğrultusunda 45 g tartıldı. 1000 ml distile suda çözüldü. 1,1 atm basınçta 121 °C'de 20 dakika otoklavlandıktan sonra steril vida kapaklı tüplere tevzi edildi. Kullanılacak süreye kadar buzdolabında bekletildi.

Aynı karışıma litrede 13 g agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlandı. 1,1 atm basınçta 121 °C’de 20 dakika otoklavlandıktan sonra 48 °C’de su banyosunda bekletildi. Steril şartlarda ticari firmanın önerisi doğrultusunda belirtilen miktarda supplement (10 mg/l vankomisin, 5 mg/l trimetoprim ve 1 mg/l amfoterisin B solusyonu) ve % 7 insan kanı ilave edildi. Homojen karışımı sağlandıktan sonra petrilere döküldü.

Hazırlanan her iki besiyeri *H. pylori* kültüründe, antibiyogram ve antimikrobiyal aktivite çalışmalarında kullanıldı.

### 2.1.6. Urea Base Agar ve Broth

Peptic digest of animal tissue	1 g
Dekstroz	1 g
Sodyum klorür	5 g
Disodyum fosfat	1,2 g
Monopotasyum fosfat	0,8 g
Fenol kırmızısı	0,012 g

Yukarıdaki maddeleri ihtiva eden besiyeri ticari olarak temin edilmiş olup, firmanın önerisi doğrultusunda 21 g tartılarak 1000 ml distile suda çözüldü. 1,1 atm basınçta 121 °C’de 20 dakika otoklav yapıldı. Besiyeri soğuduktan sonra içerisine % 40’lık üre solüsyonundan 50 ml/L ilave edildi.

Aynı karışıma litrede 13 g agar ilave edilerek katı besiyeri hazırlandı. 1,1 atm basınçta 121 °C’de 20 dakika otoklav yapıldıktan sonra 48 °C’de su banyosunda bekletildi. Steril şartlarda % 40’lık üre solüsyonundan 50 ml/L ilave edildi. Homojen karışımı sağlandıktan sonra endorff tüplere 0,5 ml olacak şekilde dağıtıldı.

**Üre solüsyonu hazırlanışı:** Ticari olarak temin edilen üre % 40 olacak şekilde distile su ile solüsyon haline getirilerek filtre ile steril edildi. Steril vida kapaklı tüplere koyularak kullanılacak süreye kadar buzdolabında bekletildi.

Hazırlanan besiyeriler *H. pylori* üreaz aktivitesinin belirlenmesi ve üre inhibisyon testi için gerekli olan üreaz enziminin üretiminde kullanıldı.

### 2.1.7. Üreaz Enzim İnhibisyonunda Kullanılan Çözeltiler

**Tampon çözelti:** 3 g üre, 186 mg etilendiamin tetra asetik asit, 1,79 g potasyum dihidrojen fosfat ve 0,212 g lityum klorür tartılarak her bir madde yaklaşık olarak 20 ml saf suda çözülür. Elde edilen çözeltiler birleştirilir ve pH'sı 8,2 olacak şekilde ayarlanarak son hacim 500 ml ye tamamlanır.

**Fenol Reaktif:** 1 gram fenol ve 5 mg sodyum nitropürisit tartılır ve bir miktar saf suda çözülür. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

**Alkali Reaktif:** 0,5 gram sodyum hidroksit tartılır ve 1 ml sodyum hipoklorit pipet yardımı ile alınarak 100 ml saf suda çözülerek hazırlanır.

### 2.1.8. Kullanılan Kimyasal Analiz Yöntemleri

#### 2.1.9. Oksidaz Testi

Solunumda oksidatif fosforilasyon yapan bakteriler bu reaksiyonlarda oksidaz enzimi kullanırlar. Bu test, *H. pylori*'nin sitokromoksidaz enzimi varlığının belirlenmesi için kullanıldı. Bunun için; 0,1 g 1,4-fenilendiamonyum diklorür 10 ml distile su içerisinde çözüldü ve ependorf tüplerine 1 ml şeklinde dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar -20 °C'de alüminyum folyoya sarılı şekilde bekletildi (Koneman vd., 1997).

#### 2.1.10. Katalaz Testi

Katalaz testi ile bakterilerin katalaz enzimi üreterek hidrojen peroksidi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) parçalayıp parçalamadıkları tespit edilir. Bu test ile *H. pylori*'nin katalaz enzimi üretip üretmediği % 3'lük Hidrojen peroksit ayıracağı kullanılarak tespit edildi (Koneman vd., 1997).

### 2.1.11. Gram Boyama Seti

Gram boyama bakterilerin tanımlanma ve sınıflandırılması için kullanılan en önemli boyama yöntemidir. Bu bir farklılaştırıcı boyama olup bakterileri gram pozitif ve gram negatif olarak ikiye ayırır. Gram negatif boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka, gram pozitif boyanan bakterilere göre çok daha incedir.

**Kristal viyole stok solüsyonu (% 90-95 boya içeren):** Kristal viyoleden 40 g tartıldı ve 400 ml etanol (% 95) ile bir cam şişede eritildi, etiketlendi ve oda ısısında saklandı.

**Lügol solüsyonu:** İyot solüsyonu nişasta hidroliz ve gram boyama testi için hazırlandı. 1 g iyot ve 2 g potasyum iyodür havanda birlikte ezilip 300 ml distile su ile homojenize edilerek çözünmesi sağlandı. Karanlık kapaklı şişeye alındı ve tam çözünmesi için bir gece bekletildi.

**Alkol (% 96'lık etil alkol):** Kristal viyole ile boyanmış, lügol solüsyonu ile mordalanmış preparatlarda renk giderilmesi için kullanıldı

**Safranin solüsyonu:** Porselen kroşede 2,5 g safranin 10 ml alkol (% 95) ile çözülüp koyu renk kapaklı şişeye aktarıldı. Üzerine 100 ml distile su ilave edilerek tamamlandı. Bir gün bekletildikten sonra zıt boya olarak gram boyamada kullanıldı (Koneman vd., 1997).

### 2.1.12. Kullanılan Bal ve Propolis Numuneleri

*H. pylori*'nin üzerinde antimikrobiyal ve anti-ürezin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla çeşitli illerden tedarik edilen bal ve propolis numuneleri kullanıldı (Tablo 10).

**Tablo 10.** Çalışmada kullanılan bal, propolis örnekleri ve temin edilen iller.

<b>Bal</b>	<b>Kaynağı</b>	<b>Propolis</b>	<b>Kaynağı</b>
B1	Kırklareli	P1	Ardahan
B2	Konya	P2	Artvin
B3	Muğla	P3	Kars
B4	Çanakkale	P4	Van
B5	Balıkesir	P5	Ardahan
B6	Samsun	P6	Ankara
B7	Denizli	P7	Ankara
B8	Çanakkale	P8	Çankırı
B9	Trabzon	P9	Çorum
B10	Kırklareli	P10	Sinop
B11	Ordu	P11	Ereğli
B12	Çanakkale	P12	Balıkesir
B13	Aydın	P13	Zonguldak
B14	Rize	P14	Erzurum
B15	Rize	P15	Trabzon

## 2.2. Biyopsi Örneklerinin Alınması

Biyopsi örnekleri RTEÜ, Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Polikliniği'ne gastro-intestinal sistemle ilgili yakınmalarla başvuran ve yapılan muayeneleri sonucu endoskopi indikasyonu konan 17 olgudan alındı. Uzman bir gastroenterolog tarafından endoskop kullanılarak yapılan üst gastro-intestinal endoskopi ile antral bölgeden biyopsi örnekleri alındı. *H. pylori* kuruluğa ve çevre sıcaklığına duyarlı olup oda sıcaklığında canlılığını çabuk kaybettiğinden dolayı, biyopsi örnekleri steril serum (PBS) içeren ependorf tüpler içerisinde uygun taşıma ortamına alınarak (soğuk zincirde) hemen RTEÜ Mikrobiyoloji Laboratuvar'ındakı süre içinde ekimlerinin yapılması sağlandı. Örnekleri elde etmek için Etik Kurul Karar numarası 2018/104 ve dosya numarası 155 alınmıştır.

### 2.3. Biyopsi Örneklerinin Kültürü ve Mikroskopik İncelemesi

Biyopsi örneklerinin ilk olarak önceden hazırlanmış Brucella kanlı agar besiyerine, steril şartlarda iğne uçlu steril pens kullanılarak ekimleri yapıldı. Kültür için gerekli olan mikroaerofilik ortam, jar (kavanoz) içerisine konan Campy Gen mikroaerofilik kit ile sağlandı. Plaklar jar içinde 37 °C'de 3-10 gün inkübasyona tabi tutuldu.

Kültürden sonra kalan biyopsi örnekleri *H. pylori* varlığının tespiti amacıyla hızlı üreaz aktivitesinin belirlenmesi için endorf tüplerdeki üreaz agar besiyerine ekimleri yapıldı ve 37 °C'de 1-24 saat inkube edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kırmızı-koyu pembe renk oluşumu üreaz aktivitesinin varlığını gösterdi. Renk değişimi olmayan tüpler negatif olarak değerlendirildi.

Kalan biyopsi örneği, mikroskopta *H. pylori* varlığının tespiti için kullanıldı. Bu amaçla temiz lam üzerine biyopsi örneği ezilerek yayma preparat hazırlandı. Preparat kurduktan sonra üzeri etil alkol (% 96'lık) ile kaplandı ve kuruyana kadar bekletildi. Bu şekilde tespit edilen preparatlar gram boyama ile boyandı. Preparatlar mikroskopta 100X büyütmede immersiyon yağı yardımıyla incelendi. Gram negatif, martı kanadı benzeri kıvrık basillerin varlığı *H. pylori* pozitifliği olarak kabul edildi.

### 2.4. *H. pylori* Saf Kültürlerinin Hazırlanması ve Saklanması

*H. pylori* kültürü için Brucella agar (% 7 insan kanı ve DENT takviyesi) besiyeri kullanıldı. Dent içeriğinde; vankomisin (10 mg/L), trime thoprim laktat (5 mg/L), sefsulodin (5 mg/L) ve amfoterisin B (5 mg/L) bulunmakta olup *H. pylori* dışındaki mikroorganizmaların üremesinin engellenmesi için kullanıldı. İnkübasyona bırakılan kültürler 5-15 gün boyunca izlendi. Üreme görülen plaklarda koloni morfolojisi, gram boyama özelliği ve bakteri morfolojisi incelendi. Ayrıca üreaz aktivitesi belirlendi. Sonuç olarak üreaz aktivitesi pozitif ve gram negatif kıvrık bakterileri olan koloniler *H. pylori* olarak belirlendi. Çoğaltmak ve saflaştırmak amacıyla tekrar taze besiyerlerine (Kanlı ve DENT'li) pasaj yapılarak aynı koşullarda 3-5 gün boyunca inkübasyona tabi tutuldu. Pasajlarda saf kültür şeklinde üreyen *H. pylori* kolonileri bundan sonraki

çalışmalarda kullanmak üzere saklamaya alındı. Saf kùltürler % 20 gliserol ve % 10 fetal buzağı serumu içeren (DENT içermeyen) Brucella (pH 7,0) sıvı besiyerinde saklandı. Saklama besiyerinden 1 ml alınarak 2 ml hacimli steril ependorf tùplerine dağıtıldı ve ekùviyon çubuğu yardımıyla saf kùltürler plaklardan toplandı, besiyeri içine suspanse edildi. Ependorf tùpler, tarihlendirme ve numaralandırma yapıldıktan sonra - 80 °C'de saklamaya alındı.

