

***Helicobacter pylori*"nin Eradikasyonunda Etkili Uçucu Yağların Ve Klaritromisinin Kitosan Bazlı Mikrokürelerden Kontrollü Salımı**

**Proje No: 109M028**

Prof.Dr. Funda Tihminlioğlu  
Prof. Dr. Özlem Yılmaz  
Duygu Altıok  
Ebru Demiray Gürbüz  
Neslihan Bekmen

EYLÜL 2010  
İZMİR

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, *H. pylori*'nin eradikasyonunda kullanılmak üzere sindirim sisteminde uzun dayanımlı ve daha güçlü bir tedaviyi hedefleyen uçucu yağ ve antibiyotiklerin polimerik sistemlerinden kontrollü salımı temeline dayalı yeni bir yaklaşımdır. Önerilen çalışmada ilk defa uçucu yağların kitosan bazlı mikrokürelerden kontrollü salımı, uçucu yağ ve antibiyotik yüklü polimer mikrokürelerin *H. pylori* üzerindeki etkisi ve stabilitesi *in vitro* olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu proje Tübitak hızlı destek programı (1002) ile desteklenmiştir.

Proje yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar:

Prof. Dr. Funda TIHMINLIOĞLU  
Prof. Dr. Özlem YILMAZ  
Araş. Gör. Duygu ALTIOK  
Araş. Gör. Ebru DEMİRAY GÜRBÜZ  
Neslihan BEKMEN

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Helicobacter pylori</i> .....	3
2.1.1. Tarihçe.....	3
2.1.2. Bakterinin Morfolojisi.....	3
2.1.3. <i>Helicobacter pylori</i> Enfeksiyonu ve Patogenez.....	4
2.2. Klaritromisin.....	5
2.3. Uçucu Yağlar.....	9
2.4. Kitosan.....	11
2.5. Mikroküreler.....	13
2.6. Kitosan Mikroküre İlaç salım sistemleri.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Agar Dilüsyon Yöntemi ile MİK Değerinin Belirlenmesi.....	16
3.1.1. <i>H. pylori</i> Kültür Besiyerlerinin Hazırlanması.....	16
3.1.2. <i>H. pylori</i> Kültür Protokolü.....	17
3.1.3. Agar Dilüsyon Yöntemi ile MİK Değerinin Belirlenmesi.....	17
3.1.4. E-Test Yöntemi ile MİK Değerinin Belirlenmesi.....	19
3.2. Uçucu Yağların Bileşenlerinin ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	20
3.3. Kitosan Mikrokürelerin Eldesi.....	21
3.4. Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	22
3.5. Klaritromisin ve Tarçın Yağının Mikrokürelerden Salınım Çalışmaları.....	22
3.6. Klaritromisin ve Tarçın Yağının Mikrokürelerden Salınımının <i>H. pylori</i> Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi.....	23
4. BULGULAR.....	27
4.1. MİK Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	27
4.2. Uçucu Yağların Antioksidan Aktiviteleri.....	28

4.3. Mikrokürelerin Karakterizasyonu.....	31
4.3.1. Püskürtmeli Kurutma verimliliği, Etken Madde Yükleme Kapasitesi ve Verimliliği.....	31
4.3.2. Parçacık Boyutu ve Yüzey Morfolojisi.....	32
4.3.3. Termal Analiz.....	33
4.3.4. Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi analizi (NMR).....	37
4.3.5. Mikrokürelerin in Vitro Şişme ve Bozunma Davranışları.....	38
4.4. Klaritromisin ve Tarçın Yağının Mikrokürelerden Salınım Sonuçları.....	41
4.5. Klaritromisin ve Tarçın Yağının Mikrokürelerden Salınımının <i>H. pylori</i> Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi.....	43
5. TARTIŞMA/SONUÇ.....	45
6. REFERANSLAR.....	47
7. PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	60

## TABLO LİSTESİ

	Sayfa no
<b>Tablo 1.</b> <i>H. pylori</i> tedavisi için antibiyotik salım sistemleri.....	15
<b>Tablo 2.</b> GC-MS sıcaklık programı.....	20
<b>Tablo 3.</b> Klaritromisin analizinde kullanılan HPLC sistemi özellikleri.....	23
<b>Tablo 4.</b> Uçucu yağların bileşenleri ve yüzdece kompozisyonları.....	28
<b>Tablo 5.</b> Uçucu yağların troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasiteleri.....	31
<b>Tablo 6.</b> Püskürtmeli kurutma verimliliği, etken madde yükleme kapasitesi ve verimliliği.....	31

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa no
<b>Şekil 1.</b> Klaritromisinin kimyasal yapısı.....	7
<b>Şekil 2.</b> Klaritromisin direncine neden olan nokta mutasyonlarının oluşturduğu Aminoasit değişiklikleri.....	8
<b>Şekil 3.</b> Selüloz (a), kitosan (b) ve kitinin (c) kimyasal yapıları.....	12
<b>Şekil 4.</b> Tarçın yağı (a), karanfil yağı (b) ve troloks'un (c) yüzde inhibisyon grafikleri.....	30
<b>Şekil 5.</b> Mikrokürelerin SEM görüntüleri: kontrol kitosan mikroküreler (a), (b); tarçın yağı yüklü kitosan mikroküreler (c), (d); klaritromisin yüklü kitosan mikroküreler (e), (f).....	33
<b>Şekil 6.</b> Tarçın yağı DSC analizi (a); klaritromisin TGA ve DrTGA analizi (b); klaritromisin yüklü kitosan mikrokürelerin TGA ve DrTGA analizi (c); tarçın yağı yüklü kitosan mikrokürelerin TGA ve DrTGA analizi (d).....	36
<b>Şekil 7.</b> <sup>1</sup> H-NMR spektra: (a) kitosan mikroküre, (b) klaritromisin, (c) klaritromisin yüklü mikroküre.....	37
<b>Şekil 8.</b> Kontrol kitosan mikrokürelerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri.....	38
<b>Şekil 9.</b> Çapraz bağlı kitosan mikrokürelerin farklı zamanlardaki faz kontrast mikroskobu görüntüleri.....	40
<b>Şekil 10.</b> Klaritromisine ait kalibrasyon eğrisi.....	40
<b>Şekil 11.</b> Tarçın yağı kalibrasyon eğrisi.....	41
<b>Şekil 12.</b> Klaritromisinin kitosan mikrokürelerden salım profili.....	41
<b>Şekil 13.</b> Tarçın yağının kitosan mikrokürelerden salım profili.....	42

## ÖZET

### ***Helicobacter pylori*'nin Eradikasyonunda Etkili Uçucu Yağların ve Klaritromisinin Kitosan Bazlı Mikrokürelerden Kontrollü Salımı**

Uçucu yağlar hidrofobik, kuvvetli kokulu ve hidrofobik sıvılardır. İçerdikleri aktif bileşenlerden dolayı antimikrobiyal ve antioksidatif etki gösterirler. Bu çalışmada, *H. pylori*'nin eradikasyonunda kullanılabilecek limon otu yağı, kekik yağı, karanfil yağı, limon yağı ve tarçın yağı gibi uçucu yağların ve klaritromisinin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi, uçucu yağ ve/veya antibiyotik yüklü kitosan bazlı mikrokürelerin hazırlanması; hazırlanan mikrokürelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi; *in vitro* sistemlerde ilaç ve uçucu yağların kontrollü salım kinetiklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. *H. pylori* NCTC 11637 standard suşuna karşı klaritromisin ve beş uçucu yağın MİK değeri agar dilüsyon metodu ile belirlenmiştir. Her bir uçucu yağın ve klaritromisinin stok solüsyonundan iki kat seri dilüsyonlar ile sırasıyla 1000-1µg/ml ve 8-0.0037µg/mL aralığında konsantrasyonlar elde edildi. *H. pylori*'ye karşı limon otu yağı, tarçın yağının, karanfil yağı, limon yağı, kekik yağı ve klaritromisinin minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) sırasıyla 62, 8, 125, 500, 62 ve 0.125µg/ml olarak saptandı. Ayrıca uçucu yağların antioksidan aktiviteleri de belirlendi. MİK değeri en düşük olan tarçın yağı ile klaritromisin yüklü kitosan mikroküreler püskürtmeli kurutma yöntemi ile elde edildi. Mikrokürelerin yüzey morfolojileri, termal özellikleri, şişme ve bozunma özellikleri incelendi. Bu mikrokürelerden salınan tarçın yağı ve klaritromisinin *H. pylori* üzerindeki etkisi sıvı besiyerinde 48 saat boyunca incelendiğinde *H. pylori* üremesinin inhibe edildiği saptandı. Buna göre püskürtmeli kurutma esnasında tarçın yağı ve klaritromisinin aktivitesini kaybetmediği belirlendi. *H.pylori* enfeksiyonu eradikasyonunda kitosan mikrokürelere yüklenmiş tarçın yağının tek başına ya da antibiyotik ile birlikte kullanımının, antibiyotik direncinin bulunduğu durumlarda alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

## ABSTRACT

### **Controlled Release of Clarithromycin and/or Essential Oils Effective in *Helicobacter pylori* Eradication from Chitosan Based Microspheres**

Essential oils are hydrophobic, strong smelling volatile liquids with antimicrobial and antioxidant activities due to their active components. In this study, it was aimed to determine the minimum inhibition concentrations (MIC's) of clarithromycin and some essential oils that can be used in *H. pylori* eradication such as lemongrass oil, thyme oil, clove leaf oil, lemon oil and cinnamon bark oil; to obtain the essential oil and/or antibiotic loaded chitosan based microspheres; to determine the physical and chemical properties of resultant microspheres; to investigate the drug and essential oil release kinetics in vitro. The MIC's of five essential oils and clarithromycin against *H. pylori* NCTC 11637 were determined by agar dilution method. The two-fold serial dilutions of each essential oil and clarithromycin were obtained in the ranges of 1000-1 $\mu$ g/ml ve 8-0.0037 $\mu$ g/mL, respectively. The MIC values of lemongrass oil, cinnamon bark oil, clove leaf oil, lemon oil and thyme oil against *H. pylori* were determined as 62, 8, 125, 500, 62 and 0.125 $\mu$ g/ml, respectively. In addition, the components and the antioxidant activities of these essential oils were determined. Clarithromycin and cinnamon bark oil, having the lowest MIC value among five essential oils, loaded chitosan microspheres were obtained by spray drying. The surface morphology, thermal properties, swelling and degradation properties of microspheres were investigated. When the effects of cinnamon bark oil and clarithromycin released from the microspheres on *H. pylori* in broth for 48 hours were investigated, it was observed that the growth of *H. pylori* was inhibited. Therefore, it was concluded that the activity of cinnamon bark oil and clarithromycin remained constant during the spray drying. The use of cinnamon bark oil loaded chitosan microspheres as itself or by combining with antibiotics can be an alternative method in *H. pylori* infections treatment in the case of an antibiotic resistance.



## 1. GİRİŞ

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*), spiral yapıda, flajellalı, insan gastrik epitel hücrelerinde kolonize olan Gram negatif mikroaerofilik bir bakteridir (Allen, 2007; Clyne, 2007; Nilsson 2002; O'Toole, 2000). *H. pylori* ile ilişkili gastrik hastalıkların peptik ülser, duodenal ülser, atrofik gastrit, gastrik mukozal-ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoma, gastrik kanser ve non-kardia gastrik adenokarsinoma riskini arttırdığı bildirilmiştir (Demiray, 2006; Kusters, 2006; Panayotopoulou, 2007). 1994 yılında, "International Agency for Cancer Research (IACR)" tarafından *H. pylori*'nin insanlarda karsinogenez oluşumuna neden olduğu bildirilmiş (Dunn, 1997; ve Sınıf I karsinogen olarak sınıflandırılmıştır (Demiray, 2007; Qiao, 2007; Radosz-Komoniewska, 2005).

*H. pylori*'nin doğal habitatı insan midesidir, ancak yaşam boyu enfeksiyona neden olabileceğinden diğer habitatlarda da yaşayabildiği bildirilmiştir. İnsandan insana geçiş olası bulaş şeklidir. Fekal-oral ve oral-oral bulaş da bildirilmiştir (Demiray, 2006; Dunn 1997; Forbes, 2002; Kusters, 2006; Lehours, 2007). En az görülen bulaş yolu bir kişinin gastrik mukoza ile enfekte olan tüpler, endoskoplar ve materyaller ile başka kişilere bulaşma şekli (iatrojenik)dir. Fekal-oral bulaş en önemli olanlar arasında yer alır. *H. pylori* enfeksiyonu ile enfekte çocukların dışkılarından *H. pylori* izolasyonu yapılmış olmasına rağmen, fekal izolasyon çok fazla yaygın değildir. Besin yoluyla bulaş da ispatlanmıştır. Kusmuktan *H. pylori*'nin aspirasyon ile bulaşı diğer bir olasılık olarak düşünülmektedir (Dunn, 1997). *H. pylori* dış plaklarından, insan ve hayvan feçeslerinden izole edilmiştir ve birçok çalışmanın sonucunda *H. pylori*'nin akuatik (suda yaşayan) çevrelerde bulunduğu bildirilmiştir (Cellini, 2008; Kusters, 2006).

*H. pylori* prevalansı geniş bir coğrafik çeşitlilik göstermektedir. Coğrafik bölgelerde, *H. pylori* prevalansı çocukluk çağı boyunca yaşanan ortamdaki sosyoekonomik durum ile ters bir korelasyon göstermektedir. *H. pylori* prevalansı en yüksek %69 en düşük ise %11 olduğu bildirilmiştir (Bruce, 2008). Batı ülkelerinde, *H. pylori* prevalansı genellikle gelişmekte olan ülkelerde birinci ve ikinci jenerasyondan yapılan göçler arasında oldukça önemli bir fark gözlenmiştir (Kusters, 2006).

*H. pylori* insanlarda en çok enfeksiyon oluşturan bakterilerden biridir ve bazı populasyonlarda %80'e kadar yüksek prevalans gösterir (Clyne, 2007). Gelişmekte olan

ülkelerde *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı %70-90, gelişmiş ülkelerde %25-50'dir (Demiray, 2007).