## **2.5. Standart Suşun Canlandırılması**

Ticari olarak temin edilen liyofilize *H. pylori* J99 suşu steril şartlarda açılarak BHI sıvı besiyerinde özùldü. Brucella kanlı agar besiyerine iki tekrarlı olarak ekim yapıldı. Campy Gen *Campylobacter* sistemi yardımıyla jar içine yerleştirilen plaklar 37 °C'de 3-10 gùn inkùbasyona tabi tutuldu. Petride üreyen su damlası benzeri ince koloniler *H. pylori* olarak tanımlandı. Gram boyama yapılarak Gr (-) kıvrık basillerin gözlenmesi ile doğrulandı.

## **2.6. *H. pylori* Suşlarının Gram Boyama ve Mikroskopik İncelemesi**

Gram boyama bakterilerin tanımlanma ve sınıflandırılması için kullanılan en önemli boyama yöntemidir. Metanol ile tespiti sağlanan biyopsi örnekleri ve ısı ile tespit edilen *H. pylori* kùltürlerinden hazırlanan preparatlar sırasıyla kristal violette 2 dakika boyandı. Lugol solùsyonuyla yıkanıp 2 dakika bekletildi. Aseton alkol ile dekolarize edildikten sonra suda yıkandı ve safranin ile 1 dakika boyandı. Preparat yıkanıp kurutulduktan sonra mikroskopta 100X büyütmede immersiyon yağı yardımıyla incelendi. Mikroskopta mor renkle boyanan bakteriler gram pozitif, pembe renge boyanan bakteriler ise negatif olarak değerlendirildi. Kıvrık Gr (-) boyanmış bakteriler *H. pylori* olarak değerlendirildi (Koneman vd., 1997).

## **2.7. *H. pylori* Suşlarının Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Katalaz testi ile bakterilerin katalaz enzimi üreterek hidrojen peroksidi parçalayıp paralamadıkları tespit edilir. % 3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lam üzerine damlatıldı ve üremekte olan kùltürden bir öze dolusu alınarak hidrojen peroksitle karışımı

sağlandı. Çoğu aerobik bakteriler katalaz enzimi aracılığıyla, hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayarak köpük oluşumuna neden olur. Katalaz deneyinde gaz kabarcıklarının görülmesi pozitif, görülmemesi ise negatif olarak değerlendirilir (Koneman vd., 1997). Pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus*, negatif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* kullanıldı.

## **2.8. *H. pylori* Suşlarının Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Hazırlanan oksidaz test ayırıcından kurutma kağıdı üzerine bir miktar damlatıldı ve üzerine taze kültürden öze yardımı ile alınan bakteriler sürüldü. Kurutma kağıdında 5-30 saniye içerisinde mavi-mor renk oluşumu testin pozitif, bu süre içerisinde herhangi bir renk değişimi gözlemlenmemesi ise testin negatif olduğunu göstermektedir (Benson, 1985; Koneman vd., 1997; Bilgehan, 2004). Pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus*, negatif kontrol olarak *Echerichia coli* kullanıldı.

## **2.9. Direkt Mikroskopi**

Kültürü yapılan gastrik biyopsi örnekleri penset kullanılarak ateşte steril edilmiş bir lam yüzeyine sürülerek 17 örneğe ayrı ayrı mikroskobik preparatlar hazırlandı. Preparatların her biri gram boyama yöntemi ile boyanarak immersiyon yağı yardımıyla ışık mikroskobunda incelendi. Preparatlarda gram negatif, kıvrık, martı kanadı şeklinde bakterilerin görülmesi *H. pylori* pozitif olarak belirlendi. *H. pylori* pozitif olarak belirlenen preparatların mikroskobik görüntüleri fotoğraflandı.

## **2.10. Üreaz Testi**

Üreaz besiyerleri, biyopsi örneklerinde *H. pylori* varlığının belirlenmesi, kültürde üretilen *H. pylori* örneklerinin üreaz pozitifliğinin belirlenmesi ve *H. pylori* anti-üreaz aktivitesinin incelenmesi olmak üzere üç farklı amaçla kullanıldı.

Biyopsi örnekleri direk mikroskopi ve kültürü yapıldıktan sonra kalan kısmı, üreaz aktivitesi varlığını belirlemek için ependorf tüplerdeki üreaz agar besiyeri içine gömülecek şekilde yerleştirildi. Ependorf tüpler 37 °C'de 1 saat 4 gün inkübasyona



birakıldı. Ependorf tüplerinin rengi 1 saat içinde koyu pembe renge dönüşenlere hızlı,  $\geq 1$  günde değişenlere yavaş üreaz pozitif olarak değerlendirildi. Bu sonuç biyopsi örneğinde *H. pylori* varlığını göstermek için yapıldı. Renk değişimi olmayan örnekler negatif olarak belirlendi.

Kültürde üreyen kolonilerin *H. pylori* olup olmadığının belirlenmesi için katı ve sıvı üreazbesiyerlerine ekimleri yapılarak üreaz aktivitelerine bakıldı. Kültürden bolca alınıp ependorf tüplere alınan katı ve sıvı üreaz besiyerlerine bolca ekildi. Örnekler 37 °C'de 1-24 saat inkübe edildikten sonra koyu pembe renk değişimi, kültürün *H. pylori* olduğunu renk değişiminin olmaması ise başka bir bakteri olduğunu gösterdi.

Bal ve propolis örneklerinde, üreaz inhibisyonunu belirlenmesi için BHI broth ve Urea Base Broth (UBB) besiyerlerinde büyük hacimde (100-250 ml) *H. pylori* kültürü yapıldı. Hazırlanan BHI ve UBB sıvı besiyerleri otoklav edilip soğutulduktan sonra bire bir (200 ml x 200ml) oranında karıştırılarak üzerine % 25 ml, steril % 40'lık üre solüsyonundan ilave edildi. Hazırlanan besiyerine (100-250 ml), *H. pylori* J99 nolu standart suşun 4-7 günlük kültürlerinden Mc Farland 2 bulanıklıkta süspansiyonu 1/10 oranında ekim yapıldı. Mavi kapaklı şişelerin kullanıldığı ekimler, ekim yapılmamış kontrol grubu ile birlikte 37 °C'de normal atmosfer şartlarında inkübe edildi. Hazırlanan kültürlerin 24 saat sonunda koyu pembe renk değişikliği göstermesi üreaz pozitifliğini doğruladı ve bol miktarda üreaz üretimi için 3-5 gün inkübasyona devam edildi. Sedim kısmı ise anti-üreaz aktivitesi için kullanıldı.

### **2.11. *H. pylori* Üreaz Aktivitesinin Belirlenmesi ve Enzimin Hazırlanması**

Büyük hacimli üretilen kültürler, daha sonra santrifüj (10.000 rpm'de 15 dk.) ile çöktürüldü ve *H. pylori* hücreleri ayrı bir ependorf tüpüne alındı. Elde edilen pellet fosfat tamponu kullanılarak iki kez yıkandı, daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

*H. pylori* pelleti oda sıcaklığında çözülerek proteaz inhibitörleri içeren 15 ml fosfat tamponuyla çözülerek buz banyosunda sonikatörle parçalandı. Elde edilen karışım Amicon filtre (10.000 MWCO) kullanılarak konsantre edildi. 25 °C'de 1 dakikada 1  $\mu$ M amonyum açığa çıkaran enzim miktarı 1 ünite olarak tanımlandı.

Karışım protein miktarı Lowry metodu (Lowry vd., 1951) kullanılarak belirlendi. Kalibrasyon eğrisi ( $r^2 = 0,998$ ) amonyum klorür çözeltisi kullanılarak hazırlandı. *H. pylori*' den elde edilen üreaz enzimi içeren protein karışımı inhibisyon çalışmalarında kullanılmak üzere 2 U/mg protein olacak şekilde hazırlandı.

## 2.12. *H. pylori* Antibiyogram Testi

*H. pylori* suşlarının tedavide kullanılan 4 adet antibiyotiğe karşı duyarlılıkları, EUCAST standardına göre, disk diffüzyon yöntemiyle test edildi (EUROCAST, 2014). Test edilecek bakterilerin 5-7 günlük kültürlerinden BHI sıvı besiyeri içinde, yaklaşık olarak  $10^{6-8}$  kob/ml (koloni oluşturan birim (kob) = colony forming unit) şeklinde dilüsyonları hazırlandı. Önceden hazırlanmış Brucella Kanlı agar (katkısız) besiyerine eküvyon çubuğu yardımıyla yayma ekim yapıldı. Ekimleri tamamlanan besiyerleri üzerine, ticari olarak temin edilen antibiyotik diskleri 2-3 cm aralıklarla yerleştirildi. Petriler jar içine koyuldu ve anerobik kit yerleştirilerek kapağı sıkıca kapatıldı. Jar, etüvde 35 °C sıcaklıkta 5-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra antibiyotik disklerinin etrafında oluşan ürememe zon çapları bir cetvel yardımıyla ölçüldü. Standart disklerin belirtilen zon çaplarına göre duyarlı ya da dirençli oldukları belirlendi. Kullanılan antibiyotikler ve özellikleri Tablo 11'de verilmiştir.

**Tablo 11.** Kullanılan antibiyotikler, MIC değerleri ve zon çapları.

Antibiyotik Adı	Konsantrasyonu ( $\mu\text{g/ml}$ )	İnhibisyon zon çapı (mm)	
		Duyarlı (S)	Dirençli (R)
*Eritromisin (E)	15	$\geq 20$	$< 20$
*Tetrasiklin(TE)	30	$\geq 30$	$< 30$
*Siprofloksasin(CIP)	5	$\geq 26$	$< 26$
**Norfloksasin (NOR)	5	$\geq 26$	$< 26$

\*; *Campylobacter* cinsi için verilen değerler dikkate alınmıştır.

\*\*; *Haemophilus influenzae*'da siprofloksasin için verilen değerler dikkate alınmıştır.

## 2.14. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu

Bal ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin var olup olmadığının belirlenmesinde agar kuyucuk difüzyon metodu kullanıldı. Test edilecek *H. pylori* suşlarının taze (5-7 günlük) kültürlerinden Mueller-Hinton sıvı besiyeri içinde (MH) (Difco, Detroit, MI), yaklaşık olarak  $10^6$  kob/ml (koloni oluşturan birim) şeklinde dilüsyonları hazırlandı. Önceden hazırlanmış Brucella supplement ve % 5-7 kan katkılı agar besiyeri üzerine eküviyon çubuğu yardımıyla ekimleri yapıldı. Ekimleri tamamlanan besiyerleri üzerinde, steril cam boru yardımıyla 2 cm aralıklarla, 5 mm çapında kuyucuklar açıldı. Her bir kuyucuğa bal örneklerinden 70 µl, propolis örneklerinden ise 50 µl damlatıldı. *H. pylori* içeren petriler 2-3 gün Gaspak anaerobik kit kullanılarak jar sisteminde 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bir cetvel yardımıyla inhibisyon zon çapları ölçüldü. Standart çözücü kontrolleri olarak su ve etanol kullanıldı.

## 2.13. Bal ve Etanolik Propolis Ekstraktlarının Hazırlanması

Ham propolis ve bal örnekleri 2015 yılında Türkiye'nin farklı bölgelerindeki deneyimli arıcılardan elde edildi. Ham propolis örnekleri toz haline getirilerek -20 °C'de dondurularak kullanılacağı süreye kadar saklandı. Ekstraksiyon için 5 g propolis tartılarak 50 ml % 70'lik etanol ile cam şişede karıştırıldı. Daha sonra ultrasonikatörlü su banyosuna yerleştirildi ve oda sıcaklığında 12 saat çalkalandı. Elde edilen süspansiyon filtre kağıdından geçirildi 15 dakika 10.000 g'de santrifüj edildi. Supernatant evaporatörde uçuruldu. Kalan kısım % 70'lik etanolde çözüldü. Buzdolabında kullanılacağı süreye kadar vida kapaklı tüplerde muhafaza edildi.

Bal örnekleri oda sıcaklığında çalışılacağı süreye kadar bekletildi. Steril tüplere 5'er ml alındı ve üzerine sterildistile su ile 1/2 oranında sulandırıldı. Vorteks ile homojen karışımı sağlandıktan sonra Agar kuyucuk testi için kullanıldı.

## 2.14. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

## 2.15. Bal ve Propolis Örneklerinin Üreaz İnhibisyonunun Belirlenmesi

Üreaz aktivitesi Weatherburn (1967) tarafından literatüre kazandırılan, üreaz aktivitesi sonucu ortaya çıkan amonyum iyonunun indofenol yöntemi kullanılarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı, 0,5 ml substrat çözeltisi (10 mM üre, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA ve 10 mM LiCl, pH8.2), 0,2 ml *H. pylori* üreazı ve 0,2 ml propolis ya da bal ekstraktı içermektedir. Bu karışım, 15 dakida 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşum renk şiddeti spektrofotometrede (1601 UV-Shimadzu, Australia) 625 nm'de ölçüldü. Yüzde inhibisyon, propolis ve bal ekstraktı içermeyen kontrolle kıyaslanarak hesaplandı. Standart inhibitör olarak Asetohidroksamik asit (AA) kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda çalışılan her bir örnek için IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Deneyler üç tekrarlı olarak yapıldı (Weatherburn, 1967).



### 3. BULGULAR

Bu çalışma RTEÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji/Moleküler Biyoloji ve Kimya Bölümü Biyokimya laboratuvarlarında 2016-2017 yılları arasında gerçekleştirildi. Biyopsi örnekleri RTEÜ, Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Polikliniği'ne gastro-intestinal sistemle ilgili yakınmalarla başvuran ve yapılan muayeneleri sonucu endoskopi indikasyonu konan 17 olgudan alındı (Tablo 3).

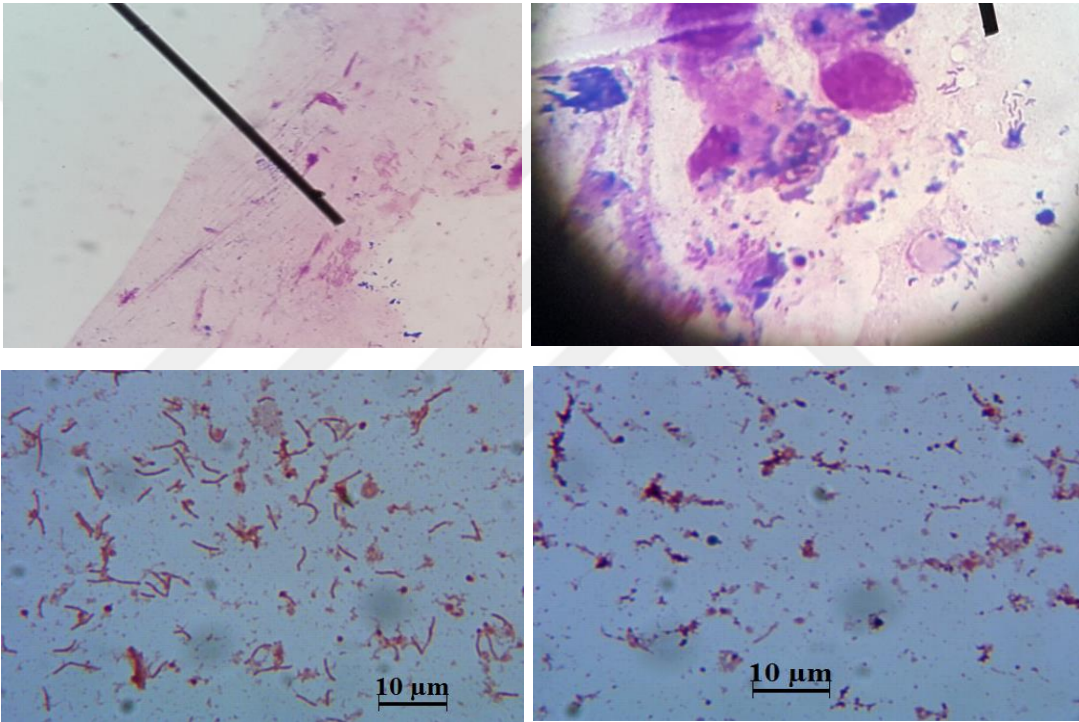
**Tablo 12.** Biyopsi örneklerinde *H. pylori* varlığının direk mikroskopik, kültürel ve biyokimyasal testlerle belirlenmesi.

Biyopsi örneği	Direkt mikroskopi	Biyopside üreaz testi	HP Kültürde üreme	HP Kültürde üreaz testi	Oksidaz testi	Katalaz testi
HP1	Gr (-) kıvrık basil	Yavaş pozitif	+	+	+	-
HP2	Gr (-) kıvrık basil	Yavaş pozitif	+	+	+	-
HP3	Gr (-) kıvrık basil	-	-	-	-	-
HP4	-	-	-	-	-	-
HP5	Gr (-) kıvrık basil	Yavaş pozitif	+	+	+	-
HP6	-	-	-	-	-	-
HP7	-	-	-	-	-	-
HP8	Gr (-) basil	-	-	-	-	-
HP9	Gr (-) kıvrık basil	Yavaş pozitif	+	+	+	-
HP10	-	-	-	-	-	-
HP11	Gr (-) kıvrık basil	Hızlı pozitif	+	+	+	-
HP12	-	-	-	-	-	-
HP13	Gr (-) kıvrık basil	Yavaş pozitif	+	+	+	-
HP14	-	-	-	-	-	-
HP15	-	-	-	-	-	-
HP16	-	-	-	-	-	-
HP17	Gr (-) kıvrık basil	-	-	-	-	-
HPJ99	Gr (-) kıvrık basil	Standart suş	+	+	+	-

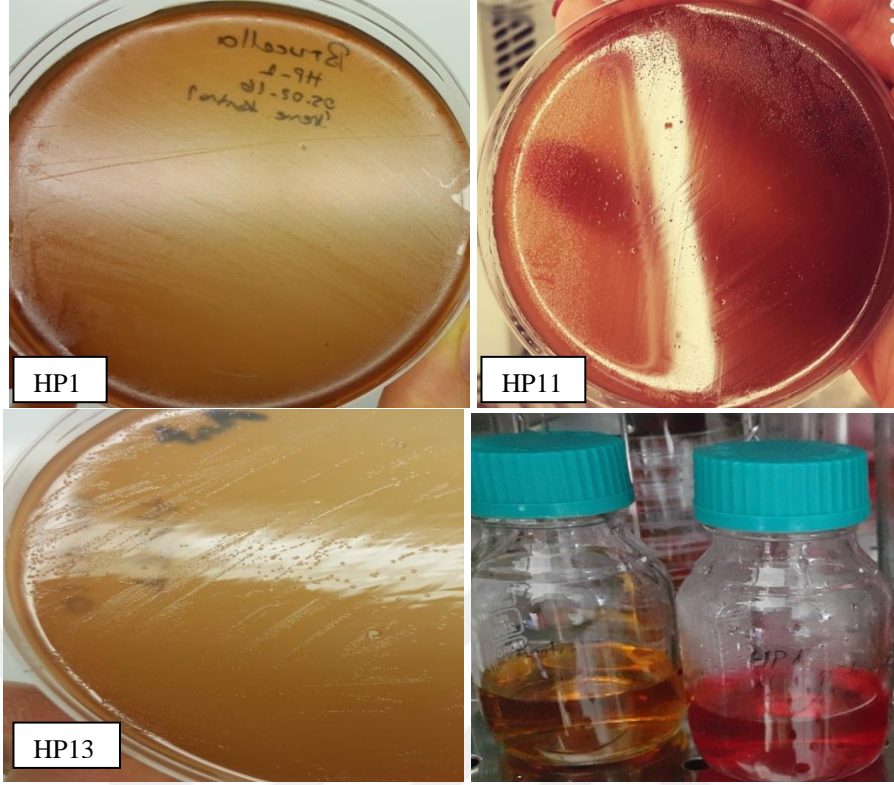
Alınan biyopsi örneklerinden öncelikle kültür, üreaz testi ve gram boyama yapıldı. Örneklerin 8'inde gram negatif kıvrık basiller, 1'inde ise gram negatif basiller gözlemlendi. Biyopsi örneklerinden yapılan üreaz testi sonucunda pozitif olarak belirlenen 6 örneğin kültürlerinde pozitif olduğu belirlendi. Diğerlerinde ise üreme gözlemlenmedi. Kültürleri pozitif olan örneklerin üreaz ve oksidaz testleri pozitif, katalaz aktivitelerinin negatif olduğu belirlendi. Ayrıca kültürlerin koloni morfolojileri ve Gram boyamaları

sonucunda gram negatif kıvrık basillerin gözlenmesi izole edilen suşun *H. pylori* olduğunu teyit edilmiş oldu. Böylece toplam 6 adet saf *H. pylori* suşu izole edilmiş ve stoklanmış oldu (Tablo 3).

*H. pylori* örneklerinin mikroskopik görünüşleri ticari olarak temin edilen J99 suşuyla benzer oldukları, dolayısıyla örneklerin *H. pylori* oldukları yapılan gözlem ve testlerle teyit edildi. İzole edilen *H. pylori* suşlarının direkt mikroskopisi (Şekil 9) ve kültürdeki koloni görünüşleri (Şekil 10) verilmiştir.



**Şekil 9.** HP11 ve HP13 biyopsi (üst sıra) ve kültür (alt sıra) örneklerinin Gram boyamada direkt mikroskopik görünüşlerinde kıvrık ve kokoid formları (100X büyütme)



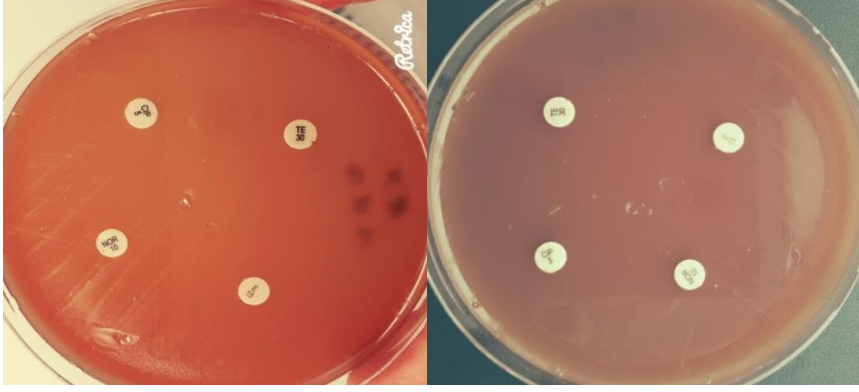
**Şekil 10.** Sırasıyla HP1, HP11, HP13 suşlarının Brucella ve Modifiye Agar besiyerinde görünümleri, Üreaz besiyeri ve testi pozitifliği

İzole edilen *H. pylori* suşlarının (HP1, HP11 ve HP13) bazı antibiyotiklere karşı duyarlılıkları disk diffüzyon yöntemi ile incelendi (Tablo 13, Şekil 11). *In-vitro* ortamda bir suş hariç tümünün antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları belirlendi. HP11 suşunun norfloksasine karşı dirençli olduğu gözlemlendi.