Güncel tedavi yöntemi PPI ve amoksisilin ve klaritromisin içeren iki veya daha fazla antibiyotik tedavisinden oluşur. Ancak, *H. pylori* antibiyotik direncinin artması halen daha büyümekte olan bir problemdir (Mogg, 2008).

*H. pylori* enfeksiyonu tedavisinde uygulanan mevcut ilaç ve yöntemlerin dezavantajları nedeniyle alternatif ilaç ve yöntemler üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Halen tedavi için kullanılan antibiyotiklerin yan etkilerinin fazla olması, midede dayanımlarının düşük olması ve bakterinin bu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi başlıca sorunlardır.

Uçucu yağlar, bitkilerin çiçek, tohum, yaprak, meyve ve köklerinden genellikle distilasyon ya da ekstraksiyon işlemleriyle elde edilen uçucu, kuvvetli kokulu ve hidrofobik sıvılardır. İçerdikleri aktif bileşenlerden dolayı antimikrobiyal ve antioksidatif etki gösterirler. Bitkisel ürünler yıllardan beri bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olup, bu bitkilerden elde edilen uçucu yağlara karşı bakterilerin direnç gösterdiği saptanmamıştır. Dolayısıyla uçucu yağların antibiyotiklerle kombine olarak ya da antibiyotiklere alternatif olarak *H. pylori* eradikasyonunda kullanımı umut vaat eden bir düşüncedir.

Kitosan polikationik, biyouyumlu, biyobozunur ve biyoyapışkan özellikte doğal bir polimerdir. Son yıllarda yayımlanan çalışmalarda kitosanın mukoyapışkan ilaç salım sistemi olarak uygulanabileceği gösterilmiştir. Literatürde kitosan bazlı mikrokürelerden *H. pylori* eradikasyonunda kullanılan çeşitli antibiyotiklerin *in vitro* kontrollü salım çalışmaları bulunmaktadır (Hejazi, 2002; Hejazi, 2004; Majithiya, 2005; Patel, 2007). Bu çalışmalar mikrokürelerin hazırlanması, karakterizasyonu ve *in vitro* ilaç salım kinetiği ile ilgili veri sağlamaktadır ancak *in vivo* çalışmalar yetersizdir. Ayrıca literatürde kitosan bazlı mikrokürelerden uçucu yağ salımı ve uçucu yağ-antibiyotik etkileşimi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Tıp ve biyoteknolojide kullanımı giderek yaygınlaşan kitosan gibi önemli bir maddenin bu alanda kullanımına yönelik olarak elde edilecek bilgiler hem bilimsel hem endüstriyel açıdan önemlidir.

*H. pylori*'nin eradikasyonunda kullanılabilecek uçucu yağların ve klaritromisinin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi, uçucu yağ ve/veya antibiyotik yüklü kitosan bazlı mikrokürelerin hazırlanması; hazırlanan mikrokürelerin fiziksel ve kimyasal

özelliklerinin belirlenmesi; *in vitro* sistemlerde ilaç ve uçucu yağların kontrollü salım kinetiklerinin incelenmesi projenin amaçlarıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Helicobacter pylori*

#### 2.1.1. Tarihçe

*Helicobacter* ismi Yunan dilinde spiral anlamına gelen “**hēlix/ἕλιξ**” kelimesinden türetilmiştir ([http://en.wikipedia.org/wiki/Helicobacter\\_pylori](http://en.wikipedia.org/wiki/Helicobacter_pylori)). Yapılan yeni çalışmalara göre; *H. pylori*'nin insanlarda 60,000 yıldır enfeksiyon oluşturduğu ve genetik transformasyonun insanınki ile benzer zamanlarda gerçekleştiği için insan göçü ve farklılaşma araştırmalarında model olarak düşünülmektedir. İnsan popülasyonunun coğrafik dağılımı olarak Doğu Afrikadan başlayarak Batı Avrupaya, Doğu Asya'ya ve Güney Afrika'ya dağıldığı bilinmektedir. *H. pylori* suşlarının ise; benzer şekilde coğrafik dağılımı olarak Avrupa için bir kısım, Asya için iki kısım ve Afrika için üç kısım olmak üzere dağılım gösterdiği bilinmektedir (Swaminathan, 2007).

1994'de “National Institutes of Health (NIH)” tarafından *H. pylori*'nin peptik ülserin birincil nedeni; “IACR” tarafından sınıf I karsinogen olduğu bildirildi (Akyon Yılmaz, 2003; Radosz-Komoniewska, 2005; Hocker, 2003).

1997 yılında “The Institute for Genomic Research (TIGR)” tarafından *H. pylori*'nin tam genom haritası yayınlamıştır (Tomb, 1997).

**3 Ekim 2005** yılında da **J. Roben Warren ve Barry Marshall** *H. pylori*'yi, peptik ülser ve gastritteki rolünü gösterdikleri için “**Nobel Tıp Ödülü**” aldılar (Kusters, 2006; Ozden, 1995; Megraud, 2007; Velin, 2006; <http://nobelprize.org/medicine/laureates/2005/press.html>).

#### 2.1.2. Bakterinin Morfolojisi

Gram negatif, küçük, kıvrımlı, martı kanadı ve “U” şeklinde basiller ile zayıf β hemoliz görülür. *H. pylori* suşları sitokrom oksidaz, katalaz ve hızlı üreaz aktivitesi gösterirler (Versolovic, 2003; Brooks, 2001). Gram boyama ile genellikle soluk boyanır, karbol fuksin ile zıt

boyama daha belirginleştirici olabilir. Faz-kontrast mikroskobu ile birçok *Helicobacter* suşlarının hareketi görülür (Versolovic, 2003).

*H. pylori*, basil yapısında dört ile yedi arasında değişebilen polar flajellere sahip bir bakteridir (Salyers, 2002). *H. pylori*'nin iki farklı morfolojik şekli bulunur; metabolik olarak aktif, çoğalabilen spiral şekli ve kültürü yapılamayan (non-culturable) kokoid şekli. Spiral şekilden kokoid şekline dönüşüm; aerobik ortam, inkübasyon süresinin uzatılması, yüksek sıcaklık, PPI, açlık ve antibiyotik tedavisi gibi çeşitli koşullar altında gerçekleştiği bildirilmiştir (Nilsson, 2002). *H. pylori*'nin *in vitro* koşullarda kültürü yapıldığında, basil form oluşur ancak uygun olmayan koşullar altında basil formun kokoid formuna dönüştüğü bilinmektedir (Kusters, 1997). Bununla birlikte; kokoid şekli hem *in vitro* hem *in vivo* koşullarda gözlenmiştir ancak *H. pylori* patogenezinde rolünün olup olmadığı tartışmalıdır (Segal, 1996). *H. pylori*'nin çevreden konağa bulaş mekanizması henüz daha tam olarak bilinmemektedir, fakat *H. pylori* kokoid şeklinin besin ve su kaynaklarından enfeksiyonu taşıyan bir araç gibi olduğu bildirilmiştir (Azevedo, 2007). *H. pylori*'nin kokoid forma dönüşümünün bakterinin çevreye karşı adaptasyonu ve korunma mekanizması görevi olan aktif bir süreç olarak gösterilmiştir (Azevedo, 2007).

### **2.1.3. *Helicobacter pylori* Enfeksiyonu ve Patogenez**

*H. pylori* enfeksiyonu klinik sonuçları hem konak hem de bakteriyal faktörlere bağlıdır. *H. pylori* majör kolonizasyon bölgesi olan gastrik mukus tabakasında kalıcı, devamlı enfeksiyonlara neden olur. *H. pylori* bir kez yerleştikten sonra, konağın yaşamı boyunca gastrik mukozada yıllarca kalabilir çünkü konağın immunolojik savunma mekanizması *H. pylori*'yi ortadan kaldırmada başarısızdır (Rudi, 1998).

Mide lümeni asidik bir pH'ya sahiptir. *H. pylori* burada ancak birkaç dakika yaşayabilir ve en kısa sürede yaşayabileceği pH'ya sahip olan mukus tabakasına ulaşmalıdır (Rudi, 1998). Flajelleri ile sağladığı yüksek hareket özelliği, kemotaksis ve üreaz enzimi sayesinde mukus tabakasına ulaşır. Sülfatlanmış polisakkaritlerden oluşan mukus tabakası mide asidinden protonların difüzyonuna olanak tanımakta ve tampon görevi ile mukozal hücreleri mide asidinden korumaktadır (Salyers, 2002).

Kemotaksi, gastrik mukozadaki hücreler tarafından salgılanan karbonat ve üre sayesinde gerçekleşir. Üreaz enzimi sayesinde bu üreyi parçalayarak amonyak oluşturur ve bu amonyak

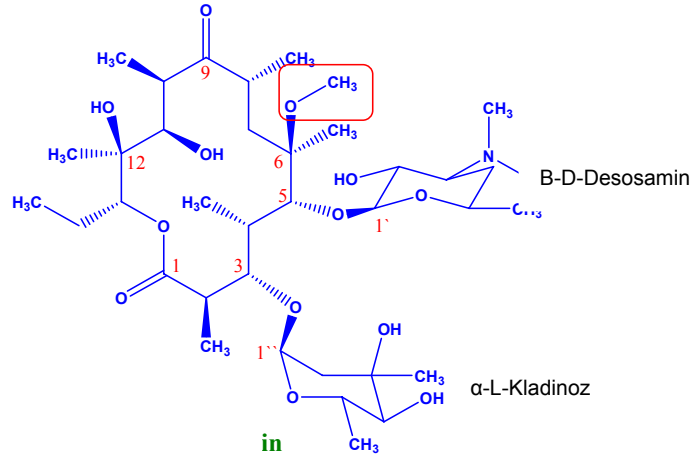
bulutu içerisinde kendi yaşayabileceği pH'da bulunur (Salyers, 2002). *H. pylori*'nin *in vivo* kolonizasyonu için gerekli olan hidrogenaz ve üreaz enzimleri temel virulans faktörleri arasında yer alır. Üreaz enziminin yapısal alt birimleri UreA ve UreB'dir (Stingl, 2008). Üreazın enzimatik aktivitesi asidik pH yanıtında bakteriyal hücreye ürenin girişini regüle eden iç membran pH bağımlı UreI kanalıyla kontrol edilir. Üreaz'ın ilk kolonizasyon aşamasındaki rolü ve önemi hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar sonucunda; üreaz-negatif mutant suşların kolonize olamadıkları ve ülserle neden olmadıkları gösterilmiştir (Pflock, 2006). A-β karbonik anhidraz çinko içeren bir metalloenzimdir. Karbondioksitin bikarbonata dönüşümünü katalizler. *H. pylori*'nin çevreye adaptasyonunda önemlidir (Bury-Mone, 2008). Ayrıca *H. pylori* ökaryotik üre döngüsünün anahtar komponentlerinin bazılarını (arginaz RocF) eksprese edebilir. Bu enzimde L-argininin L- ornitin'ne ve üreye parçalanmasını indükler. Bu enzimde mutasyon olması üreaz aktivitesini etkilemediği halde *H. pylori*'nin aside direncini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Kusters, 2006). Mide içerisine doğru sürekli eski mukus tabakaları atılımı söz konusu iken, *H. pylori*'de buna zıt yönde epitel hücrelere ulaşmaya çalışmakta ve tirbüşon benzeri hızlı hareketiyle yeni tabakalara tutunabilmektedir. Epitel hücreye ulaştığında tutunabilmesi için dış membran proteinleri ve diğer faktörler rol oynar. Gastrik epitelde inflamasyon submukozal doku içinde PNL ve diğer immun hücrelerin infiltrasyonunun sonucudur. *H. pylori* de üreaz, VacA ve HP-NAP inflamatuvar moleküllerdendir. Kolonizasyonundan sonra kronik aktif gastritte, intragastrik dağılım ve kronik inflamatuvar yanıtın şiddeti kolonize olan *H. pylori* suşuna, konak genetik ve immun yanıtına, diyetle ve mide asiti düzeyine bağlıdır (Salyers, 2002).

## 2.2. Klaritromisin

*Helicobacter pylori* gastrit, gastrik ve duodenal ülserler ve mukoza-ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoma da major patojen olarak bilinen ve gastrik kanserle ilişkili olan Gram negatif, flajellalı, spiral yapıda mikroaerofilik bir bakteridir (Graham, 2002). *H. pylori* enfeksiyonu ile oluşan gastroduodenal hastalıklar göz önüne alındığında bu bakterinin halk sağlığı açısından önemli bir rolü bulunmaktadır. *H. pylori* gastrik mukus salgılayan hücrelerde yerleşir mukus tabakası altında ya da içinde bulunur ve gastrik epitel hücreleri hedef alır (Wallis-Crespo, 2004). *H. pylori* enfeksiyonu prevalansı gelişmekte olan ülkelerde %70-90, gelişmiş ülkelerde %25-50

oranında, ülkemizde ise erişkinlerde %70-80, çocuklarda %56 bildirilmektedir (Dunn, 1997; Us, 1998; Ozen, 2006). *H. pylori*; tetrasiklin, amoksisilin ve klaritromisin gibi antibiyotiklere *in vitro* olarak yüksek oranda duyarlı olmasına rağmen tek bir antibiyotik ile tedavinin *H. pylori* enfeksiyonunun eradikasyonu için yeterli olmadığı (%0-35) bildirilmiştir (Graham, 2002; Zheng, 2006). *H. pylori* enfeksiyonu eradikasyonunda makrolid grubu antimikrobiyal ajanlardan biri olan klaritromisin, amoksisilin ya da metranidazol antibiyotik kombinasyonunda proton pompa inhibitörü (PPI) temelli 7 ve 14 günlük üçlü tedavi protokolü uygulanmaktadır. Klaritromisin *H. pylori* eradikasyonunda önerilen tedavi protokollerinde önemli yer almaktadır ancak günümüzde klaritromisin dirençli suşlar artmakta ve eradikasyon tedavisi başarısını azaltmaktadır (Graham, 2002; Ozden, 2004; Megraud, 1997). Klaritromisin direncinin Amerika'da %5-14 Avrupa'da %10'ların üzerinde (Graham, 2002), ülkemizde %16.8-56 olduğu bildirilmektedir (Ozden, 2004).

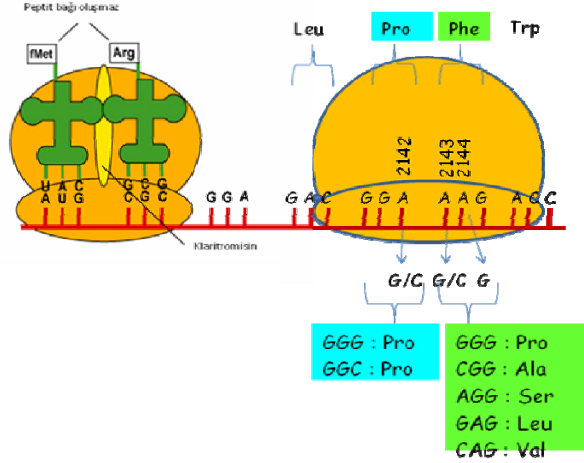
Makrolidler kimyasal olarak 14-16 üyeli lakton (eritronolit) halkası bulunmaktadır (Dinos, 2003; Gaynor, 2005; Mckenna, 2001; Vester, 2001). Klaritromisin gibi 14 üyeli lakton halkası içeren makrolidler lakton zincirinin iki yanı arasında hidrofobisite farklılığı ile karakterizedir (Dinos, 2003). Onuncu karbondaki bir keton halkası ve C<sub>5</sub>'e β-glikozidik bağla bağlanan desozamin ve C<sub>3</sub>'e α-glikozidik bağla bağlanan kladinoz olarak adlandırılan iki şekerden oluşmaktadır. Makrolidlerde yan etkilerin oluşmasında kladinoz şekerinin etkili olduğu bildirilmektedir (Sadeghi-Khomami, 2008; Schlunzen, 2001). Diğer bir makrolid olan eritromisinden farklı olarak, klaritromisin altıncı karbonunda hidroksil grubu yerine metil grubu içermektedir (Şekil 1) (Rodvold, 1993; Sadeghi-Khomami, 2008; Schlunzen, 2001). Klaritromisinin antibakteriyal aktivitesi diğer makrolidlerle benzerdir, ancak klaritromisin aside dayanıklıdır, asidik gastrik mukus tabakasında daha iyi absorbe olur ve en düşük MİK değerine sahiptir, bu nedenle *H. pylori*'ye karşı daha etkilidir (Gerrits, 2006; Graham, 2002; Mckenna, 2001).



**Şekil 1.** Klaritromisinin kimyasal yapısı (Kusters, 2006)

Klaritromisin, kladinoz şekeri ile *H. pylori*'nin 50S ribozomal alt ünitesinin peptidil transferaz bölgesinin V domainindeki 2142, 2143 ve 2144 pozisyonlarındaki klaritromisin bağlanma bölgelerine hidrojen bağı oluşturarak bağlanmaktadır. Makrolid bağlanma bölgesi peptidil transferaz merkezi yanında peptit çıkış tüneli içerisinde 50S ribozomal alt ünitesinde lokalize olarak bulunmaktadır. Klaritromisin bağlandıktan sonra, aminoasidi taşıyan aminoasıl tRNA ribozomda A bölgesinden P bölgesine ilerleyemez ve *H.pylori*'de protein sentezini durdurur (Gaynor, 2005; Vester, 2001). Ancak gelişmekte olan ülkelerde klaritromisin dirençli *H. pylori* suşları artmakta ve eradikasyon tedavi başarısını azaltmaktadır (Juttner, 2004; Megraud, 1997; Rüssmann, 2001). Klaritromisin direnci Amerikada % 5-14, Avrupada %10'ların üstünde, ülkemizde ise % 16.8-56 oranında bildirilmektedir (Graham, 2002; Juttner, 2004; Ozden, 2004). İzmir'de erişkinlerde 1996 yılında %5.4 olan klaritromisin direnci 2006 yılında %48.2 oranında bildirilmiştir (Onder, 2007). Maastricht III Sonuç Raporuna göre, primer klaritromisin direncinin %15-20'den fazla olduğu toplumlarda bu antibiyotik ilk basamak *H. pylori* eradikasyon tedavisinde önerilmemektedir (Malfertheiner, 2007). *H. pylori*'de klaritromisin direnci, 23S rRNA'nın peptidil transferaz bölgesinde A2142G (A2146G), A2143G (A2147G) ve A2144G pozisyonlarındaki adeninin guanin ile ve A2142C (A2146C) ve A2143C pozisyonlarındaki adeninin sitozinle yer değiştirdiği üç nokta mutasyonlarıyla oluşmaktadır (Şekil 2) (Cambau, 2009; Debets-Ossenkopp, 1996; Fontana, 2002; Kempf, 2000; Russmann ve Kempf, 2001; Russmann ve Adler, 2001; Russmann, 2003; Schmidt, 2002; Trebesius, 2000; Versolovic, 1996). 23S rRNA bölgesinde A2115G, G2141A, T2717C, T2182C, C2195T, G1939A, T1942C,

G2224A ve C2288T gibi ender gözlenen diğer nokta mutasyonları da bildirilmiştir (Gibreel, 2005; Garrido, 2007; Lascols, 2003; Megraud, 2004; Megraud, 2001; Trebesius, 2000; Torachio, 2004; Xuan, 2009).



**Şekil 2.** Klaritromisin direncine neden olan nokta mutasyonlarının oluşturduğu aminoasit değişiklikleri

Klaritromisin, bakteriostatik bir antibiyotiktir (Dinos, 2003; Garrido, 2007; Gaynor, 2005; Gerrits, 2006; Gibreel, 2005; Rodvold, 1993; Sadeghi-Khomami, 2008; Schlunzen, 2001; Taylor, 2000; Vester, 2001; Wang, 1998; Wilson, 2007; Yao, 2007, [http://student.cbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/control/macresp\\_illus.html](http://student.cbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/control/macresp_illus.html)). Ancak duyarlı mikroorganizmalara karşı yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında veya düşük bakteri inokülasyonunda bakterisidal olabilmektedir (Mckenna, 2001; Yao, 2007). Klaritromisinin MİK değeri 0.03-0.06 µg/mL olarak bildirilmiştir (Mckenna, 2001). Safak ve ark, NCTC 11637 *H. pylori* suşu için klaritromisin agar dilüsyon yöntemi ile MİK<sub>50</sub> değerini 0.064 µg/mL ve MİK<sub>90</sub> değerini 2.0 µg/mL olarak bildirmişlerdir (Safak, 2009). Kohanteb ve ark, 106 klinik *H. pylori* suşunda agar dilüsyon yöntemi ile klaritromisin MİK<sub>90</sub> değerini 1 µg/mL olarak bildirmişlerdir (Kohanteb, 2007). Vega ve ark, *H. pylori* NCTC 11638 standart suşunda klaritromisin agar dilüsyon yöntemi ile MİK değerini 0.125 mg/L olarak saptamışlardır (Vega, 2009). Klaritromisin dirençli *H. pylori* suşlarında ise, *H. pylori* suşu A2143G mutasyonuna sahipse MİK değeri genellikle 0.5-4 µg/mL ve A2142G mutasyonuna sahipse 8-32 µg/mL olduğu bildirilmiştir (Taylor, 2000). A2143G mutasyonuna sahip *H. pylori* suşlarında klaritromisin için düşük MİK



(<64 mg/L) saptanırken, A2142G ve A2142C mutasyonuna sahip *H. pylori* suşlarında özellikle klaritromisin için yüksek MİK (>64 mg/L) değeri saptanmaktadır (Gerrits, 2006; Gibreel, 2005; Van Doorn, 2001).

*H. pylori*'de klaritromisin direncinin yanısıra, *H. pylori* enfeksiyonunda tedavi başarısızlığı çoğu antibiyotiğin gastrik asitte hızlı degrede olması, tablet ya da kapsüllerin midede uzun süre varlığını sürdürememesi, mukus tabakasına antibiyotik geçirgenliğinin zayıf olması ya da midenin asidik pH'sında ilacın stabilitesinin azlığından ve oral yoldan alındıktan sonra enfeksiyon bölgesindeki subterapötik antibiyotik konsantrasyonu ile ilişkilidir (Majithiya, 2005; Zheng, 2006). Ayrıca, antibiyotikler mukus tabakasına difüze olabilecek kadar yeterli zamana sahip olmayabilir ve gastrik mukustaki antibiyotik konsantrasyonu MİK düzeyine ulaşamayabilir (Majithiya, 2005).

### 2.3. Uçucu Yağlar

Uçucu yağlar, bitkilerin çiçek, tohum, yaprak, meyve ve köklerinden genellikle distilasyon ya da ekstraksiyon işlemleriyle elde edilen uçucu, kuvvetli kokulu ve hidrofobik sıvılardır. İçerdikleri aktif bileşenlerden dolayı antimikrobiyal ve antioksidatif etki gösterirler. Bitkisel ürünler yıllardan beri bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olup, bu bitkilerden elde edilen uçucu yağlara karşı bakterilerin direnç gösterdiği saptanmamıştır (Toroglu, 2006). Dolayısıyla uçucu yağların antibiyotiklerle kombine olarak ya da antibiyotiklere alternatif olarak *H. pylori* eradikasyonunda kullanımı umut vaat eden bir düşüncedir.

İklim, toprak yapısı ve bitkinin yaşı, bitkiden elde edilecek uçucu yağın kalitesini, miktarını ve kompozisyonunu etkileyen faktörlerdir. Bilinen 3000 çeşit uçucu yağın 300'ü aromaterapide, gıdalarda, parfümlerde ve ilaçlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Burt, 2004). Uçucu yağlar, içerdikleri karvakrol, öjenol ve timol gibi biyolojik olarak aktif bileşenlerden dolayı antimikrobiyal özellik gösterirler (Pranoto, 2005). İçerdikleri doğal fenolik bileşiklerin yanısıra monoterpen alkoller, ketonlar, aldehitler ve hidrokarbonlar serbest radikallerin tutulmasına yardımcı olup antioksidatif etki yaparlar. Bu sayede oksidatif stresi engelleyip birçok dejeneratif hastalığın önlenmesine yardımcı olurlar. Fesleğen, tarçın, karanfil, hindistancevizi, mercanköşk ve kekik bitkilerinin uçucu yağlarının serbest radikal bağlama ve antioksidan özellikleri 2,2-

difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerinden serbest radikal süpürme yöntemiyle belirlenmiştir (Tomaino, 2005).

Fenolik bileşiklerin *H. pylori*'nin üremesini inhibe etme mekanizması tam bilinmemekle birlikte, üreaz enzimini inhibe etmesi, bakterinin insan gastrik mukozasına tutunmasını engellemesi ve iltihaplanma ve ülserle sebep olan sitotoksin aktivitesini inhibe etmesi gibi bazı teoriler öne sürülmüştür (Romero, 2007). Uçucu yağların kolon, mide ve meme kanseri ile lösemi, karaciğer ve akciğer tümörlerini baskılayıcı etkileri insan kanser hücreleri üzerinde test edilmiştir. Bakterilerin antibiyotik direncinin artmasına karşılık antimikrobiyal özellik gösteren bitkilere ve bitkisel ürünlere karşı direnç kazandığı görülmemiştir (Toroglu, 2006). Abascal ve Yarnell antimikrobiyal özellik gösteren bitkilerin ilaçlara alternatif olarak veya antibiyotiklerle kombine edilerek kullanılabilmesine ve bu sayede antimikrobiyal direncin indirgenebileceğine dikkat çekmişlerdir (Abascal, 2002).

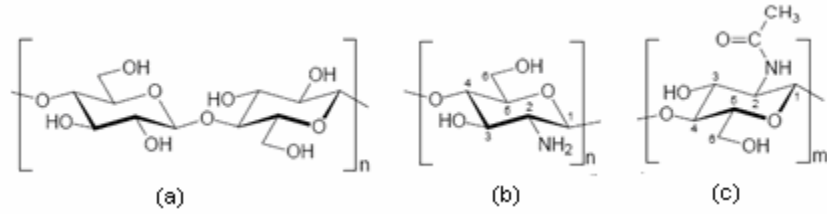
Bergonzelli ve ark. *H. pylori* üzerine etkisini araştırdıkları 60 uçucu yağdan 30'unun *in vitro* olarak üremeyi inhibe ettiğini, 15'inin ise çok güçlü bakterisidal aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu yağlar arasında en yüksek bakterisidal etkiyi havuç, tarçın, manuka yağlarının gösterdiği belirlenmiştir. Limonotu yağının en temel bileşeni olan sitral *H. pylori*'ye karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Tarçın yağında ise tüm bileşenlerin *H. pylori*'ye karşı çok yüksek aktivite göstermesinden dolayı tarçın yağı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca uçucu yağların kompozisyonlarının çeşitli coğrafik bölgelere ve iklim özelliklerine göre değişmesinden dolayı antibakteriyel özelliklerinin değişebileceğini ve bu nedenle aktif bileşenlerin antibakteriyel etkilerinin belirlenmesinin daha iyi olacağını belirtmişlerdir (Bergonzelli, 2003). Ohno ve ark. İse *in vitro* olarak yağların %1'lik konsantrasyonda kullanıldığında *H. pylori*'nin üremesini tamamen inhibe ettiğini, *Cymbopogon citratus* (lemongrass) ve *Lippia citriodora* (lemon verbena) uçucu yağlarının ise % 0.01'lik konsantrasyonda pH 4.0 ve 5.0'da *H. pylori*'ye karşı bakterisidal etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Farelerde yapılan *in vivo* çalışmalarda ise, limonotu yağıyla muamele edilen farelerin midesindeki *H. pylori*'nin yoğunluğu, muamele edilmeyenlere oranla önemli derecede düşmüştür. Bu çalışma ile *H. pylori*'ye karşı direnç gelişimini önlemede uçucu yağların kullanılabilmesini, *H. pylori*'ye karşı yeni ve güvenli bir antimikrobiyal ajan olabileceği ileri sürülmüştür (Ohno, 2003). Bunun yanısıra, sarımsak, tarçın ekstresi, brokoli ve yabanmersiniyle yapılan *in vitro* çalışmalarda *H. pylori*'nin üremesini inhibe ettiği görülmesine rağmen *in vivo*

çalışmalarda başarısız sonuçlar alınmıştır. Bu da bitki ve bitki ürünlerinin ilaçlarla kombine kullanımının daha etkili bir tedavi sağlayabileceği görüşünü desteklemektedir (Bergonzelli, 2003). Bakterilerde antibiyotik direncinin artmasına karşılık antimikrobiyal özellik gösteren bitkilere ve bitkisel ürünlere karşı direnç kazandığı görülmemektedir. Shikov ve ark. *Chamomilla recutita* (papatya) yağının *H. pylori* için MİK değerini 125 mg/ml olarak belirlemişlerdir. Bu konsantrasyonda *H. pylori*'nin üreaz enzimi üretimini durduğunu ve bakterinin morfolojisinin değiştiğini gözlemlemişlerdir. Kompleks tedavi gerektiren mide ülseri gibi hastalıklarda, antibiyotik alerjisi olan hastalarda ve antibiyotiğe dirençli *H. pylori* suşlarının inhibe edilmesinde bu yağın kullanılabilceğini bildirmişlerdir (Shikov, 2008).