**Tablo 13.** *H. pylori* suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıkları.

Antibiyotik adı	Konsantrasyon (µg/ml)	İnhibisyon zon çapı (mm)		
		HP1	HP11	HP13
Eritromisin (E)	15	55 (S)	34 (S)	45 (S)
Tetrasiklin (TE)	30	55(S)	>40 (S)	50 (S)
Siprofloksasin (CIP)	5	50 (S)	>30 (S)	50 (S)
Norfloksasin (NOR)	5	55 (S)	20 (R)	45 (S)

S; Duyarlı, R; Dirençli



Şekil 11. Sırasıyla HP1 ve HP13 antibiyogram görünümleri

**Tablo 14.** Bal örneklerinin *H. pylori* suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri.

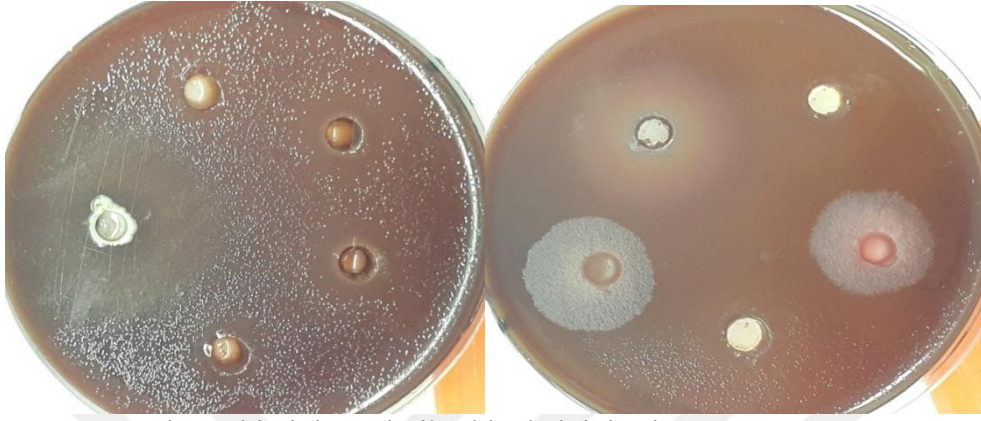
Bal örnek	Bal Kökeni	HP suşları ve inhibisyon zon çapları (mm)			
		J99	HP1	HP5	HP11
B1	Meşe	32	32	12	8
B2	Karabuğday	15	15	25	8
B3	Çam	10	10	-	10
B4	Karaçalı	35	35	ND	10
B5	Kestane	12	12	15	8
B6	Meşe	17	17	28	8
B7	Kekik	30	30	>25	6
B8	Kekik	12	12	>25	7
B9	Ormangülü	20	20	>25	10
B10	Sarmaşık	60	40	>25	8
B11	Akasya	20	15	>25	10
B12	Yonca	15	20	>25	6
B13	Hayit	25	15	>25	15
B14	Kestane	20	15	6	6
B15	Kestane	20	15	12	10
AMC	30 µg	40	ND	ND	ND

AMC; Amoxicillin, (-); Dirençli, ND; Test edilemedi, >; den büyük

Çalışmada toplam 15 farklı bölgelerden alınmış bal çeşitlerinin antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyucuk diffüzyon yöntemi ile test edildi. *H. pylori* J99, HP1 ve HP5 suşlarının test edilen ballara karşı oldukça duyarlı oldukları ancak *H. pylori* HP11 suşuna karşı nispeten etkinliği düşük olduğu gözlemlendi. Sırasıyla en etkili bal örnekleri



sarmaşık balı, karaçalı balı, meşe balı ve kekik balı olduğu belirlendi. Dirençli *H. pylori* suşu olan HP11'e karşı en etkili bal hayit balı (15 mm) olup, çam, karaçalı, orman gülü, akasya ve kestane balları diğer etkili ballar olarak belirlendi (Tablo 14, Şekil 12).



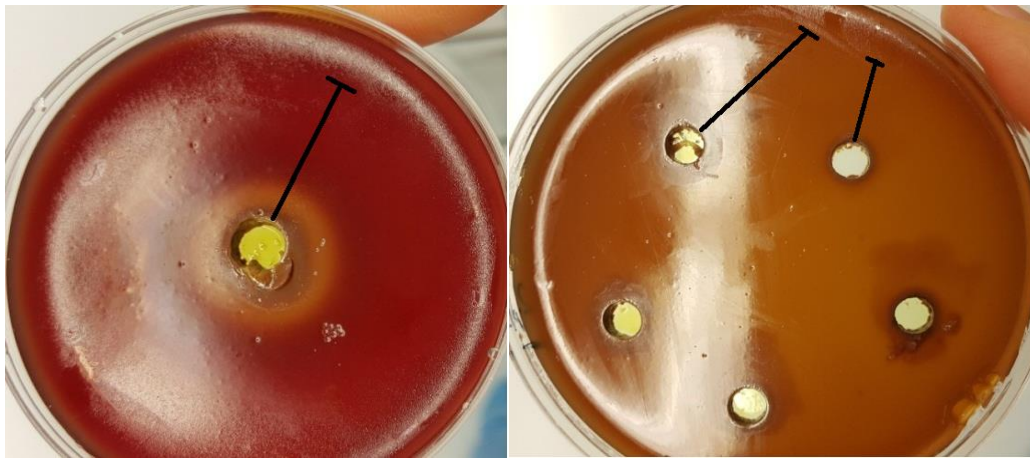
**Şekil 12.** Bal örneklerinin antimikrobiyal aktivitesi

Çalışmada farklı bölgelerden temin edilen toplam 15 adet propolis örnekleri 6 farklı *H. pylori* suşuna karşı antimikrobiyal aktivite yönünden test edildi (Tablo 15). Propolis örneklerinin genel olarak *H. pylori* suşlarına karşı güçlü antimikrobiyal (25-47 mm) aktiviteye sahip olduğu belirlendi. En duyarlı suş J99, HP5 ve HP13 olduğu HP2 ile HP9 suşlarının nispeten bazı propolis örneklerine karşı dirençli (15-10 mm) oldukları gözlemlendi (Şekil 13). P1-P2, P4-P5 ve P12 örnekleri test edilen tüm suşlara karşı  $\geq 25$  mm zondan daha yüksek etkinliğe sahip oldukları belirlendi.

**Tablo 15.** Propolis örneklerinin *H. pylori* suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri.

Örnek No	<i>H. pylori</i> suşları ve propolislerin inhibisyon zon çapları (mm)					
	J99	HP1	HP2	HP5	HP9	HP13
P1	38	>30	>30	>30	>30	>30
P2	39	>30	>30	>30	>30	40
P3	39	>30	>30	>30	15	38
P4	36	>30	>30	>30	25	36
P5	37	>30	>30	>30	25	>30
P6	40	40	>30	>30	10	>30
P7	31	40	>30	>30	15	>30
P8	32	40	>30	>30	12	>30
P9	32	40	15	>30	10	>30
P10	35	40	12	>30	12	>30
P11	47	42	16	>30	15	>30
P12	45	36	30	>30	30	>30
P13	43	33	12	>30	12	>30
P14	41	38	ND	>30	12	>30
P15	45	45	ND	>30	ND	>30
70% Ethanol	10	8	10	9	9	8
AMC	40	ND	ND	ND	ND	ND

AMC; Amoxicillin, ND; Test edilemedi.



**Şekil 13.** Sırasıyla *H. pylori* HP1 ve HP13 suşlarına karşı propolis örneklerinin inhibisyon etkinliği

**Tablo 16.** Propolis örneklerinin *H. pylori* büyüme ve üreaz inhibisyon değerleri.

Örnekler	<i>H. pylori</i> üreaz inhibisyonu IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Büyüme inhibisyon zonu (mm)	Örnekler	<i>H. pylori</i> üreaz inhibisyonu IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Büyüme inhibisyon zonu (mm)
P1	0,880±0,019	38,0	P10	1,182±0,020	35,0
P2	0,904±0,024	39,0	P11	0,260±0,023	47,0
P3	0,810±0,051	39,0	P12	0,400±0,040	45,0
P4	0,780±0,013	36,0	P13	0,650±0,037	43,0
P5	1,295±0,049	37,0	P14	0,512±0,019	41,0
P6	0,882±0,027	40,0	P15	0,681±0,033	45,0
P7	1,100±0,046	31,0	AA	24,61±0,186	---
P8	1,220±0,041	32,0	AMX	---	40,0
P9	1,525±0,077	32,0	70% Etanol	---	10,0

AA: Asetohidroksamik asit, Amx (10 µg): Amoksisilin,

Propolis örneklerinde en iyi üreaz inhibisyonu P11, P12, P14, P13 ve P15 suşlarında gözlemlendi. Üreaz aktivitesi ile antimikrobiyal aktivitelerinin sonuçlarının uyumlu olduğu belirlendi.

**Tablo 17.** Bal örneklerinin *H. pylori* büyüme ve üreaz inhibisyon değerleri.

Örnekler	<i>H. pylori</i> üreaz inhibisyonu IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Büyüme inhibisyon zonu (mm)	Örnekler	<i>H. pylori</i> üreaz inhibisyonu IC <sub>50</sub> (mg/mL)	Büyüme inhibisyon zonu (mm)
B1	9,96 ± 0,18	32,0	B9	13,44 ± 0,09	20,0
B2	16,98 ± 0,13	15,5	B10	2,67 ± 0,11	60,0
B3	18,12 ± 0,16	10,5	B11	14,12 ± 0,12	20,0
B4	8,48 ± 0,12	35,0	B12	14,42 ± 0,10	15,0
B5	15,76 ± 0,22	12,0	B13	12,05 ± 0,33	25,0
B6	13,99 ± 0,23	17,5	AA	25,32 ± 0,23	---
B7	9,47 ± 0,18	30,0	Amoksisilin	---	40,0
B8	14,91 ± 0,22	12,5	%70 etanol	---	10,0

AA: Asetohidroksamik asit

*H. pylori* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite, ortalama değerler alınarak anti-üreaz testi ile karşılaştırıldı. Bal örneklerinde en iyi aktivite sırasıyla B10, B4, B7 ve B1 suşlarında gözlemlendi.

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

*H. pylori* ihtiva ettiği üreaz enzimi yardımıyla üreyi parçalayarak midenin yüksek asidik ortamında kendini saran nötr bir ortam oluşturarak kolonileşmeyi başaran mikroorganizmadır. *H. pylori*'nin büyüme ve kolonileşmesinin durdurulması, yani inhibisyonu bu bakteri ile ilişkili hastalıkların tedavisinde önemlidir. *H. pylori* kaynaklı peptik ülser ve mide kanseri riskini azaltmak için çok sayıda *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalar bulunmaktadır. Liu ve Rasheed vd., (2011) nitroimidazollere ve klaritromisine primer direnç gösteren *H. pylori* suşlarının artan bir oranının olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, 2012 yılından beri, bu kronik enfeksiyonla mücadele için proton pompa inhibitörü (PPI) ve iki antibiyotik (amoksisilin ve klaritromisin) olan ilaç kombinasyonunun kullanılması önerilmiştir. Zemali vd. (2016)'nın çalışmasında ribozomal hedefin bir mutasyonu üzerinde durulmuştur. Tedavide kombinasyon ilaç kullanıldığında, tedavideki başarısızlığın ana nedeninin klaritromisin direncinin varlığı olduğu bildirilmektedir. Dolayısıyla bitki materyalleri, arı ürünleri gibi alternatif doğal bileşiklerle alternatif tedavi perspektifine ihtiyaç olduğu sonucuna varılabilir.