#### **2.4. Kitosan**

Kitin, selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci biyopolimerdir. Yengeç, karides gibi kabuklu su ürünlerinin ana bileşeni olup, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarlarının yapısında da bulunmaktadır. Dünyada yıllık kitin üretiminin yaklaşık 150x10<sup>3</sup> ton civarında olduğu belirtilmektedir (Guang, 2002). Böcek kabuklarında yaklaşık % 23.5 oranında kitin bulunurken bu oran yengeç ve karideste sırasıyla % 17 ile % 32 arasında değişmektedir. Kitinin birçok türevi bulunmakla beraber, desetilasyonu sonucu başlıca türevi olan kitosan elde edilmektedir. Kitosanın uygulama alanları, eczacılık, medikal, atık su arıtma, biyoteknoloji, kozmetik, gıda, tekstil ve ziraat şeklinde sıralanmaktadır. Toksisitesinin bulunmaması, alerji ve iritasyon yapıcı olmaması, biyoyumlu ve biyoparçalanabilir oluğu farmasötik ve medikal alanda kitosanı önemli ve ilgi çekici bir biyomateryal yapmaktadır. Ayrıca fizyolojik pH'da pozitif yüklü olmasından dolayı biyoyapışkanlık özelliğine sahiptir (Berger, 2004). Kitosan aynı zamanda önemli biyoaktif özelliklere sahiptir. Bunlar arasında hemostatik, bakteriyostatik, fungistatik, antikanserojen, yara iyileşmesini hızlandırıcı ve kemik iyileşmesini hızlandırıcı özellikleri sayılabilir (Gobin, 2005).

Kitosanın kimyasal yapısı, poli-[b-(1,4)-2-amino-2-deoksi-b-D-glukopiranoz] şeklindedir. Kitin ve kitosan polisakkaritleri, kimyasal olarak selüloza benzemekle birlikte kendi aralarında birtakım farklılıklar göstermektedir. Selülozda, ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitinde asetamid (-NHCOCH<sub>3</sub>), kitosanda ise amin (-NH<sub>2</sub>) grubu bulunmaktadır.



**Sekil 3.** Selüloz (a), kitosan (b) ve kitinin (c) kimyasal yapıları (Jayakumar, 2010)

Kitosan, her tekrarlayan birimdeki primer (C-6), ve sekonder (C-3) hidroksil grupları ile amin (C-2) grubu olmak üzere toplam üç tane reaktif gruba sahiptir. Bu reaktif gruplar kolayca kimyasal modifikasyona uğrayabilmekte ve kitosanın mekaniksel ve fiziksel özellikleri ile çözünürlüğünü değiştirmektedir. Kitosanın çözünmesi için en çok kullanılan çözgen asetik asittir. Kitosanın çözünürlüğünü etkileyen sıcaklık, çözgen konsantrasyonu ve partikül büyüklüğü gibi birçok parametre bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar iyi bir çözünürlük için kitosanın en az % 75-80 deasetilasyon derecesine sahip olması gerektiğini göstermiştir. Asidik ortamda  $\text{NH}_2$  grubu  $-\text{NH}_3^+$  şeklinde bulunmakta ve ortamdaki anyonik gruplarla elektrostatik olarak etkileşime girmektedir. Protonlaşmış durumda katyonik polielektrolit davranışı göstermekte, viskoz çözeltiler oluşturmakta ve zıt yüklü molekül ve yüzeylerle etkileşime girebilmektedir. 1960'ların ortalarından beri Japonya başta olmak üzere pek çok Asya ülkesinde medikal tekstiller konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle yara tedavisinde doku sağlanması için kitosan oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, medikal yapay deri, cerrahi dikiş iplikleri, yapay kan damarları, kontrollü ilaç salımı, kontakt lens yapımı, yara bandı, sargı bezi, kolesterol kontrolü (yağ bağlayıcı), tümör inhibitörü, antifungal, antibakteriyel, ve hemostatik etki göstermesi vb. şeklinde sıralanabilmektedir (Gonzalez, 1999). In-vivo testler, kitosanın insan vücuduna herhangi bir yan etkisi bulunmadığını göstermiştir. Kitosan, tablet olarak kullanılması halinde tükürük veya midede bulunan lipaz enzimi tarafından parçalanabilmektedir. Parçalanma sonucunda amin şekerleri gibi toksik özellikte olmayan ürünler açığa çıkmaktadır. Kitosan diğer yandan kolesterol düşürücü etkiye de sahiptir. Polikasyonik yapısı nedeniyle negatif yüklü lipidler ile etkileşime girerek kolesterolü düşürmektedir.

Farmasötik alanda kitosan bazlı jel, film, sünger, tablet ve mikropartiküler sistemler (mikroküre, mikrokapsül vb.) bulunmaktadır (Gouin, 2004; Polnok, 2004; Rujiravanit 2003).

Mikropartiküler sistemler genellikle etkin maddeyi oksijen, ışık, farklı çevresel koşullar ve kimyasallardan korumak ve izole etmek için geliştirilir (Shikov, 2008). Kitosanın serbest amin grubu katyonik özellik kazandırması nedeniyle negatif yüklü ilaçlar, polimerler ve biyoaktif moleküllerle etkileşimini sağlamaktadır. Jel olusturabilmesi, kopolimer gibi çok çeşitli formlarda bulunması ilaç salım sistemlerinde büyük avantaj sağlamaktadır. Kitosan mikrokürelerinde ilaç yükleme etkinliğini etkin maddenin özellikleri, kitosan konsantrasyonu, ilaç/polimer oranı gibi faktörlerin etkilediği bildirilmiştir. Kitosan mikrokürelerden etkin madde salımını etkileyen parametreler arasında kitosanın molekül ağırlığı, konsantrasyonu, mikrokürelerin yüklenen etkin madde miktarı, ilaç/kitosan oranı, çapraz bağlanma oranı ve kullanılan çapraz bağlayıcı olduğu bildirilmiştir (Gonzalez, 1999).

## 2.5. Mikroküreler

Mikroküreler, içlerinde etkin maddenin moleküler düzeyde ya da makroskopik partiküller halinde dağıtıldığı, çapları birkaç mikrometreden birkaç yüz mikrometreye kadar değişebilen monolitik yapıda katı, küresel, partiküler mikrot taşıyıcılardır. Mikroküreleri, mikropellet, mikrokapsül gibi ilaç taşıyıcı mikropartiküler sistemlerden ayıran en önemli fark mikrokürelerde etkin maddenin taşıyıcı matriks içerisinde çözünmüş veya dağılmış halde bulunmasıdır. Mikroküre sistemleri bu yapıları nedeniyle matriks ilaç dağıtım sistemlerine örnektir. Mikrokürelerden beklenen başlıca özellikler; etkin maddeyi kontrollü şekilde salması, etkin maddenin yapı ve aktivitesini olumsuz yönde değiştirmemesi, etkin maddeyi hedef organ, doku ve hücreye taşıması, hedefe ulaşana dek etkin madde sızıntısı olmaması, in vitro ve in vivo koşullarda oldukça dayanıklı olması, düşük dozda etkin madde kullanımına olanak sağlaması, düşük doza bağlı olarak toksisitesinin azalması ve biyolojik sistemle uyumlu olmasıdır. Mikrokürelerin hazırlanmasında lipitler, aminopolisakkaritler, proteinler ve karbonhidratlar gibi doğal polimerler veya selüloz türevleri, poliesterler, poliakrilamidler ve silikonlar gibi sentetik yapı polimerler yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan yöntemler şöyle sıralanabilir;

- Emülsiyon oluşturma yöntemleri,
  - Çözücü buharlaştırma yöntemi
  - Çözücü ekstraksiyon yöntemi

- Protein jelasyon yöntemi
- Polimerizasyon yöntemleri
- Koeservasyon yöntemleri
- Püskürtmeli kurutma,
- Püskürterek dondurma.

Mikrokürelerin tanımlanmasında ve kullanımında; büyüklük ve yüzey özellikleri, yüklenen etkin madde miktarı, etkin maddenin salımı, biyolojik uyum ve toksisite, saklama ve sterilizasyon kriterleri incelenir ve esas alınır. Mikrokürelerin klinik uygulamaları; antikanserojen ilaçlar, antienflamatuar ilaçlar, lokal anestezipler, ortopedik uygulamalar, implantasyon, doku, hücre veya organa hedefleme, peptid ve proteinlere bağlanma ve aşılarda olarak yoğunlaşmıştır.

Püskürtmeli kurutma en yaygın kullanılan mikroküre üretme tekniklerindedir. Genellikle süt tozu, kahve, ilaç, sabun ve deterjan üretiminde kullanılır. Püskürtmeli kurutma işlemi, kurutulması istenen, pompalanabilir akışkanın kurutma ortamı olarak kullanılacak yüksek sıcaklıktaki gaz akışkana püskürtülmesi ile katı/yarı katı hale geçmesi olarak tanımlanabilir. Bu yöntemde aktif madde polimer solüsyonunda çözünür ya da asılı tutulur ve solüsyon sıcak kurutma ortamına bir püskürtücü yardımıyla gönderilir. Kurutma ortamı, besleme akımı ile paralel veya zıt yönde sistemden geçirilebilir. Çıkış gazı ile sürüklenebilen toz halindeki ürün siklon seperatör veya torba filtrelerde tutulur (Desai, 2005). Kurutulan ürünler üniformdur ve kuruma süreleri 5 ile 15 saniye arasında değişir. Püskürtmeli kurutma işlemi mikrokürelerin ısıya maruz kalma süresi çok kısa olduğundan hem ısıya dirençli hem ısıya duyarlı ilaçlar için ve aynı zamanda hidrofilik ya da hidrofobik polimerler için uygundur. Ayrıca püskürtmeli kurutma işlemiyle üretilen mikrokürelerin parça boyutu dağılımı çok dar bir aralıkta değişir (Kosaraju, 2006).

## **2.6. Kitosan Mikroküre İlaç Salım Sistemleri**

Kitosan bazlı mikrokürelerden *H. pylori* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan bazı antibiyotiklerin salımı üzerine yapılan çalışmalar Tablo 1' de özetlenmiştir. Kitosan mikrokürelerin eldesinde genellikle emülsiyon/faz ayrıştırma, dondurarak kurutma ve çapraz bağlama/çöktürme yöntemleri kullanılmıştır. Amoksisillin, klaritromisin, tetrasiklin ya da metranidazol gibi antibiyotik yüklü mikrokürelerden ilaç salımı çalışmalarında, ilaç/polimer

oranı, karıştırma hızı gibi parametrelerin ilaç tutma verimi, parçacık boyutu, şişme oranı ve ilaç salım kinetiği üzerine etkileri incelenmiştir.