*H. pylori* tüm Dünya'da peptik ülser, gastrit ve gastrik karsinoma gibi mide hastalıklarında rol oynayan önemli bir patojendir (IARC, 1994). Bakterinin güçlü üreaz aktivitesi, mide epitelyumunda güçlü bir inflamatuvar yanıtı kolonize etmek ve indüklemek için bir dizi işlemde bakteriye izin veren önemli bir virülans faktördür. *H. pylori* enfeksiyonu gastric kanser hücrelerinde anjiyojenik ve invaziv faktörlerin sentezini indükleyebilir ya da module edebilir (Kitadai, 2010). Bu durum Yeo vd. (2006) yaptığı çalışmada gastric *H. pylori* pozitif hastalarda, negatif hastalara oranla gastric mukozadaki kan damarı artışının daha fazla olduğu gözlenmesiyle doğrulanmıştır. Anjiyogenez, önceden var olan damardan yeni kan damarlarının oluşması, tümör büyümesi, invazyon ve metastatik yayılım için gereklidir. Ayrıca besin ve oksijen sağlayarak mide kanserinin ilerlemesinde merkezi rol oynar (Hanahan ve Weinberg, 2011; De Palma vd., 2017; Macedo vd., 2017). Nitroimidazol ve klaritromisine primer direnç gösteren *H. pylori* suşlarının oranının oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Rasheed vd., 2014). Ayrıca 2012 yılından beri bu kronik enfeksiyonla mücadele için bir proton pompa inhibitörü (PPI) ve amoksisilin ve

klaritromisin antibiyotik kombinasyonunun kullanılması önerilmiştir (Malfertheiner vd., 2007).

*H. pylori* antibiyotik direnci ve inatçı enfeksiyon varlığına karşı alternatif tedavi ya da profilaktik yolları araştırılması gerekmektedir. Bu nedenle bitki materyalleri ve arı ürünleri gibi alternatif doğal bileşiklerle tedavi perspektifine ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılabilir. Arı ürünleri bal, polen, propolis ve arı sütünden oluşan oldukça geniş bir ailedir. Bal arısı ürünlerinin tıbbi kullanımı antik çağlardan beri uygulanmaktadır (Khalil vd., 2014).

Çalışmamızda ülkemizin çeşitli illerinden temin edilen bal ve propolis örnekleri (Tablo 14) anti-ürez ve anti-*H. pylori* etkinliği açısından test edilmiştir. Bu amaçla klinik örneklerden toplam 6 adet *H. pylori* suşları (Tablo 12) ve bir adet standart suş ticari olarak temin edilmiştir (Tablo 3). Klinik örneklerden izole edilen suşlar geleneksel metodlarla ki en önemli test olan ürez aktivitesi kullanılarak tanımlanmıştır. Ürez aktivitesi hem biyopsi materyalinde hem de üreyen kültürde bakılmıştır. Ürez testinin sensitivitesi % 90-98, spesifitesi % 97-100 olarak bildirilmiştir (Brea vd., 1997; Cutler, 1996). Doku örneğinde bakteri sayısının azlığına bağlı olarak yalancı negatif sonuçlar alınabileceğine dikkat çekilmiştir, ayrıca antibiyotik ve anti-asitlerin kullanımının üre testlerinin sonuçlarını etkilediği ortaya konulmuştur. Ürez testleri genellikle hızlı inceleme metodları arasında yer almasına karşın, sonuçların erken okunması durumunda duyarlılığının zayıf olduğu da gözlenmiştir (Mc Nulty vd., 1989). Bu nedenle çalışmamızda hem biyopsi örneğinde hem de kültürde negative sonuçlar en az 12 -24 saat bekletilerek test edildi.

Çalışmanın klinik suşlar ile yapılması ayrıca bir önem taşımaktadır. Zira standart suşlar sürekli pasajlar yapıldığı için bazı patojenik özelliklerini kaybedebilir veya mikroskopik ve makroskopik olarak değişikliğe uğrayabilmektedir. Klinik suşlar izole edilir edilmez biyolojik değişimlere uğramaması açısından hedeflenen testleri stokları yapılmadan test edildi. Yine de bazı suşlarda sonuç alınamadı, çünkü pasajlar esnasında üremediği ya da kontrolleri üremediği için sonuçları kullanılmadı. *H. pylori* kültürlerinin devam ettirilmesi oldukça zor olup, suşların pasajlar esnasında Helical

formdan kolaylıkla kokoid forma dönüşebildiği gözlemlendi. Kokoid forma tamamen dönüşen suşlar testlerde kullanılmadı.

*H. pylori* bakterisi doğada özellikle su kaynaklarında var olduğu bilinmektedir. Adams vd., (2003) çalışmalarında doğal tatlı su kaynaklarındaki *H. pylori*'nin canlılığını incelemişlerdir. *H. pylori*'nin hem laboratuvar kültürlerinde hem de doğal tatlı su çevrelerinde morfoloji ve kültüre alınabilirliği araştırılmıştır. Sonuçta *H. pylori* laboratuvar kültürlerinde devamlı kaldığını ancak çevrede ise canlılığını sürdürüp kültüre alınamayan durumda olduğunu ve bunun da halk sağlığı açısından tehlikeli olabileceğini bildirmişlerdir. Bu nedenle tablolarda tüm izole edilen suşların sonuçları verilememiştir. Tekrar canlandırıldığında ise istenilen bazı özelliklerin kaybolduğu özellikle kıvrık basil morfolojisinden kok morfolojisine dönüştüğü gözlenmiştir. Bazı literatürler bakterinin 5-20 gün kadar kültüre edilmiş *H. pylori* örnekleri kokoid formunun *in-vitro* ortamda tekrar kültüre edilemeyeceğini belirtmiştir (Brenciaglia vd., 2000). Ancak bakterinin kokoid formu membranı ve polifosfat enerji kaynakları bulundurması bakımından canlı olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Benaissa vd., 1996; Sorberg vd., 1996; Brenciaglia vd., 2000). Aynı zamandan bakterinin bu formunun enfeksiyonun geçişinden ve antimikrobiyal tedaviden sonra tekrar ortaya çıkmasından (nüks ya da reenfeksiyon) sorumlu olduğu da düşünülmektedir (Brenciaglia vd., 2000).

İzole edilen suşların üçünde (HP1, 11 ve 13) dört farklı antibiyotiğe karşı duyarlılığı incelenmiştir. Bu test diğer suşlarda da yapıldı ancak verimli sonuç alınmadığı için sonuçları çalışmada kullanılmadı (Tablo 13). HP11 suşu norfloksasine karşı dirençli olduğu, diğer suşların ise test edilen 4 antibiyotiğe karşı duyarlı oldukları belirlendi. Bu sonuç her hastadan izole edilen *H. pylori* suşunun farklı özelliklere sahip olduğu sonucunu desteklemektedir.

Aksoy ve Dığrak (2006), yaptıkları çalışmada bal ve propolis ekstraktlarının Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyal aktivitelerinin olduğu ve kültür ortamına ilave edilen % 20 bal konsantrasyonunun *H. pylori* üzerine inhibe edici etkisinin olduğunu saptamışlardır. Farklı propolis örnekleri ve arı ürünlerinin antibakteriyel aktiviteleri, içerdikleri çeşitli madde kombinasyonlarından kaynaklanmakta olduğu bilinmektedir. Bulgaristan'dan ve çeşitli Akdeniz ülkelerinden

elde edilen propolis örneklerinin, başlıca flavonoidleri, ferulik asitleri ve kafeik esterleri içerdikleri bildirilmektedir (Velikova vd., 2000). Ilıman bölgelerden elde edilen propolis örneklerinde, fenolik asitlerin, flavonoidlerin ve esterlerin antibakteriyel aktivite ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Kujumgiev vd., 1999). Propolisin Gram pozitif bakteriler üzerindeki inhibitör etkisi gösterilmiş olmasına rağmen, Gram negatif bakterilere karşı arı ürünlerinin aktivitesi tartışma konusudur. Propolis *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis*'e karşı iyi bir aktivite göstermiştir, ancak *Enterobacteriaceae*'ye karşı aktivitesi iyi değildir (Drago vd., 2000).

Farklı suşlara karşı birçok genel antimikrobiyal araştırma olmasına rağmen, *H. pylori* üzerine olanlar oldukça sınırlıdır. Khalil vd. (2006), Kuzeybatı Pakistan kaynaklı toplanan birkaç işlenmiş ve çiğ bal örneğinin altı farklı gram negatif ve altı farklı gram pozitif bakterilere karşı belirgin antimikrobiyal özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Mevcut sonuçları ilişkilendirmek için doğrudan *H. pylori* inhibisyon çalışmaları yapılmalıdır. Bu çalışmalardan biri, bal fraksiyonları ile *H. pylori* üreaz inhibisyonunun *in-vitro* değerlendirilmesidir. Deneyin değerlendirilmesi, bal ekstraktlarının *H. pylori* üreaz aktivitesi üzerine etkinliğinin konsantrasyona bağlı bir yanıt göstermiş olduğu ve son olarak % 100 bal ekstraktının varlığında, yaklaşık % 48 oranında üreaz inhibisyonu oluşturduğu gözlenmiştir (Matongo ve Nwodo, 2014).

Çalışmamızda *H. pylori* üreaz inhibisyonu test edilmiş, konsantrasyonu mg/mL ve inhibisyon zonu mm cinsinden hesaplanmıştır. Toplam 12 bal örneği ile yapılan bir çalışmada üreaz için yeni doğal inhibitör kaynağı incelenmiş ve üreaz inhibisyon aktivitesi IC<sub>50</sub> değeri 12-21 mg/mL olarak ölçülmüştür (Şahin, 2016). Bizim çalışmamızda ise bu değer 2,67 ile 18,12 mg/mL olarak ölçüldü. Kırklareli'den temin edilen B10 numunesi olan sarmaşık balının ölçülen 2,67 ± 0,11'lik değerleri en düşük değer olarak belirlenmiştir. Diğer bütün bal örneklerinin AA (Asetohidroksamik asit) standartına göre IC<sub>50</sub> değeri <25,32 ± 0,23 olarak belirlendi. Diğer yandan işlenmiş balların inhibisyon zonu 10,5 mm ile 60 mm arasında değişmektedir. Benzer *H. pylori* üreaz inhibisyonu işlenmiş ballar arasında B10 numunesi 60 mm inhibisyon zonu ile en verimli örnektir. Anti-üreaz aktivitesinin en iyi olduğu değerlerin *H. pylori* inhibisyonunun da en yüksek değere sahip olması, sarmaşık balının içerdiği diğer bir veya çok sayıda aktif fenolik ve flavonoid içeriklerine bağlı olabileceği

düşünülmektedir. Sarmaşık bal örneğinin yanı sıra Çanakkale'den karaçalı balı,  $8,48 \pm 0,12$  mg/mL IC<sub>50</sub> ve 35 mm inhibisyon zonu ile iddialı bir değere sahiptir. Yapılan bir çalışmada, anti-*H. pylori* aktivitesi Güney Afrika'dan seçilmiş bal ekstaktları n-hekzan, dietil eter, kloroform, etil asetat kullanılarak ekstrakte edildi ve ekstraktların MIC değerleri 15,8-18,8 mm olarak arasında ölçüldü (Manyi-Loh vd., 2010).