**Tablo 1.** *H. pylori* tedavisi için antibiyotik salım sistemleri

Polimer	Sistem	Teknik	Çapraz Bağlama Ajanı	İlaç	Kaynak
Kitosan Poliakrilik asit	Hidrojel	Dondurarak kurutma	-	amoksisillin	(Torre, 2003)
Kitosan	mikroküre	Emülsiyon oluşturma	glutaraldehit	amoksisillin	(Patel, 2007)
Kitosan	mikroküre	Emülsiyon oluşturma	glutaraldehit	klaritromisin	(Majithiya, 2005)
Kitosan Poliakrilik asit	Hidrojel	Dondurarak kurutma	-	amoksisillin	(Torre, 2004)
Kitosan	mikroküre	İyonik çapraz bağlama/ çöktürme	-	tetrasiklin	(Hejazi, 2002)
Kitosan	mikroküre	Kimyasal çapraz bağlama/ çöktürme	Glyoxal	tetrasiklin	(Hejazi, 2004)
Kitosan Poli(etilen oksit)	Hidrojel	Dondurarak kurutma	Glyoxal	amoksisillin metranidazol	(Patel, 1996)
Kitosan Poliakrilik asit	Hidrojel	Dondurarak kurutma	-	amoksisillin	(Torrado, 2004)

Patel ve Amiji kitosan ve poli(etilen oksit)i çapraz bağlayarak midede pH'a duyarlı antibiyotik salım sistemi geliştirmeyi amaçladılar. Dondurarak kurutma yöntemiyle elde ettikleri hidrojellerden amoksisillin ve metranidazolun SGF içerisine 2 saatte sırasıyla, % 65 ve % 59'unun salındığını tespit ettiler (Patel, 1999). Hejazi ve Amiji ilk çalışmalarında midede tetrasiklin salımını sağlayacak kitosan mikrokürelerin eldesini iyonik çapraz

bağlama ile gerçekleştirdiler ve bu mikrokürelere maksimum % 69 tetrasiklin yükleyebildiler. pH 1.2 lik solüsyonda serbest ya da mikrokürelere salınan tetrasiklinin 12 saatte % 30'unun degrade olduğunu belirlediler (Hejazi, 2002). Sonraki çalışmalarında ise tetrasiklin yüklü kitosan mikrokürelere kimyasal çapraz bağlama yöntemiyle elde ederek bu işlemin mikrokürelere midede tutunma süresine ve memeli kemirgenlerde oral alımdan sonra lokal tetrasiklin konsantrasyonuna etkisini incelediler. Kimyasal çapraz bağlama yöntemiyle elde edilen mikrokürelere iyonik çapraz bağlamayla elde edilenlere göre daha uzun süre midede tutunduğunu belirlediler (Hejazi, 2004). Mide ülserinin tedavisinde kullanılabilecek, mukoyapışkan özelliğe sahip klaritromisin yüklü mikrokürelere geliştirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada kitosan bazlı mikrokürelere glutaraldehit kullanılarak emülsiyon oluşturma yöntemiyle elde edilmiştir. Bu mikrokürelere % 74 oranında ilaç yüklenebildiği, çapraz bağlamayla mikrokürelere mukoyapışkanlığının ve ilaç salım hızının azaldığı, polimer oranının artmasıyla ise mukoyapışkanlığın arttığı saptanmıştır (Majithiya, 2005). Uçucu yağ yüklü mikrokürelere eldesi ve kontrollü salım üzerine çalışma sınırlı sayıdadır. Bu alanda yapılan bir çalışma olmamasına rağmen, limonotu yağı benzeri bir uçucu yağın kitosan mikrokürelere yüklenmesi yağ/su emülsiyon oluşturma yöntemiyle sağlanmıştır. Kitosan konsantrasyonunun ve karıştırma hızının kapsülleme verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Karıştırma hızının artmasıyla parçacık boyutunun küçüldüğü belirlenmiştir (Hsieh, 2006).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Agar Dilüsyon Yöntemi ile MİK Değerinin Belirlenmesi**

##### **3.1.1. *H. pylori* Kültür Besiyerlerinin Hazırlanması**

###### *%7 At Kanlı H. pylori Seçici Besiyeri:*

465 ml. Distile su içerisine 19.5 gr Columbia Blood agar (Oxoid) eklendi, 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra besiyeri 50 °C'ye geldiğinde 35 ml steril defibrine at kanı (Horse Blood Defibrinated, Oxoid) ve 2 ml steril distile su içerisinde eritilen *Helicobacter pylori* Selective Supplement (DENT, Oxoid) besiyerine ilave edildi. Daha sonra



besiyeri 90 mm petrilere 20'şer ml olarak aseptik koşullarda döküldü. Kontaminasyon kontrolü için besiyerleri 37°C'de etüvde 24 saat bekletildikten sonra buzdolabında +4 °C'de saklandı.

#### %20 Gliserollü *H. pylori* Stok Besiyeri:

% 40'lik gliserol solüsyonu (Baked Analyzed) ve 40 ml Brain Heart Infusion (BHI) buyyon (Beckton Dickinson and Company) ayrı ayrı 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Seroloji Laboratuvarından serolojik olarak taranmış taze insan serumu filtreden geçirilip 56°C 30 dakika su banyosunda inaktive edildi. Stok besiyeri için hazırlanan bu solüsyonlar ve 10 ml taze insan serumu karıştırılarak steril ependorflara 1'er ml olacak şekilde paylaştırıldı ve +4°C'de buzdolabında saklandı.

### **3.1.2. *H. pylori* Kültür Protokolü**

*Helicobacter pylori* NCTC 11637 (*cagA*, *vacA*, *oipA*, *babA* (+)) standart suşu %7 at kanlı Columbia Blood agar (Oxoid) besiyerine pasajlandı. Ekim yapılan plaklar 37°C'de 3 gün anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda enkübe edildi. Standart suşun üreyen kolonilerinin üreaz, katalaz, oksidaz testleri yapıldı, ayrıca Gram boyama ve modifiye karbol fuksin boyaması ile tipik morfolojisi incelendi.

Standart suşun üreyen kolonilerinin %7 At Kanlı Columbia Blood Agar besiyerine subkültürleri yapıldı. Subkültürde üreyen koloniler %20 Gliserollü BHI Buyyon stok besiyerinde homojenize edilerek -80°C'de saklandı.

### **3.1.3. Agar Dilüsyon Yöntemi ile MİK Değerinin Belirlenmesi**

#### Stok Antibiyotik (*Klaritromisin*) Solüsyonu Hazırlanması:

Stok çözeltilerinin hazırlanmasında iki farklı çözücü kullanılmıştır. Asetik asit ve metanol

#### Çözücü: Asetik Asit

Toz haldeki 12.8 mg klaritromisin (Bilim İlaç), 10 ml % 0,125 lik (v/v) seyreltik asetik asit (Merck) içerisinde çözüldü. Konsantrasyonu 1280 µg/ml (w/v) olan bu solüsyondan 625 µl alındı ve üzerine 7,375 ml PBS (Biochrom AG) eklenerek 100 µg/ml (w/v) lik stok ilaç

solüsyonu elde edildi ve 0,22 µm'lik steril filtreden (Sartorius Stedim) geçirilerek solüsyon steril edildi. Stok antibiyotik solüsyonundan 2 kat seri dilüsyonlar hazırlandı. Bunun için 9 adet steril cam tüpe 1'er ml steril PBS ilave edildi. Stok solüsyondan ilk tüpe 1 ml eklendi ve bu tüpten 1 ml çekilerek bir sonraki tüpe aktarıldı. Son tüpe ekleme yapıldıktan sonra bu tüpten 1 ml dışarı atıldı. Böylece tüplerde ilaç solüsyonu konsantrasyonu 50 µg/ml – 1.75 µg/ml aralığında 2 kat dilüsyonla azalan 9 ayrı konsantrasyon elde edildi. Hazırlanan 1 ml'lik bu ilaç solüsyonları 50 ml'lik besiyeri içerisinde 1 µg/ml – 0.0037 µg/ml ilaç konsantrasyonu içermektedir.

#### *Çözücü: Metanol*

Toz haldeki 25 mg klaritromisin 25 ml metanol (Merck) içerisinde çözüldü. Konsantrasyonu 1000 µg/ml (w/v) olan bu solüsyondan 1 ml alındı ve üzerine 9 ml PBS eklenerek 100 µg/ml (w/v) lik stok ilaç solüsyonu elde edildi ve 0.22 µm'lik steril filtreden geçirilerek solüsyon steril edildi. Seri dilüsyonlar asetik asit çözeltisinde bahsedildiği gibi hazırlandı.

#### *Stok Limonotu Yağı ve Tarçın Yağı Solüsyonlarının Hazırlanması:*

300 mg limonotu yağı (Sigma) ve tarçın yağı (Sigma) 3 ml etanol içerisinde çözüldü. Konsantrasyonu 100 mg/ml (w/v) olan bu solüsyonlar stok solüsyonu olarak kullanıldı ve 0.22 µm'lik steril filtreden geçirilerek steril edildi. Stok solüsyondan 2 kat seri dilüsyonlar yukarıda bahsedildiği şekilde hazırlandı. Böylece tüplerde yağ konsantrasyonu 50 mg/ml – 50 µg/ml aralığında 2 kat dilüsyonla azalan 11 ayrı konsantrasyon elde edildi. Hazırlanan 1 ml'lik bu solüsyonlar 50 ml'lik besiyeri içerisinde 1000 µg/ml – 1 µg/ml ilaç konsantrasyonu içermektedir.

#### *Besiyerinin Hazırlanması:*

Besiyeri olarak %5 Koyun Kanlı Mueller Hinton Agar (Oxoid) kullanıldı. 50 ml'lik erlen içerisinde tartılan 1.9 g Mueller Hinton agar 46.5 ml distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldü. Besiyerleri 121 °C'de 15 dakika steril edildi. Otoklav sonrası besiyerlerine manyetik karıştırıcı üzerinde 2.5 ml steril defibrine koyun kanı (Sheep Blood Defibrinated, Oxoid) ve ilaç ya da yağ solüsyonları eklendi. Her besiyeri 90 mm'lik 2 steril petriye eşit miktarda (25 ml) döküldü ve donmaya bırakıldı. Kontrol besiyerine ilaç solüsyonu yerine 1 ml PBS eklendi.

#### Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması:

5 ml Brucella Broth (Beckton Dickinson and Company) içerisinde bakteri kolonileri süspansiyon edilerek McFarland 2 ( $6 \times 10^8$  CFU/ml)'ye göre hazırlandı (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006). Hazırlanan bakteri süspansiyonlarının bulanıklık eşeli Densimat (Biomerieux) ile ölçüldü.

#### Bakteri Süspansiyonunun İnokulasyonu:

McFarland 2 ( $6 \times 10^8$  CFU/ml)'ye göre ayarlanan bakteri süspansiyonundan 3 µl alındı ve doğrudan antibiyotik solüsyonlarını içeren agar dilüsyon plaklarına nokta ekimi yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri 37 °C'de 3 gün anaerobik jar içerisinde GasPak Campy Container System kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda enkübe edildi. Enkübasyon sonunda koloniler gözlemlendi ve MİK belirlendi. CLSI'ya göre, klaritromisin için MİK sınır değerleri  $\leq 0,25$  µg/ml duyarlı (S), 0.5 µg/ml orta duyarlı (I) ve  $\geq 1.0$  µg/ml dirençli (R) olarak değerlendirildi. (Minimum kalite kontrol önerilerinde standart suş *Helicobacter pylori* ATCC® 43504) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006).

### **3.1.4. E-Test Yöntemi ile MİK Değerinin Belirlenmesi**

#### Besiyerinin Hazırlanması:

Besiyeri olarak %5 Koyun Kanlı Mueller Hinton Agar kullanıldı. 38 gr Mueller Hinton agar 1 lt distile su içerisinde. 121 °C'de 15 dakika otoklavlandı. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra besiyeri 50°C'ye geldiğinde steril defibrine koyun kanı (%5 v/v) ve polyvitex (Biomerieux) ilave edilerek besiyeri petrilere 20'şer ml olarak aseptik koşullarda döküldü. Kontaminasyon kontrolü için besiyerleri 37°C'de 24 saat etüvde bekletildikten sonra buzdolabında +4 °C'de saklandı.

#### Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması:

5 ml Brucella Broth içerisinde bakteri kolonileri süspansiyon edilerek McFarland 3 ( $10^9$  CFU/ml)'e göre hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonlarının bulanıklık eşeli Densimat ile ölçüldü.

### Bakteri Süspansiyonunun İnokülasyonu:

McFarland 3 ( $10^9$  CFU/ml)'e göre ayarlanan bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak inokulum besiyeri yüzeyine steril öze ile yayıldı. Yüzey tamamen kuruduktan sonra klaritromisin E-test stripleri (AB Biodisk) her 90 mm lik plak yüzeyine 1 adet olacak şekilde yerleştirildi. Besiyerleri 3-4 gün mikroaerofilik ortamda 37 °C'de anaerobik jar içerisinde GasPak Campany Container System kullanılarak enkübe edildi. Enkübasyon sonunda E-test ile klaritromisin için MİK sınır değerleri CLSI'ya göre, <0.5 µg/ml duyarlı (S) ve  $\geq 1.0$  µg/ml dirençli (R) olarak değerlendirildi. (Minimum kalite kontrol önerilerinde standart suş *Helicobacter pylori* ATCC® 43504) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006).

### **3.2. Uçucu Yağların Bileşenlerinin ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Uçucu yağların bileşenleri Gaz kromatografi Kütle Spektrometresi Analizi ile belirlenmiştir. Analiz Agilent 6890N Network GC sistem ile birlikte Agilent 5973 Network Mass Selective detektör kullanılarak yapılmıştır. Kapiler kolon olarak HP SMS (Capillary; 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) ve 1 ml/dk akış hızında helyum taşıyıcı gaz kullanılmıştır. Örnekler 1 µl olarak enjekte edilmiştir. Enjektör sıcaklığı 250°C'de tutulmuştur. Kolon için uygulanan sıcaklık programı Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2.** GC-MS sıcaklık programı

Sıcaklık	Artış Oranı (°C/dak)	Tutulma Zamanı (dak)	Toplam Zaman (dak)
40 °C	---	3	3
150 °C	2	---	58
230 °C	8	3	71

Uçucu yağların antioksidan özelliklerini belirlemek için TEAC (trolox eşdeğeri antioksidan kapasitesi) metodu kullanılmıştır. Bu metotta ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenziazolin-6sülfonik asit]) potasyum persülfatla karıştırılıp serbest radikal özelliği gösteren (ABTS<sup>+</sup>) radikali oluşturulmuştur. ABTS<sup>+</sup> kullanılarak belirlenen antioksidan aktivitelerin kıyaslanabilmesi için Troloks ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetra-metilkroman-2-karboksilik asit) çözeltisinin antioksidan aktivitesi baz alınmıştır. Antioksidan kapasitesi ölçümleri, Perkin Elmer

UV-Visible spektrofotometrede, 734 nm de ABTS<sup>+</sup> çözeltilisine değişik miktarlarda uçucu yağ eklenerek renk kaybının 6 dakika boyunca izlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağların ve standart troloks'un konsantrasyona karşı çizilen yüzde inhibisyon grafiklerinin eğimleri oranlanarak uçucu yağların antioksidan kapasiteleri mmol troloks/ ml uçucu yağ olarak hesaplanmıştır. Bu değer TEAC değeri olarak alınmıştır.