Çalışmada, verimli değerlerin amoksisilinden daha göze çarpan olması dikkat çekicidir. Ayrıca, amoksisilin, *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisinde hala çok etkilidir ve diğer ilaçlar arasında tercih edilen bir tedavi şekli olmaya devam etmektedir. Çalışılan örnekler bal oldukları için basit bir eleştiri yapılması mümkün değildir. Her örnek, antimikrobiyal, antioksidan etkiler dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal aktivitelere sahip farklı bileşikler içerdiği düşünülmektedir. Kanıt temelli elde edilen veriler, balın içeriğinin yanı sıra aktif bileşiklerin çiçek ve coğrafi kökenlere bağlı olduğunu açıkça göstermektedir. Çalışmamızda etkinliği yüksek olan balların (B10, B4, B7 ve B1) bulunduğu bölgelerin sıcak iklime sahip olması ve ana bileşen bitki dışında farklı bitki örtüsünün de etkili olabileceği düşünülmektedir. Etkili propolislerin ( P11, P12, P14, P13, P15, P4 ve P3) etkinliğinde coğrafik farkın olmadığı gözlemlendi.

Çinko içeren bir metalloenzim olan  $\alpha/\beta$  karbonik anhidraz, CO<sub>2</sub>'nin bikarbonata dönüşümünü katalizler ve *H. pylori*'nin çevreye adaptasyonunda oldukça önemlidir (Cave, 1997). Ayrıca *H. pylori* L-argininin, L-ornitin ve üreye parçalanmasını indükleyen arginaz RocF'yi eksprese edebilir. Bu enzimde mutasyon olması üreaz aktivitesini etkilemediği halde *H. pylori*'nin asite direncini azalttığı bildirilmiştir (Burry-Mone vd., 2008).

Üreaz enzimi *H. pylori*'nin hem sitozolünde hem de yüzeyinde bulunmakta olup biyosentezi için UreA UreB yapısal genleri UreC ve UreD yardımcı genleri ve nikel gereksinim duyan UreEFGHI genleri gereklidir.

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bilgilere göre bal ve propolisin *H. pylori* bakterisine karşı güçlü antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu gözlemlendi. Her iki arı ürününün de mide hastalıkları etkeni olan *H. pylori*'yi ekarte etmek ya da hastalıkları tedavi etmede destek tedavi olarak önemli bir kullanıma sahip olması gerektiği



sonucuna varıldı. Ayrıca propolisın baldan daah etkili görünmesine rağmen testlerde kullanılan miktarın çok az olduğu (1/2 sulandırmadan 70-80 µL) dikkate alındığında doğru zamanda etkin bir şekilde ve sürekli kullanıldığında *H. pylori* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanım kolaylığı açısından baldan çok etkili olabileceği ortaya konmuştur. Propolis işlenmeden kullanılmadığı, doğru propolisın doğru şekilde işlendiğinde antibiyotiklere alternatif bir *H. pylori* tedavi edici ajan olabileceği ortaya konmuştur.

Yaptığımız çalışmada arı ürünleri olan bal ve propolisın mide patojeni olan *H. pylori* bakterisi üzerine antimikrobiyal ve antiürez aktivitesinin olup olmadığı ortaya konuldu. Biyopsi örneklerinden elde edilen *H. pylori* suşlar ayrı ayrı saflaştırıldı ve satın alınan standart suş ile birlikte kullanıldı. Saflaştırılan suşlar üzerinde arı ürünleri varlığında inhibisyon çalışmaları yapılarak IC<sub>50</sub> değerleri tespit edildi.

Bal örneklerinin test edildiği antimikrobiyal inhibisyon deneylerinde en verimli sonucun 60 mm zon çapında inhibisyona sebep olan sarmaşık balı olduğu belirlendi. Sırasıyla karaçalı balı, meşe balı ve kekik balının etkili bir zon çapına sahip olduğu gözlemlendi. Propolis örneklerinin ise tüm örnekler üzerinde genel olarak belirgin bir aktivitesinin var olduğu gözlemlendi, fakat en iyi sonucun P11 numunesine ait 47 mm'lik zon çapı olduğu belirlendi. Aynı zamanda P1, P2, P4 ve P5 numunelerinin test edilen tüm suşlara karşı  $\geq 25$  mm zondan daha yüksek etkinliğe sahip oldukları belirlendi. Bu propolislerin *H. pylori* etkenine karşı güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve alternatif tedavi sağlayabileceği belirlendi.

HP1, 11 ve 13 suşlarının dört farklı antibiyotiğe karşı duyarlılığı incelendi. HP11 suşunun norfloksasine karşı dirençli olduğu, diğer suşların ise test edilen 4 antibiyotiğe karşı duyarlı oldukları belirlendi. HP11'in bal örneklerine karşı da oldukça dirençli olduğu gözlemlendi. Ancak propolise karşı test edilemedi. HP11'e karşı en etkili balın HP13 olan hayit balı olduğu belirlendi. Ayrıca HP11'e çam (B3), karaçalı (B4), ormangülü (B9), akasya (B10) ve kestane (B11) ballarından doğru zamanda ve dozda kullanıldığında etkili olacağı, tedaviye destek vereceği gösterilmiştir.

*H. pylori* suşlarının üreaz inhibisyonu 12 farklı bal örneği ile test edildi. Elde edilen değerler 2,67 ile 18,12 mg/mL olarak ölçüldü. Kırklareli'den temin edilen B10 numunesi olan sarmaşık balının ölçülen  $2,67 \pm 0,11$  değerleri en düşük değer olarak belirlenmiştir. Diğer bütün bal örneklerinin AA standartına göre IC<sub>50</sub> değeri  $<25,32 \pm 0,23$  olarak belirlendi. İşlenmiş balların *H. pylori* standart ve klinik suşlarına karşı inhibisyon zonu 10,5 mm ile 60 mm arasında değişiklik gösterdiği belirlendi. Bu balın *H. pylori* profloksasinde ve destek tedavisinde önemli olacağı belirlenmiştir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada arı ürünlerinin *H. pylori* suşlarının üremesini belirli oranlarda baskıladığı, farklı *H. pylori* suşları üzerinde inhibisyon değerlerinin farklılık gösterdiği belirlendi. Farklı hastalardan elde edilen *H. pylori* suşlarının bal ve propolis örneklerine karşı genel olarak duyarlı oldukları ancak duyarlılık zon çaplarının suşa bağlı olarak değişebildiği tespit edildi. Bal ve propolisin *H. pylori*'den kaynaklanan mide hastalıklarında önemli bir alternatif tedavi etkeni olduğu bu çalışma ile tekrardan doğrulanmıştır. Çalışılan bal ve propolis örneklerinden en etkili olanlar ortaya konmuştur.

## 6. ÖNERİLER

Bu çalışmada arı ürünlerinin mide patojeni olan *H. pylori* üzerindeki antimikrobiyal ve anti-ürez aktivitesi belirlendi. Ancak bu alanda daha fazla farklı *H. pylori* klinik suşları izole edilerek test edilmesi gerekmektedir.

Günümüzde çoklu antibiyotik kullanımıyla tedavi edilen *H. pylori*'nin alternatif doğal bileşiklerle tedavi perspektifinin genişletilmesi gerekmektedir.

Arı ürünleri bu açıdan önemli organik kaynak olup çok sayıda farklı arı ürünlerinin (bal, propolis, arı sütü ve arı zehiri gibi) de test edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmamızda sadece bal ve propolis test edilmiştir, ancak bu ve benzer çalışmaların daha geniş kapsamda tutularak çok sayıda farklı bal ve propolis örneklerinin denenerek tekrarlanması gerekmektedir.

Bu çalışmaların bir sonraki aşaması ise hasta üzerinde klinik çalışmalar olup bu ve benzer çalışmalarla elde edilecek en uygun bal ve propolis örnekleriyle klinik çalışmalar yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Adams, B.L., Bates, T.C. and Oliver, J.D., 2003.** Survival of *Helicobacter pylori* in a natural freshwater environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7462-6.
- Alm, R., 1999.** Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 397, 176-180.
- Anonim, 2003.** Honey-Health and Therapeutic Qualities. National Honey Board.
- Anonim, 2005.** Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. Bal Tebliği. Tebliğ No: 2005/49. Gazete 17.12.2005/26026.
- Arif, M. and Syed, S., 2007.** Association of *Helicobacter pylori* with carcinoma of stomach. *Journal of the Pakistan Medical Association*, 57(7), 337-41.
- Azza, M., 2009.** Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of *Nile tilapia*, *Oreochromis niloticus*. In *Fish and Shellfish Immunology*, 27 (3), 454-459.
- Balcılar, E., 2009.** *Helicobacter pylori* tedavi uygulanmış hastalarda gaitada bakılan Hp antijeninin güvenilirliği. Uzmanlık tezi. Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Koordinatörlüğü, İstanbul, Türkiye, 6-22.
- Bankova, V.S., Popov, S.S. and Marekov, N.L., 1982.** High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *Journal of Chromatography*, 242, 135-143.
- Bardhan, P.K., 1997.** Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clinic Infect Disease*, 25, 973-978.
- Benaissa, M., Babin, P., Quellard, N., Pezennec, L., Cenatiempo, Y. and Fauchère, J.L., 1996.** Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infection and Immunity*, 64(6), 2331-5.
- Benson, H.J., 1985.** *Microbiological Applications: A Laboratory Manual in General Microbiology*. W. C. Brown Publishers, 4(13), ISBN: 0697003078, 276-289.
- Bilgehan, H., 2004.** *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, 4. Baskı, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 50060070057.
- Bizzozero, G., 1893.** Sulle ghiandole tubulari del tube gastroenterico e sui rapporti dellero coll epithelo de rivestimento della mucosa. *Atti della Reale Accademia delle scienze di Torino*, 28, 233-251.

- Borriello, P., Patrick, R., Murray, P.R. and Guido, F., 2006.** Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. *Bacteriology*, 2(10), 1563-1590.
- Boyle, P. and Ferlay, J., 2004.** Cancer incidence and mortality in Europe. *Annals of Oncology*, 16, 3481-488.
- Bottcher, G. and Letulle, M., 1875.** Origine infectieuse de certains ulcères simples de l'estomac ou du duodénum. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 5-10.
- Bray, F., Sankila, R., Ferlay, J. and Parkin, D.M., 2002.** Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *European Journal of Cancer*, 38, 99-166.
- Brea, M.L., Alarcon, T. and Megraud, F., 1997.** Diagnosis in *Helicobacter pylori*. *Current Opinion in Gastroenterology*, 43(11), 13-19.
- Brook, I., Yocum, P. and Foote, P.A., 1995.** Changes in the core tonsillar bacteriology of recurrent tonsillitis. *Clinical Infectious Diseases*, 21, 171-6.
- Blaser, M.J., 2004.** *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *Journal of Infection Diseases*, 161, 626-633.
- Brenciaglia, M.I., Sisto, F., Scaltrito, M.M. and Dubini, F., 2000.** *Helicobacter pylori*: ureA, cagA and vacA expression during conversion to the coccoid form. *International Journal Antimicrobial Agents*, 15(4), 277-82.
- Brown, L.M., 2000.** *Helicobacter pylori* epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic Reviews*, 22, 283-297.
- Bury-Mone, S., Mendz, G.L. and Ball, G.E., 2008.** Roles of  $\alpha$  and  $\beta$  carbonic anhydrases of *Helicobacter pylori* in the urease dependent response to acidity and in colonization of the murine gastric mucosa. *Infection and Immunity*, 76, 497-509.
- Camorlinga-Ponce, M., Romo, C. and Gonzalez-Valencia, G., 2004.** Topographical localisation of cagA positive and cagA negative *Helicobacter pylori* strains in the gastric mucosa: an in situ hybridisation study. *Journal of Clinical Pathology*, 57, 822-828.
- Casazza, S., Tunesi, G., Marinaro, E., Caruso, F., Canepa, M. and Michetti, P., 1997.** Detection of *Helicobacter pylori* in 201 stomach biopsies using the polymerase chain reaction, histological staining (H&E/Giemsa) and immunohistochemistry. *Pathologica*, 89, 405-11.
- Castolda, S. and Capasso, F., 2002.** Propolis an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, 51-56.
- Cave, D.R., 1997.** How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology*, 113, 9-14.