### 3.3. Kitosan Mikrokürelerin Eldesi

Püskürtmeli kurutma işlemi, standart 0.5 mm nozül ve paralel akış özelliğine sahip Buchi® Mini Spray Dryer B-290 (Switzerland) püskürtmeli kurutma sistemiyle gerçekleştirilmiştir. Kurutma işlemi için besleme akışkanı atomizere pompalanır. Filtreden geçirilen dış ortam havası, belirlenen kurutma sıcaklığına ayarlanır ve kurutma ortamına verilir. Sıcak hava ve püskürtülen akışkan paralel akışta hareket eder. Atomize edilmiş damlacıklar sıcak hava ile temas ettiklerinde buharlaşma gerçekleşir ve kurutulmuş ürün siklondan geçerek ürün toplama kabında toplanır. Püskürtmeli kurutma işleminde kontrol kitosan mikrokürelerin üretiminde pompa hızı ve hava giriş sıcaklığı maksimum miktarda ürün elde edilecek şekilde ayarlanmıştır.

Kitosan stok solüsyonu (%1 (w/v)), yüksek molekül ağırlıklı kitosanın (Sigma-Aldrich Chemie, Almanya, kat. # 419419, deasetilasyon derecesi %86) %2 lik asetik asitte çözülmesiyle elde edilmiştir. Hazırlanan solüsyon 3 ve 6 ml/dak besleme hızlarıyla atomizere pompalanmış ve 120 ile 140°C hava giriş sıcaklıklarında kurutma işlemiyle kontrol kitosan mikroküreleri üretilmiştir. Klaritromisin ve kitosanın %2 lik asetik asitte çözülmesiyle hazırlanan klaritromisin ve kitosanın solüsyonları 1 saat karıştırıldıktan sonra klaritromisin ve kitosan son konsantrasyonları sırasıyla %0.1 ve %1 olan solüsyon elde edilmiştir. Bu solüsyonun püskürtmeli kurutucuda 180°C hava giriş sıcaklığında 4 ml/dak besleme hızında kurutulmasıyla klaritromisin yüklü kitosan mikrokürelerin elde edilmiştir. Tarçın yağı yüklü kitosan mikrokürelerin eldesinde ise %1 (w/v) lik 500 ml kitosan stok solüsyonu hazırlanmış, bu solüsyona 2.5 ml tarçın yağı damla damla eklenerek 1 saat karıştırılmıştır. Solüsyon 6 ml/dak besleme hızlarıyla atomizere pompalanmış ve 195°C hava giriş sıcaklığında kurutulmuş tarçın yağı yüklü kitosan mikroküreler üretilmiştir.

Püskürtmeli kurutma verimliliği (KV), etken madde yükleme kapasitesi (YK) ve etken madde yükleme verimliliği (YV) aşağıda verilen eşitliklerle hesaplanmıştır (Lu, 2009):

$$KV(\%) = \frac{\text{mikroküre miktarı}}{\text{polimer miktarı}} \times 100$$

$$LC(\%) = \frac{\text{etken madde miktarı}}{\text{mikroküre miktarı}} \times 100$$

$$LE(\%) = \frac{\text{gerçek etken madde miktarı}}{\text{teorik etken madde miktarı}} \times 100$$

### 3.4. Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Üretilen mikrokürelerin boyutu ve yüzey morfolojisi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezi'ndeki Taramalı Elektron Mikroskopuyla (Philips XL 30S FEG, FEI Company, Eindhoven, Hollanda) incelenmiştir. Toz haldeki mikroküreler, numune tutucu tabla üzerine çift taraflı yapıştırıcıyla sabitlenmiş ve 60 s boyunca vakum altında altın ile kaplanarak iletken hale getirilmiştir. Mikrokürelerin termal özellikleri ise N<sub>2</sub> gaz akışı (40 ml/dak) altında Termogravimetrik Analiz (TGA) (Shimadzu TGA-51) ile incelenmiştir. TGA analizinde sıcaklık 10°C /dak hızla 20°C'den 400°C'ye çıkarılmıştır. Klaritromisin, kitosan ve klaritromisin yüklü mikrokürelerin yapısal özellikleri Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (Varian 400 MHz) analizi (<sup>1</sup>H-NMR) ile D<sub>2</sub>O içerisinde incelenmiştir. Tarçın yağının termal özellikleri Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile -20°C ile 400°C aralığında incelenmiştir. Mikrokürelerin simule mide sıvısı içinde şişme ve çözünme davranışları faz kontrast mikroskopuyla incelenmiştir.

### 3.5. Klaritromisin ve Tarçın Yağının Mikrokürelerden Salımı

Kitosan mikrokürelerden klaritromisin ve tarçın yağı salımı pH'sı 2 olan simule edici mide sıvısına (SGF) yapılmıştır. Klaritromisin miktarı HPLC ile belirlenmiştir. HPLC çalışma koşulları ve özellikleri Tablo 3'te verilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda klaritromisin solüsyonları hazırlanarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. İlaç salımı çalışmalarında, % 0.1

içeren 200 mg mikroküre 100 ml SGF içerisine eklenmiş ve bu süspansiyon çalkalamalı inkübatörde 37°C ve 150 rpm’de sürekli çalkalanmıştır. 10., 30., 60., 120., 180. dakikalarda ve 24. saatte alınan 150 µl lik örnek 5000 rpm de 3 dak. santrifüjlendikten sonra süpernatant HPLC’ye enjekte edilerek klaritromisin miktarı belirlenmiştir. Her örnekleme sonrasında 150 µl taze SGF ortama ilave edilmiştir.

Tarçın yüklü mikrokürelere salınan tarçın yağı miktarı UV-spektrofotometriyle belirlenmiştir. Analizler UV-spektrofotometrede spectrum taramasında en uygun dalgaboyu olarak belirlenen 288 nm’ de yapılmıştır. Etanol içerisinde çözülerek farklı seyreltme oranlarında hazırlanan tarçın yağı solüsyonları ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Tarçın yağı salımı çalışmalarında, % 0.5 tarçın yağı içeren 200 mg mikroküre 100 ml SGF içerisine eklenmiş ve bu süspansiyon çalkalamalı inkübatörde 37°C ve 150 rpm’de sürekli çalkalanmıştır. Farklı zamanlarda alınan örneklerdeki tarçın yağı miktarı UV-spektrofotometriyle belirlenmiştir.

**Tablo 3.** Klaritromisin analizinde kullanılan HPLC sistemi özellikleri

Özellik	Spesifikasyonlar
Kolon	Inertsil ODS-3 C18 Ters Faz Kolonu
Kolon uzunluğu	250 mm
Kolon çapı	4.6 mm
Parçacık boyutu	5 µm
Mobil faz	A: asetonitril ; B: fosfat tamponu (pH 4.4)
Akış hızı	1.1 ml min <sup>-1</sup>
Dalgaboyu	205 nm
Sıcaklık	40 °C
Dedektör	Diyot Array Dedektör
Elüsyon tipi	Dereceli elüsyon

### 3.6. Klaritromisin ve Tarçın Yağının Mikrokürelere Salınımının *H. pylori* Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

#### Besiyerinin Hazırlanması:

95 ml distile su içerisine 1.8 gr Brucella Broth (Beckton Dickinson, BD) eklendi, her biri 9.5 ml olacak şekilde 10 ml’lik burgulu kapaklı steril tüplerde 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Brucella Broth sıvı besiyeri 50°C’ye geldiğinde tek kullanımlık 0.20 µm’lik steril

filtreden (Sartorius Stedim) geçirilerek steril edilen 0.5 ml fetal bovine serum (FBS) (Biochrom AG) besiyerine ilave edildi. Kontaminasyon kontrolü için sıvı besiyerleri 37°C’de etüvde 24 saat bekletildi ve +4 °C’de saklandı.

#### *H. pylori* NCTC 11637 Kolonilerinden Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması:

%7 at kanlı Columbia Blood Agar besiyerinde üreyen *H. pylori* NCTC 11637 standart suşu kolonilerinden bakteri süspansiyonu 40 ml %5 FBS’li Brucella Broth (Beckton Dickinson and Company) içerisinde McFarland 2 ( $6 \times 10^8$  CFU/ml) bulanıklık eşeline göre hazırlandı (Densimat, Biomerieux).

#### *H. pylori* Kültür Protokolü:

*Helicobacter pylori* NCTC 11637 (*cagA*, *vacA*, *oipA*, *babA* (+)) standart suşu %7 at kanlı Columbia Blood agar (Oxoid) besiyerine inokule edilerek anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak mikroaerofilik ortamda 37°C’de 3 gün enkübe edildi. Üreyen *H. pylori* kolonilerinden üreaz, katalaz, oksidaz testleri yapıldı, ayrıca Gram boyama ve modifiye karbol fuksin boyama ile tipik morfolojisi incelendi.

Üreyen *H. pylori* standart suşu kolonilerinin %7 At Kanlı Columbia Blood Agar besiyerlerine subkültürleri yapıldı. Üreyen *H. pylori* kolonileri %5 FBS’li Brucella Buyyon içerisine ekildi ve anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda steril manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak 4 gün 37°C’de enkübe edildi. Dört gün sonra, %5 FBS’li Brucella Buyyon içerisinden 200 µl alınarak %7 At Kanlı Columbia Blood Agar besiyerine ekildi, anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda 37°C’de 3 gün enkübe edildi. Üreyen kolonilerden üreaz, katalaz, oksidaz testleri yapıldı, ayrıca Gram boyama ve modifiye karbol fuksin boyama ile tipik morfolojisi incelendi. Sıvı besiyerinde dört gün boyunca *H. pylori* suşunun canlılığını kaybetmediği %7 At Kanlı Columbia Blood Agar besiyerinde üreyen *H. pylori* kolonileri ile saptandı.

#### Kontrol Kitosan Mikrokürelerin *H. pylori* Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi



40 ml %5 FBS'li Brucella Broth içerisinde McFarland 2 ( $6 \times 10^8$  CFU/ml)'ye göre ayarlanan bakteri süspansiyonuna 30 dak. UV ile steril edilmiş 0.0022 gr kontrol kitosan mikroküreler eklendi. 37°C'de anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda steril manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak enkübe edildi. Enkübasyonun başlangıcında (0. saat), 8. saat, 24. saat, 32. saat ve 48. saatte bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  ve  $10^{-9}$  seri dilüsyonları hazırlandı; 9 adet steril ependorf tüpe 900'er µl %5 FBS'li Brucella Broth ilave edildi. Bakteri süspansiyonundan ilk tüpe 100 µl eklendi ve bu tüpten 100 µl bir sonraki tüpe aktarıldı. Son tüpe 100 µl ilave edilip sonra bu tüpten 100 µl dışarı atıldı. Her bir  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  ve  $10^{-9}$  seri dilüsyonlarından 100'er µl alınarak iki paralel olarak %7 At Kanlı Columbia Blood Agar besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de 3 gün anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda enkübe edildi. Bu işlem aynı zamanda  $t=8$ ,  $t=24$ ,  $t=32$  ve  $t=48$  saatte bakteri süspansiyonunun dilüsyonlarından ayrı ayrı ekimleri yapılarak; her biri ayrı ayrı etüvde enkübasyonunun başlatıldığı süreden itibaren 37°C'de 3 gün anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda enkübe edildi.

#### Klaritromisin'in Kitosan Mikrokürelerden Salınımının *H. pylori* Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

%5 koyun kanlı (Oxoid) Mueller Hinton Agar (Oxoid) besiyerinin kullanıldığı CLSI'nın önerdiği *H. pylori* agar dilüsyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyal duyarlılık testlerinde, üremenin olduğu en yüksek klaritromisin konsantrasyonu 0.062 µg/ml olarak saptandı ve klaritromisin minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) 0.125 µg/ml olarak belirlendi. Bu MİK değerine göre içerisindeki klaritromisin konsantrasyonu 1 µg/ml olacak şekilde 0,0022g küre tartıldı. 40 ml %5 FBS'li Brucella Broth içinde McFarland 2'ye ( $\sim 10^9$  CFU/ml) göre ayarlanan bakteri süspansiyonuna 30 dak. UV ile steril edilmiş 0.0022 gr klaritromisin yüklü kitosan mikroküreler eklendi. 37°C'de anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda steril manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak enkübe edildi. Enkübasyonun başlangıcında (0. saat), 8. saat, 24. saat, 32. saat ve 48. saatte bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak  $10^{-1}$ ,

$10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  ve  $10^{-9}$  seri dilüsyonları hazırlandı; 9 adet steril endorff tüpe 900'er µl %5 FBS'li Brucella Broth ilave edildi. Bakteri süspansiyonundan ilk tüpe 100 µl eklendi ve bu tüpten 100 µl bir sonraki tüpe aktarıldı. Son tüpe 100 µl ilave edilip sonra bu tüpten 100 µl dışarı atıldı. Bakteri süspansiyonunun  $10^{-4}$  dilüsyonundan başlayarak her bir  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  ve  $10^{-9}$  seri dilüsyonlarından 100'er µl alınarak duplicate olarak %7 At Kanlı Columbia Blood Agar besiyerine ekim yapıldı. 37°C'de 3 gün anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda enkübe edildi. Bu işlem aynı zamanda t=8, t=24, t=32 ve t=48 saatte bakteri süspansiyonunun dilüsyonlarından ayrı ayrı ekimleri yapılarak; her biri ayrı ayrı etüvde enkübasyonunun başlatıldığı süreden itibaren 37°C'de 3 gün anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda enkübe edildi.

#### Tarçın Yağının Kitosan Mikrokürelerden Salınımının *H. pylori* Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

%5 koyun kanlı (Oxoid) Mueller Hinton Agar (Oxoid) besiyerinin kullanıldığı klaritromisin için CLSI'nın önerdiği *H. pylori* agar dilüsyon yöntemiyle yapılan antimikrobiyal duyarlılık testi aynı zamanda tarçın yağına da uygulandı ve optimizasyonunu sağlanarak standardize edildi. Standardize edilen agar dilüsyon yöntemi ile tarçın yağının *H. pylori* üzerindeki etkisini saptamak amacı ile yapılan duyarlılık testinde, *H. pylori* kolonilerinin üremesinin olduğu en yüksek tarçın yağı konsantrasyonu 4 µg/ml olarak saptandı ve tarçın yağı minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) 8 µg/ml olarak belirlendi. Bu MİK değerine göre içerisindeki tarçın yağı konsantrasyonu 4.6 µg/ml olacak şekilde 0.0222 g küre tartıldı. 40 ml %5 FBS'li Brucella Broth içerisine McFarland 2'ye ( $\sim 10^9$  CFU/ml) göre ayarlanan bakteri süspansiyonu içerisine 30 dk UV ile steril edilmiş 0.0222 gr tarçın yağı (Sigma) yüklü kitosan mikroküreler eklendi. 37°C'de anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda steril manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak enkübe edildi. Enkübasyonun başlangıcında (0. Saat), 8. saat, 24. saat, 32. saat ve 48. saatte bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak içerisinde  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  ve  $10^{-9}$  seri dilüsyonları hazırlandı. 9 adet steril endorff tüpe 900'er µl %5 FBS'li Brucella Broth ilave edildi. Bakteri süspansiyonundan ilk tüpe 100 µl

eklendi ve bu tüpten 100 µl bir sonraki tüpe aktarıldı. Son tüpe 100 µl ilave edilip sonra bu tüpten 100 µl dışarı atıldı. Bakteri süspansiyonunun  $10^{-4}$  dilüsyonundan başlayarak her bir  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  ve  $10^{-9}$  seri dilüsyonlarından 100'er µl alınarak duplicate olarak %7 At Kanlı Columbia Blood Agar besiyerine ekim yapıldı.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 3 gün anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda enkübe edildi. Bu işlem aynı zamanda  $t=8$ ,  $t=24$ ,  $t=32$  ve  $t=48$  saatte bakteri süspansiyonunun dilüsyonlarından ayrı ayrı ekimleri yapılarak; her biri ayrı ayrı etüvde enkübasyonunun başlatıldığı süreden itibaren  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 3 gün anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda enkübe edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MİK Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Agar dilüsyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testlerinde, 1 - 0.037 µg/ml arasındaki farklı konsantrasyonlarda klaritromisin içeren plaklar incelendiğinde üremenin olduğu en yüksek klaritromisin konsantrasyonu 0.062 µg/ml olarak saptandı. Çözücü olarak metanol ya da seyreltik asetik asit kullanılması sonucu etkilemedi. 0.125 µg/ml klaritromisin içeren plakta üreme olup olmadığı katalaz, oksidaz, üreaz testleri ve Gram boyama ile değerlendirildi. Bu plakta üreme olmadığı belirlendi. Ayrıca çözücü olarak kullanılan metanol ve %0.125 lik asetik asitin inhibisyon etkisi göstermediği görüldü. Bu konsantrasyonun üzerindeki asetik asitin inhibisyon etkisi gösterdiği, altındaki oranlarda ise klaritromisinin çözünmediği belirlendi. E-test yöntemi ile klaritromisin için MİK değeri  $<0.016$  µg/ml olarak belirlendi.

Agar dilüsyon yöntemi ile limonotu yağı, tarçın yağı, karanfil yağı, limon yağı ve kekik yağının MİK değerleri sırasıyla 62, 8, 125, 500 ve 62 µg/ml olarak belirlendi.

Buna göre *H. pylori* üzerine en etkili yağ olan tarçın yağı ile tarçın yağı yüklü kitosan mikrokürelerin eldesi, karakterizasyonu ve tarçın yağının mikrokürelerden salınımı çalışmaları yapıldı.

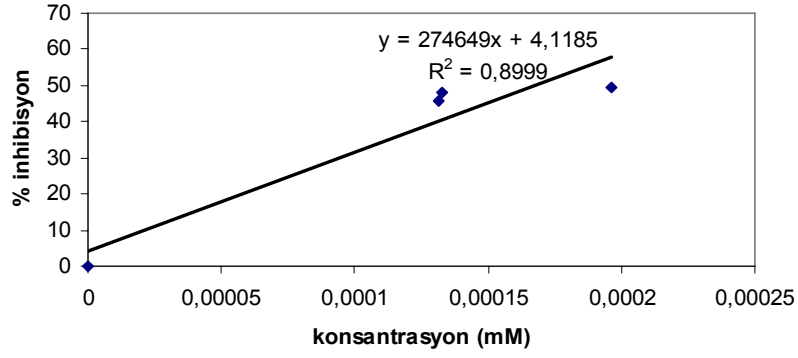
#### 4.2. Uçucu Yağların Bileşenleri ve Antioksidan Aktiviteleri

Çalışmada kullanılan uçucu yağların bileşenleri ve yüzdece kompozisyonu Tablo 4'te verilmiştir. Buna göre limonotu yağı, tarçın yağı, limon yağı, kekik yağı ve karanfil yağının ana bileşenleri sırasıyla sitral (% 58), sinnamaldehit (% 72), limonen (% 65), karvakrol (%69) ve öjenol (% 82) dür. Limonotu yağı, tarçın yağı, limon yağı, kekik yağı ve karanfil yağının konsantrasyona karşı çizilen yüzde inhibisyon grafiklerinin (Şekil 4.a,b) eğimlerinin troloksunkine (Şekil 4.c) oranlanmasıyla herbir yağın antioksidan kapasitesi hesaplanmış ve TEAC değerleri Tablo 5'te verilmiştir.

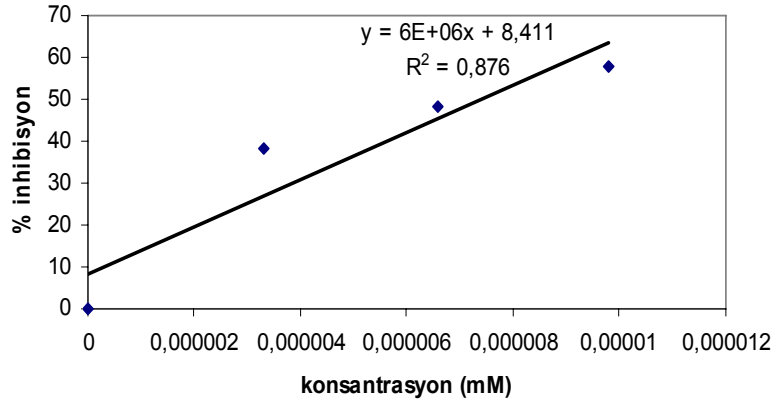
**Tablo 4.** Uçucu yağların bileşenleri ve yüzdece kompozisyonları

		Tarçın yağı	Karanfil yağı	Limon yağı	Limonotu yağı	Kekik yağı
1	(-) Borneol					1,91
2	(-)-Camphor					0,20
3	(-)-Spathullenol					0,12
4	(+)-a-Terpineol					0,48
5	1,8-Cineole (Eucalyptol)	0,18				
6	1-Metoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-benzene					0,57
7	4-Terpineol					1,47
8	4-Thujanol	0,10				0,45
9	a-bergamotene			0,36		
10	a-Caryophyllene	0,82	1,60		0,13	0,18
11	a-citral				<b>58,39</b>	
12	a-lemonene		0,09	<b>65,42</b>		
13	a-Phellandrene	0,86		0,52		0,15
14	a-Pinene	0,66		2,39		0,30
15	a-Terpinene			0,25		
16	a-Terpineol	0,40		0,13		
17	a-Thujene	0,17				
18	b-Bisabolene			0,47		1,34
19	b-Caryophyllene	4,16	14,73	0,21	0,88	1,35
20	b-citral			0,54	<b>37,75</b>	
21	Benzaldehyde	0,29				
22	Benzene propanal	0,23				
23	Benzyl benzoate	1,05				
24	b-Linalool	2,86				2,35

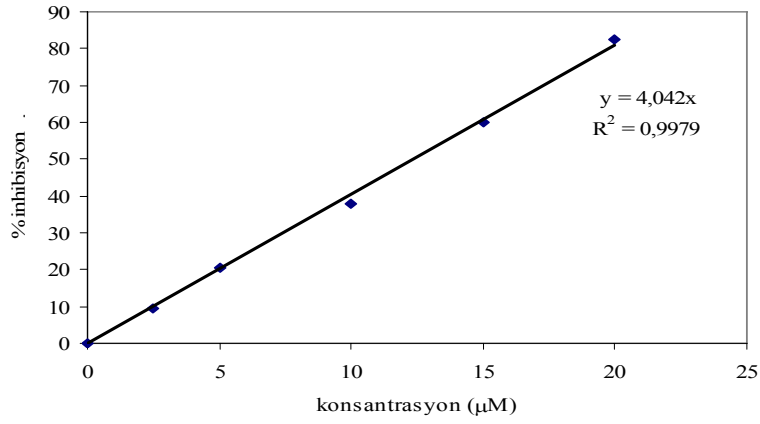
25	b-Myrcene			1,09		
26	b-Pinene	0,31		13,97		0,29
27	b-Thujene	2,36				0,05
28	Camphene	0,28		0,08		0,18
29	Carvacrol					<b>68,96</b>
30	Caryophyllene oxide	0,76	0,31			0,19
31	Champore	0,12				
32	Cinnamyl acetate	3,72				
33	Cinnamyl alcohol	0,12				
34	Cis-Cinnamaldehyde	0,32				
35	cis-verbenol				0,88	
36	citral			0,91		
37	Copaene	0,71	0,42			
38	Eucalyptol (cineol)					0,85
39	Eugenol	3,87	<b>82,41</b>			
40	Methylthymylether					0,15
41	Nerol				0,94	
42	nerol acetate			0,34	0,62	
43	o-Methoxy cinnamaldehyde	0,41				
44	p-a-Dimethylcityrene					0,42
45	p-Cymene	2,53		0,65		8,40
46	p-Terpinene					0,72
47	sabinene			1,57		
48	Safrene	0,16				
49	sigma-cadinene		0,29			0,18
50	Terpinene-4-ol	0,19				
51	Terpinolene	0,35		0,42		0,65
52	teta-terpinene			10,10		
53	Thymol					7,75
54	trans-Cinnamaldehyde	<b>71,69</b>				



(a)



(b)



(c)

**Şekil 4.** Tarçın yağı (a), karanfil yağı (b) ve troloks'un (c) yüzde inhibisyon grafikleri.

**Tablo 5.** Uçucu yağların troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasiteleri

<b>Uçucu yağ</b>	<b>Antioksidan kapasitesi_TEAC (mmol troloks/ml uçucu yağ)</b>
Limonotu yağı	0.61
Tarçın yağı	67.95
Limon yağı	0.24
Kekik yağı	54.14
Karanfil yağı	1484.41

Elde edilen sonuçlara göre karanfil yağı, tarçın yağı ve kekik yağının oldukça yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Karanfilin yüksek antioksidan aktivitesinin ana bileşen olan öjenolden ileri geldiği düşünülmektedir.

### **4.3. Mikrokürelerin Karakterizasyonu**

#### **4.3.1. Püskürtmeli Kurutma verimliliği, Etken Madde Yükleme Kapasitesi ve Verimliliği**

Püskürtmeli kurutma verimliliği (KV), etken madde yükleme kapasitesi (YK) ve etken madde yükleme verimliliği (YV) bölüm 3.3 deki denklemler kullanılarak hesaplanmış ve değerleri Tablo 6’da verilmiştir.

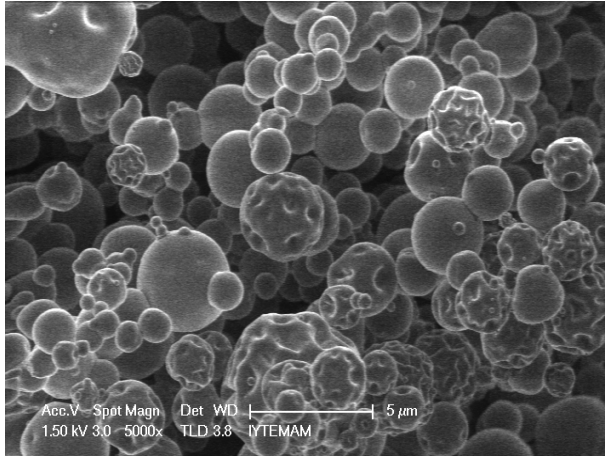
**Tablo 6.** Püskürtmeli kurutma verimliliği, etken madde yükleme kapasitesi ve verimliliği

	<b>Klaritromisin yükü mikroküre</b>	<b>Tarçın yağı yükü mikroküre</b>
<b>KV (%)</b>	54	32
<b>YK (%)</b>	3.5	0.18
<b>YV (%)</b>	18.9	0.069

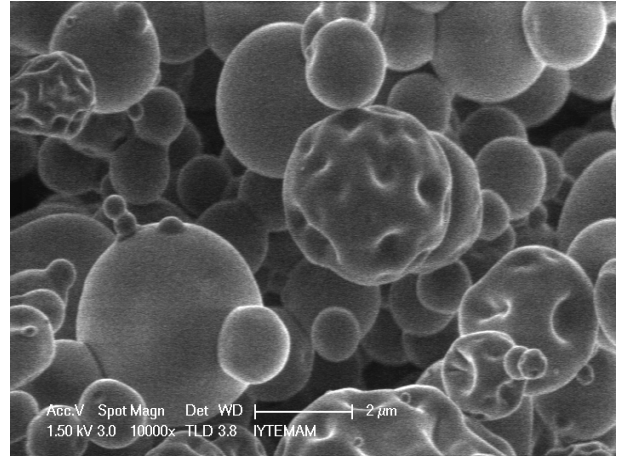
Püskürtmeli kurutma verimi klaritromisin yüklü mikrokürelerin eldesinde % 54 iken tarçın yağı yüklü mikrokürelerin eldesinde % 32'dir. Verimliliğin düşük olmasının sebebi yeterli kuruma olmadığından kurutma işlemi esnasında ürünün bir kısmının kolona, bir kısmının ise siklona yapışmasıdır. Kurutma şartları optimize edilerek daha yüksek bir kurutma verimi elde edilebilir. Etken madde yükleme verimi ise etken maddenin yapısına, etken madde/polimer oranına, karıştırma hızına, süresine vs. gibi faktörlere bağlıdır ve maksimum yükleme ve verimlilik için optimizasyon çalışmaları gereklidir.