- Chowdhury, M. and Humayyad, M.S., 1991.** Inhibitor effect of natural honey on *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 12(3), 43-139.
- Clemente, M., Quitadamo, A. and Andriulli, A., 2000.** Rifabutin-based rescue therapy for *Helicobacter pylori* infected patients after failure of standard regimens. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 14, 311-316.
- Cutler, A.F., 1996.** Testing for *Helicobacter pylori* in clinical practice. *American Journal of Medicine*, 100, 35-41.
- Dawn, A., 2001.** *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14625-14630.
- Dent, J.C. and McNulty, C.M., 1988.** Evaluation of a new selective medium for *Campylobacter pylori*. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 7, 555-558.
- De Palma, G., Lynch, M.D., Lu, J., Dang, V.T., Deng, Y., Jury, J., Umeh, G., Miranda, P.M., Sidani, S., Philip, V., McLean, P.G., Hagelsieb, M.G., Surette, M.G., Neufeld, J.D., Collins, S.M. and Bercik, P., 2017.** Transplantation of fecal microbiota from patients with irritable bowel syndrome alters gut function and behavior in recipient mice. *Science Transnational Medicine*, 97, 625-630. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf6397.
- Doğaroğlu, M., 2004.** Modern Arıcılık Teknikleri. 295, Tekirdağ.
- Dooley, CP., 1993.** Background and historical considerations of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Journals*, 22(1), 1-19.
- Drago, L., Mombelli, B., De Vecchi, E., Fassina, M.C., Tocalli, L. and Gismondo, M.R., 2000.** In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *Journal of Chemotherapy*, 12(5), 390-5.
- Dunford, C., 2000.** The Use of Honey Wound Management. *Nursing Standard*, 15(11), 63-68.
- Dunn, B., Vakil, E., N. Schneider, B., Miller, G., Zitzer, J. B., Peutz, T., and Phadnis, S.H., 1997.** Localization of *Helicobacter pylori* urease and heat shock protein in human gastric biopsies. *Infection and Immunity*, 65, 1181-1188.
- Dunn, B.E., Cohen, B. and Blaser, M.J., 1997.** *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 720-741.
- Dzierzanowska, K., 2005.** Antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Poland: a multicentre study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 230-234.

- Dworkin, M., Stanley, F., Eugene, R., Karl-Heinz, S. and Erko, S., 2006.** The Prokaryotes A Hand book on the Biology of Bacteria. Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses, 3(7), 139-170.
- Eldridge, J., Jones, D.M. and Less, A.M., 1984.** *Campylobacter*-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies. *Journal of Clinical Pathology*, 37, 1002-1006.
- Eslick, G.D., Lim, L., Byles, J.E., Xia, H. and Talley, N.J., 1999.** Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 94, 2373-2379.
- Faggiona, F., Partenen, T. and Kogevinas, M., 1997.** Socioeconomic differences in cancer incidence and mortality. International Agency For Research On Cancer Scientific Publications, 38, 65-176.
- Falush, D., Wirth, T. and Linz, B., 2003.** Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 299, 1582-1585.
- Falsen, E., Vandamme, P., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. and De Ley, J., 1991.** Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(1), 88-103.
- Farin, K., Graca, M.D. and William, F.A., 2006.** Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *Journal of Clinical Oncology*, 24(4), 215-237.
- Fawcett, D.W., 1994.** A Textbook of Histology Chapman and Hall, New York, 599-615.
- Fennerty, M.B., 1994.** *Helicobacter pylori*. *Archives of Internal Medicine*, 154, 721-727.
- Forman, D., 1991.** *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinogenesis. *Gastroenterol Hepatology*, 2, 31-35.
- Fox, J.G., 1998.** Hepatic species identified in bile and gallbladder tissue from chileans with chronic cholecystitis *Gastroenterology*, 114(4), 755-763.
- Fox, J.G., 2002.** The non-*H. pylori Helicobacters*: their expanding role in gastrointestinal and systemiv diseases. *Journal of the British Society of Gastroenterology*, 50, 273-283.
- Gonzalez, G., Morales, R., Castillo, G., Ponce de León, S., Cravioto, A., Atherton, J.C. and López, Y., 1999.** Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different vacA and cagA genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), 4-3001.

- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A. and Marshall, B.J., 1986.** *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *Journal of Clinical Pathology*, 39(4), 353–365.
- Goodwin, C.S. and Worsley, B.W., 1993.** Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, 22(1), 15-19.
- Goodwin, C.S. and Lee, S.B., 1993.** Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *Biotechniques*, 15(3), 438-441.
- Giuseppe, R., Maria, P. and Laura, F., 1999.** Extra digestive manifestations of *Helicobacter Pylori* infection. *Digestive Diseases and Sciences*, 44(2), 229-236.
- Graham, D., Malaty, H., Evans, D. and Adam, E., 1991.** Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology Journals*, 100, 1495-1501.
- Graham, D.Y., Smith, J.L. and Dobbs, S.M., 1998.** Gastric adaptation occurs with aspirin administration in man. *Digestive Diseases and Sciences*, 28, 1-6.
- Granberg, C., 1993.** Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by using pyloriset EIA-G and EIA-A for detection of serum immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(6), 1450-1453.
- Hachem, C.Y., Kim, H.Y., Clarridge, J.E., Evans, D.G., Beyer, J., Drnec, J. and Graham, D.Y., 1995.** Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14(4), 349-52.
- Hansen, S., Melby, K., Aase, S., Jellum, E. and Vollset, S.E., 1999.** *Helicobacter pylori* infection and risk of cardia cancer and non-cardia gastric cancer. A nested case-control study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34(4), 353-360.
- Hanahan D. and Weinberg R.A., 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation 4, 144(5), 646-674. DOI: 10.1016/j.
- Hegazi, A.G., Abd El Hady, F.K. and Abd Allah, F.A., 2000.** Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, 55, 70-75.
- Hessey, S.J., Spencer, J. and Wyatt, J.I., 1990.** Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Journal of the British Society of Gastroenterology*, 31, 134-138.
- Hocker, M. and Hohenberger, P., 2003.** *Helicobacter pylori* virulence factors—one part of a big picture. *Lancet*, 362, 1231-1233.
- Humberto, J.S., Vega, E., Teresa, I.C., Claudia, M. and Centorbi, O., 2003.** Growth of *Helicobacter pylori* in Medium supplemented with *Cyanobacterial* extract. *Alba Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5384-5388.



- Jaime, R., Noriega, Z., Francisco, J., Guillermo, P., Rolando, T.M., Juan, P.F., Héctor, J.M., Elvira, G., 2006.** Diagnostic utility of invasive tests and serology for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in different clinical presentations. Archives of Medical Research, 37, 123-128.
- Jalava, K., Happonen, I., Sukura, A. and Hannien, M.L., 1998.** Isolates and identification *Helicobacter* from canintt and Felix gastric mucosa. Alba Journal of Clinical Microbiology, 64 (10), 3998-4006.
- Jaworski, W., 1889.** Podręcznik chorób (Handbook of Gastric Diseases). Wydawnictwa Dzie Lekarskich Polskich, 30-47.
- John, M., Cheung, J., Goodman, K., Munday, R., Heavner, K. and Huntington, J., 2008.** *Helicobacter pylori* infection in Canada's arctic: Searching for the solutions. Canadian Journal of Gastroenterology, 22(11), 912-916.
- Jones, D.M., Axon, A. and Eldridge, J., 1984.** *Campylobacter*-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies. Journal of Clinical Pathology, 37, 1002-1006.
- Josenhans, C., Lee, S., Stack, A., Katzowitsch, E., Aizawa, S.I. and Suerbaum, S., 2003.** *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. Microbes Infection, 5, 1345-1356.
- Khalil, M., Alam, F., Islam, M.A. and Gan, S.H., 2014.** Honey: a potential therapeutic agent for managing diabetic wounds. Evid Based Complement Alternat Medicine, 130-169. DOI: 10.1155/2014/169130.
- Kitadai, Y., Shinagawa, K., Tanaka, M., Sumida, T., Kodama, M., Hihashi, Y., Yasuhi, W. and Chayama, K., 2010.** Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. International Journal of Cancer, 124-143. DOI: 10.1002/ijc.25440.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Winn, J., 1997.** Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 303.
- Korkmaz, A., Kutluca, S. ve Genç, F., 2006.** Propolis. Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayın Şubesi, Samsun, 57.
- Köksal, F., Topçu, A., Söyletir, G. ve Doğanay, M., 2002.** *Helicobacter pylori* İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İkinci baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 99-111.
- Kujumgiev, A.Z., Tsvetkova I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R. and Popov, S., 1999.** Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology, 64(3), 235-40.

- Langerhan, J., Bergstrom, R. and Lindgren, A., 2000.** The role of tobacco, suff and alcohol use in the aetiology of cancaer of the oesophagus and gastric cardia. *International Journal of Cancer*, 5, 2650-2780.
- Lee, A., Hazell, S.L., O'Rourke, J. and Kouprach, S., 1988.** Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infection and Immunity*. 56, 2843-2850.
- Lehours, P. and Yilmaz, O., 2007.** Epidemiology *Helicobacter pylori* infection *Helicobacter*. *International Journal of Cancer*, 12(1), 1-3.
- Liu, C.C., 2011.** Prevalence of primary fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Helicobacter pylori* at a University Hospital in Southern Taiwan. *Helicobacter*, 14, 61-65. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2009.
- Lorber, B., Diss, G., Hendrickson, T.L., Becker, H.D., Lapointe, J. and Kern, D., 2012.** The asparagine-transamidosome from *Helicobacter pylori*, a dual-kinetic mode in non-discriminating aspartyl-tRNA synthetase safeguards the genetic code. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 4965-76. DOI: 10.1093/nar/gks167.
- Lowry, O.H., 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-75.
- Luck, S., 1924.** Gastric Urease. *Biochemical Journal*, 37, 1227-1231.
- Lusby, P.E., Coombes, A. and Wilkinson, J.M., 2002.** Honey: A Potent Agent for Wound Healing. *Journal of Wound Ostomy*, 295-300.
- Macedo, F., Ladeira, K., Longatto-Filho, A. and Martins, S.F., 2017.** Gastric cancer and angiogenesis: is VEGF a useful biomarker to assess progression and remission. *Jounal of Gastric Cancer*. 14(5), 122. DOI: 10.5230/jgc.17.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N. and Kuipers, E.J., 2007.** Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Journal of the British Society of Gastroenterology*, 56(6), 772-81.
- Manyi-Loh, C.E., Clarke, A.M., Munzhelele, T., Green, E., Mkwetshana, N.F. and Ndip, R.N., 2010.** Selected South African honeys and their extracts possess in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity. *Archives of Medical Research*, 41(5), 324-31. DOI: 10.1016/j.arcmed.2010.08.002.
- Marcucci, M.C., 1995.** Propolis: Chemical Composition, Biological Properties And Therapeutic Activity. In *Apidologie*, 26, 83-99.
- Marshall, B. and Warren, J.R., 1984.** Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1, 1311-1315.

- Marshall, B.J., Goodwin, C.S., Warren, J.R., Murray, R., Blincow, E.D. and Blackbourn, S.J., 1988.** Prospective double-blind trial of Duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet*, 2, 1437-1442.
- Marshall, B.J., 1994.** *Helicobacter pylori*. *The American Journal of Gastroenterology*, 89, 116-9.
- Matongo, F. and Nwodo, U.U., 2014.** In vitro assessment of *Helicobacter pylori* ureases inhibition by honey fractions. *Archives of Medical Research*, 45(7), 540-546. DOI: 10.1016/j.arcmed.2014.09.001.
- McNeil, K., Fox, J.G. and Versalovic, J., 2002.** Molecular evidence of *Helicobacter cinaedi* organisms in human gastric biopsies. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1511-1513.
- McNulty, C.A.M., Dent, J.C., Uff, J.S., Gear, M.W.L. and Wilkinson, S.P., 1989.** Detection of *Campylobacter pylori* by the biopsy urease test. an assessment in 1445 patients. *Journal of the British Society of Gastroenterology*, 30, 1058-1062.
- Megraud, F., 2007.** *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Journal of the British Society of Gastroenterology*, 56, 1502.
- Moran, A.P., Lindner, B. and Walsh, E.J., 1997.** Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides. *Journal of Bacteriology*, 179(20), 6453-6463.
- Morris, A. and Nicholson, G., 1987.** Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *The American Journal of Gastroenterology*, 82, 192-199.
- Moore, K.L. and Persaud, T., 1998.** The developing human in the digestive system. *Clinically Oriented Embryology. Journal of Clinical Microbiology*, 271-302.
- Mundo, O. and Padilla-Zakour Randy, W., 2004.** Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 1-8.
- Nirala, S.K. and Bhadauria, M., 2008.** Propolis reverses acetaminophen induced acute hepatorenal alterations: a biochemical and histopathological approach. (4), 451-61. DOI: 10.1007/12272-001-1178-5.
- Ohno, T., Kita, K., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K. and Imanishi, J., 2003.** Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 8(3), 207-215. DOI: 10.1046/j.1523-5378.2003.00146.
- Owen, R.J., 1998.** *Helicobacter* species classification and identification. *British Medical Bulletin*, 54, 17-30.

- Owen, R.J., Sharp, S., Lawson, A.J., Durrani, Z., Rijpkema, S. and Kidd, M., 2003.** Investigation of the biological relevance of *Helicobacter pylori* cagE locus diversity, presence of CagA tyrosine phosphorylation motifs and vacuolating cytotoxin genotype on IL-8 induction in gastric epithelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 36, 135-140.
- Özmen, N. ve Alkın, E., 2006.** Balın Antimikrobiyal Özellikleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 2006(4), 155-160.
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N. and Sibley, R.K., 1991.** *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 325, 1127-1131.
- Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J.H. and Friedman, G.D., 1994.** *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 330, 1267-1271.
- Parsonnet, J. and Forman, D., 2004.** *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer for want of more outcomes. *The Latest Medical Research*, 291, 244-245.
- Peterson, W.L. and Graham, D.Y., 1998.** *Helicobacter pylori*, Gastrointestinal and Liver Disease Pathophysiology. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 6, 604-17.
- Poddar, U. and Yachha, S.K., 2007.** Celiac disease in India. *Indian Journal of Gastroenterol.* 26(5), 7-230.
- Pounder, R.E. and Ng, D., 1995.** The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 9(2), 33-9.
- Rasheed, F., Campbell, B.J., Alfizah, H., Varro, A., Yamaoka, Y. and Pritchard, D.M., 2011.** Analysis of Clinical Isolates of *Helicobacter pylori* in Pakistan Reveals High Degrees of Pathogenicity and High Frequencies of Antibiotic Resistance. 433-442. DOI: 10.1111/hel.12142.
- Richard, A., James, B., Beth, M., Doig, P., Hancock, R. and Trevor J., 2000.** Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infection and Immunity*, 68(7), 4155-4168.
- Salomon, H., 1896.** Ueber das spirillum sauetiermagens und sien verhalten zu den belegzellen. *Bakteriology*, 19, 433-442.
- Shinchi, K., Ishii, H., Imanishi, K. and Kono, S., 1997.** Relationship of cigarette smoking, alcohol use, and dietary habits with *Helicobacter pylori* infection in Japanese men. *ScandJ Gastroenterol*, 32, 651-655.
- Silici, S., Koç, N., Mutlu Sarıgüzel, F. and Sağdıç, O., 2005.** Mould inhibition in different fruit juices by propolis. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, 56(4), 87-90.

- Sorberg, M., Nilsson, M., Hanberger, H. and Nilsson, L.E., 1996.** Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid form. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(3), 216-9.
- Stanley, F., Eugene, R., Karl-Heinz S. and Erko, S., 2006.** The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria. Delta and Epsilon Subclasses, 3(7), 139-170.
- Suerbaum, S. and Michetti, P., 2002.** *Helicobacter pylori* infections. *New England Journal of Microbiology*, 347, 1175-1186.
- Suzuki, H., Hibi, T. and Marshall, B.J., 2007.** *Helicobacter pylori* present status and future prospects in Japan. *Journal of Gastroenterology*, 42(1), 1-15.
- Sahin, H., 2016.** Honey as an apitherapeutic product: its inhibitory effect on urease and xanthine oxidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 3-13, 490-494.
- Tomb, J.F., White, O. and Kerlavage, A.R., 1997.** The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388, 53947.
- Tomoi, S. and Miyata, G., 2000.** The nutraceutical benefit, part 3: Honey. *Nutritional Pharmaceutical*. American Society for Nutrition, 16, 468-469.
- URL-1, 2017.** <https://f6publishing.blob.core.windows.net/9ff2809e-1db4-442f-aa1a-e6e624896214/WJG-23-4867-g002.jpg> (05 Mayıs 2017).
- URL-2, 2017.** <http://slideplayer.com/6174247/18/images/35/Helicobacter+pylori+prevalence.jpg> (21 Mart 2017).
- URL-3, 2017.** <http://www.doctorjohn.ru/wp-content/uploads/2016/09/stomach.jpg> (18 Haziran 2017).
- URL-4, 2018.** [http://harunyahya.com/image/the\\_human\\_miracle/90\\_stomach\\_wall\\_tr.jpg](http://harunyahya.com/image/the_human_miracle/90_stomach_wall_tr.jpg) (14 Mart 2018).
- URL-5, 2018.** <https://thumbs.dreamstime.com/b/detailed-diagram-structure-inside-stomach-sections-parts-regions-duodenum-esophagus-sphincter-body-human-anatomy-107882799.jpg> (06 Nisan 2018).
- URL-6, 2018.** <https://humananatomywiki.com/wp-content/uploads/2017/03/detailed-structure-of-stomach-stomach-structure-anatomy-human-anatomy-system-1.jpg> (13 Nisan 2018).
- URL-7, 2018.** [http://www.yaklasansaat.com/resimler/dunyamiz/canlilar/ari\\_resimleri/bal.jpg](http://www.yaklasansaat.com/resimler/dunyamiz/canlilar/ari_resimleri/bal.jpg) (22 Nisan 2018).

- URL-8, 2018.** [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4d/Apis\\_mellifera\\_Western\\_honey\\_bee.jpg/1200pxApis\\_mellifera\\_Western\\_honey\\_bee.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4d/Apis_mellifera_Western_honey_bee.jpg/1200pxApis_mellifera_Western_honey_bee.jpg) (14 Nisan 2018).
- URL-9, 2018.** [https://img.sondakika.com/haber/824/arili-kovan-desteklemesiyle-ilgili-calisma-takvimi\\_6737\\_o.jpg](https://img.sondakika.com/haber/824/arili-kovan-desteklemesiyle-ilgili-calisma-takvimi_6737_o.jpg) (16 Nisan 2018).
- URL-10, 2018.** [http://www.bingolaricilarbirligi.com/media/catalog/product/cache/1/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/1/2/1280px-propolis\\_taruvaik\\_2.jpg](http://www.bingolaricilarbirligi.com/media/catalog/product/cache/1/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/1/2/1280px-propolis_taruvaik_2.jpg) (14 Nisan 2018).
- URL-11, 2018.** [http://www.bingolaricilarbirligi.com/media/catalog/product/cache/1/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/p/1/p1090325\\_1.jpg](http://www.bingolaricilarbirligi.com/media/catalog/product/cache/1/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/p/1/p1090325_1.jpg) (16 Nisan 2018).
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. and De Ley, J., 1991.** Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41, 88-103.
- Vega, E., Teresa, I.C., Claudia, M., Humberto, J.S. and Centorbi, O., 2003.** Growth of *Helicobacter pylori* in medium supplemented with *Cyanobacterial* Extract. *Alba Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5384-5388.
- Velikova, M., Bankova, V., Marcucci, M.C., Tsvetkova, I., Kujungiev, A.Z. and Naturforsch, C., 2000.** Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Journal of Biosciences*, 55(9-10), 785-9.
- Yula, E., 2009.** Bölgemizden izole edilen *Helicobacter pylori* suşlarının moleküler epidemiyolojik özelliklerinin tesbiti. Uzmanlık tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, Türkiye.
- Zemali, N., Guillemot, G., Jaubert, J., Picot, S., Thomas, E., Becquart, J.P., Camuset, G., Gérardin, P., Michault, A. and Kwiatek, S., 2016.** *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin in Reunion Island 46(7), 385-389. DOI: 10.1016/j.medmal.2016.06.004.
- Walsh, E.J., Moran, A.P. and Lindner, B., 1997.** Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth-form lipopolysaccharides *Journal of Bacteriology*, 179(20), 6453-6463.
- Warren, J.R., 1979.** Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1(8390), 1311-1315.
- Warren, J.R., Marshall, B.J., 1983.** Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1273-1275.

- Weatherburn, M.W., 1967.** Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia *Helicobacter pylori*. *Tropical Gastroenterology*, 39 (8), 971-974 12(3), 43-139.
- Whitehead, K., Gaus, D.P., O'Brien, J., Romero-Gallo, R.M. and Peek, H., 2005.** Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 102, 10646-10651.
- Windsor, H.M. and O'Rourke, J., 2000.** Bacteriology and toxonomy of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, 293, 633-649.
- Williams, W., Fletcher, R., Fletcher, S. and Wagner, E., 1996.** *Clinical Epidemiology; The Essentials*. Libraries Australia, 5(3), ISBN: 978145114447, 111-135.
- Wirth, T., Wang, X., Linz, B., Novick, R.P., Lum, J.K., Blaser, M., Morelli, G., Falush, D. and Achtman, M., 2004.** Distinguishing human ethnic groups by means of sequences from *Helicobacter pylori*: lessons from Ladakh. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 101, 4746-4751.
- Worsley, B.W., 1993.** Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Clinic Gastroenterology of North America*, 22(1), 15-19.
- Yamamoto, K., Kojima, M., Sanaka, T., Ishii, Y., Osaki, H., Tsutsumi, A., Tsuchiya, Y. and Kuyama, S., 2006.** Reliability of rapid urinary test for antibody to *Helicobacter pylori* in adult patients with proteinuria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54(2), 105-108.

## ÖZGEÇMİŞ

Cemre Tarakçı, 03/12/1991 yılında Trabzon'da doğdu. İlköğrenimini 2005 yılında Boztepe İlköğretim Okulu'nda ve Ortaöğrenimini 2009 yılında Trabzon Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında başladığı lisans eğitimini 2014 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2014 yılında Giresun Üniversitesi'nde Pedagojik formasyon eğitimi aldı. 2015 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans öğrenimini halen devam ettirmektedir. İyi seviyede İngilizce bilmektedir.