#### 4.3.2. Parçacık Boyutu ve Yüzey Morfolojisi

Püskürtmeli kurutma yöntemiyle elde edilen kontrol, tarçın yağı ve klaritromisin yüklü kitosan mikrokürelerinin taramalı elektron mikroskopu görüntüleri Şekil 5'te verilmiştir. SEM görüntülerine göre mikrokürelerin küreselliği oldukça yüksektir. Mikrokürelerin yüzeyindeki buruşukluk hızlı kurumadan kaynaklanabilir. Parçacık boyutu 1-10 µm arasında değişmiştir. Aynı zamanda parça boyutu dağılımını çok dar bir aralıkta değiştiği gözlenmiştir.

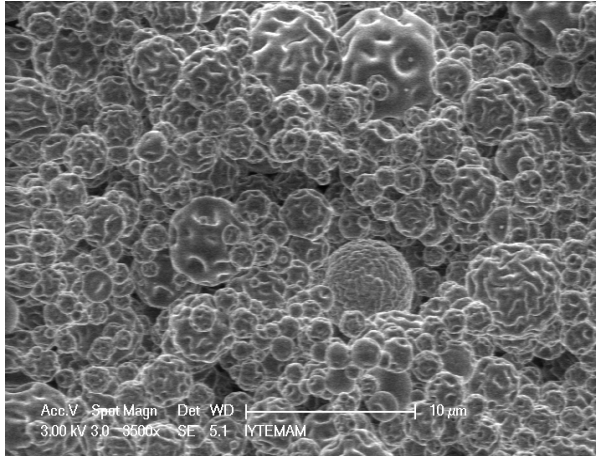


(a)

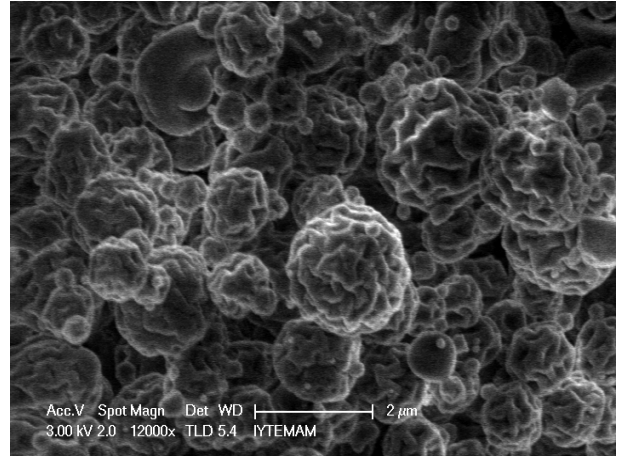


(b)

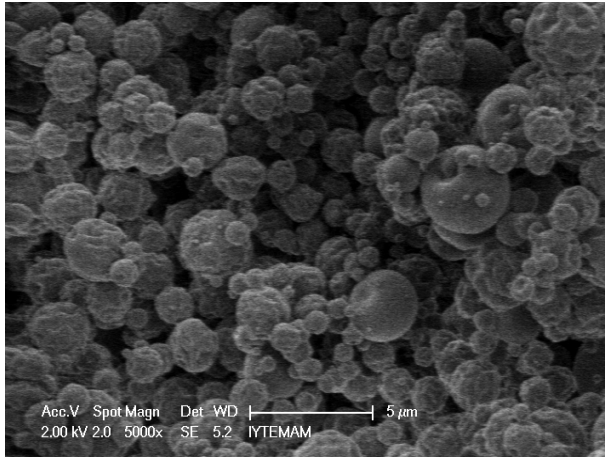




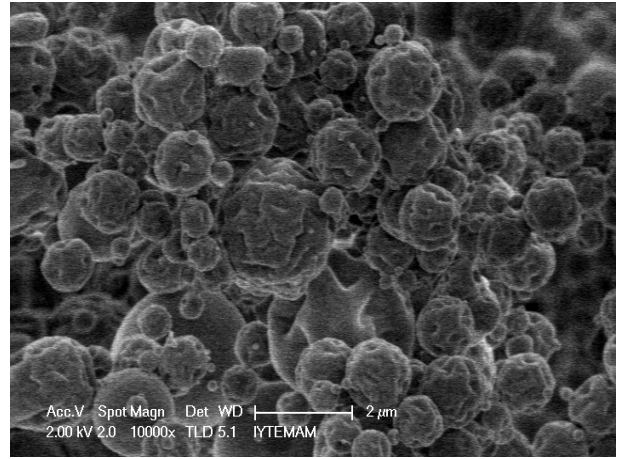
(c)



(d)



(e)



(f)

**Şekil 5.** Mikrokürelerin SEM görüntüleri: kontrol kitosan mikroküreler (a), (b); tarçın yağı yüklü kitosan mikroküreler (c), (d); klaritromisin yüklü kitosan mikroküreler (e), (f).

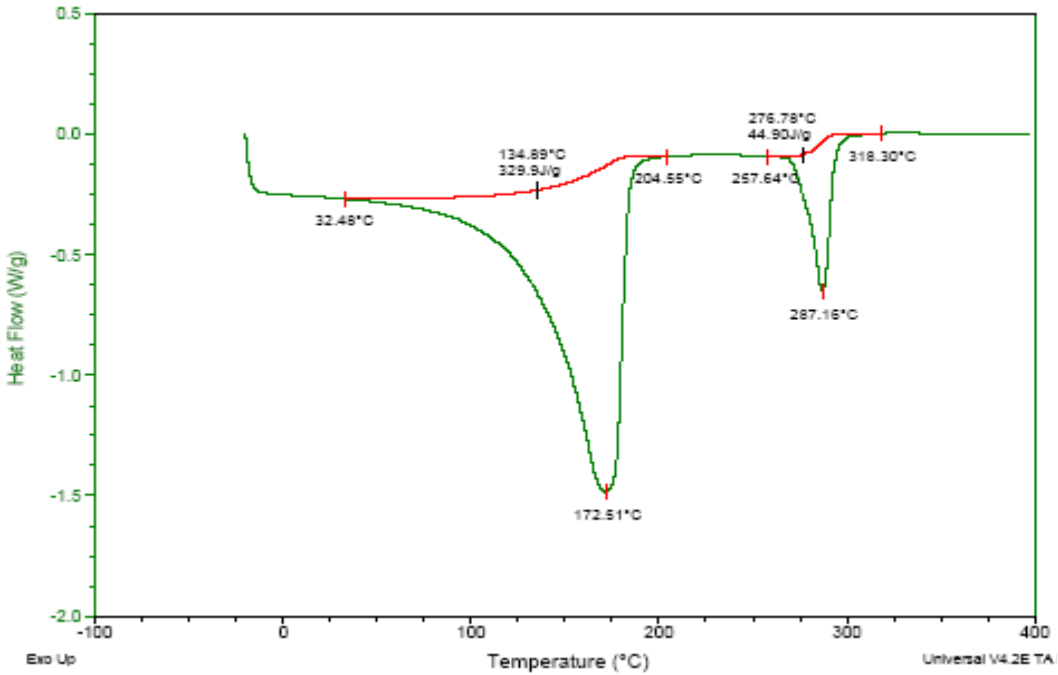
Tarçın yağı ve klaritromisin yüklü mikrokürelerde kontrol mikrokürelere göre yüzeydeki buruşukluk artmıştır. Ayrıca kitosana tarçın yağı ve klaritromisin yüklenmesi ile tane boyutunda küçülme elde edilmiştir.

#### 4.3.3. Termal Analiz

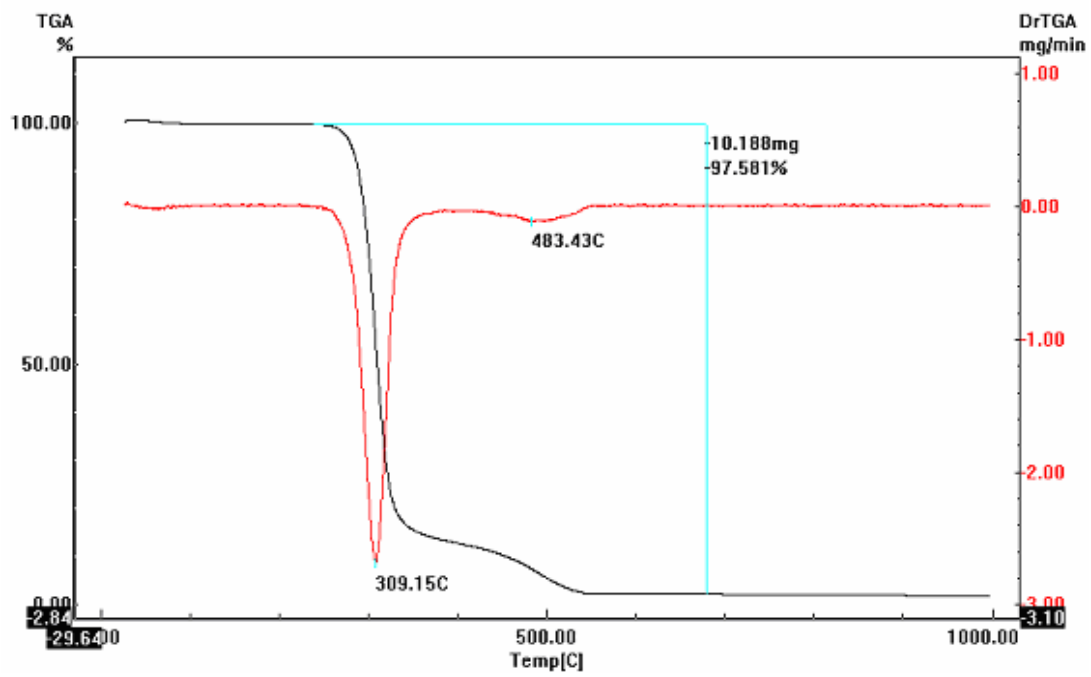
Üretilen kitosan kontrol mikrokürelerin TGA termogramları Şekil 6(c)'de verilmiştir. Termogravimetrik analiz sonucunda oluşan ağırlık kaybı 3 aşamada gerçekleşmiştir. İlk aşamada

40-90°C arasında serbest su ve asetik asitin buharlaşmasından kaynaklanan ağırlık kaybı görülmüştür. İkinci aşamada 110-175°C de görülen ağırlık kaybı bağlı sudan dolayıdır. Üçüncü aşama ise 250-350°C arasında ana bozunmadan meydana gelmiştir ve ağırlık kaybının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Bu bozunma polisakkarit zincirlerinin ve deasetilasyon birimlerinin bozunmasından kaynaklanabilir.

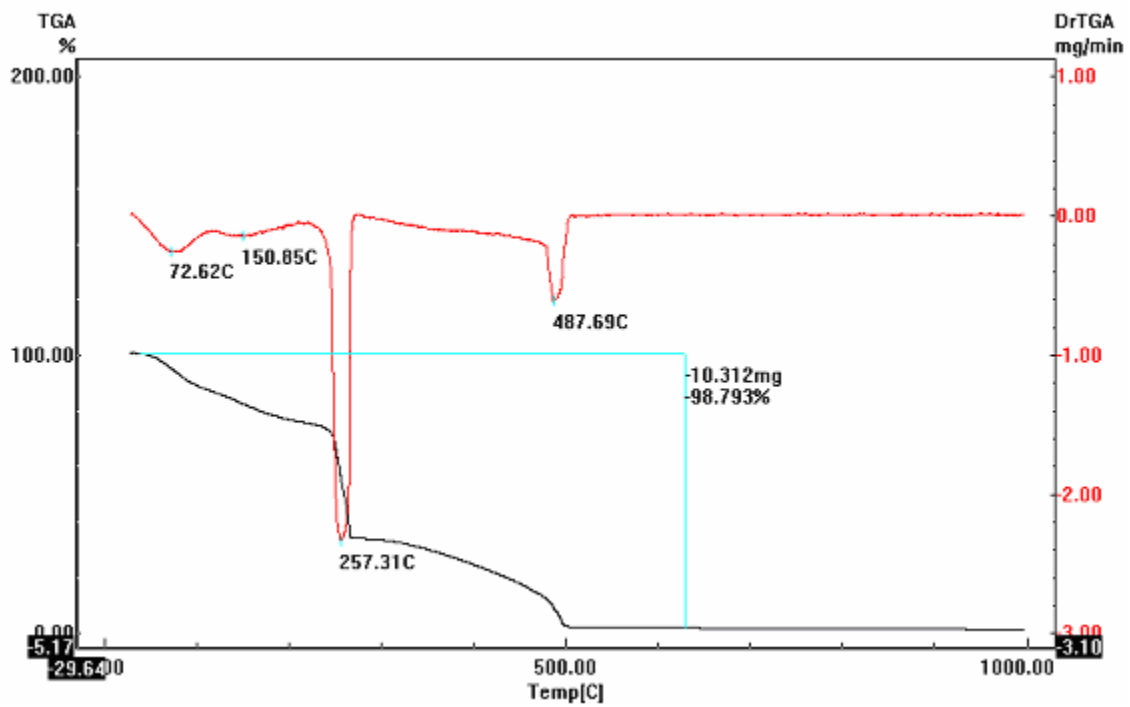
Tarçın yağının termal özellikleri DSC ile, klaritromisin, kontrol mikroküreler ile klaritromisin ya da tarçın yağı yüklü mikrokürelerin termal özellikleri ise TGA cihazı ile analiz edilmiştir. (Şekil 6). Kitosana klaritromisin ilavesi ile ağırlık kaybı yine 3 aşamada gerçekleşmiştir. Klaritromisin ve tarçın yağı yüklü mikrokürelerde serbest su ve asetik asitin buharlaşması kontrol mikrokürelere göre (72° C) daha düşük sıcaklıkta olup yaklaşık 65°C'dir. Bağlı suyun kaybı ise her durumda ortalama 150°C'de gerçekleşmiştir. Klaritromisin ve tarçın yağı yüklü mikrokürelerde ana bozunma sıcaklığında görülen artış bu mikrokürelerin termal dayanımının arttığını göstermektedir. Sonuç olarak, kitosana uçucu yağ veya antibiyotik ilavesi ile kitosanın termal özelliklerinde ciddi bir değişiklik elde edilmemiştir.



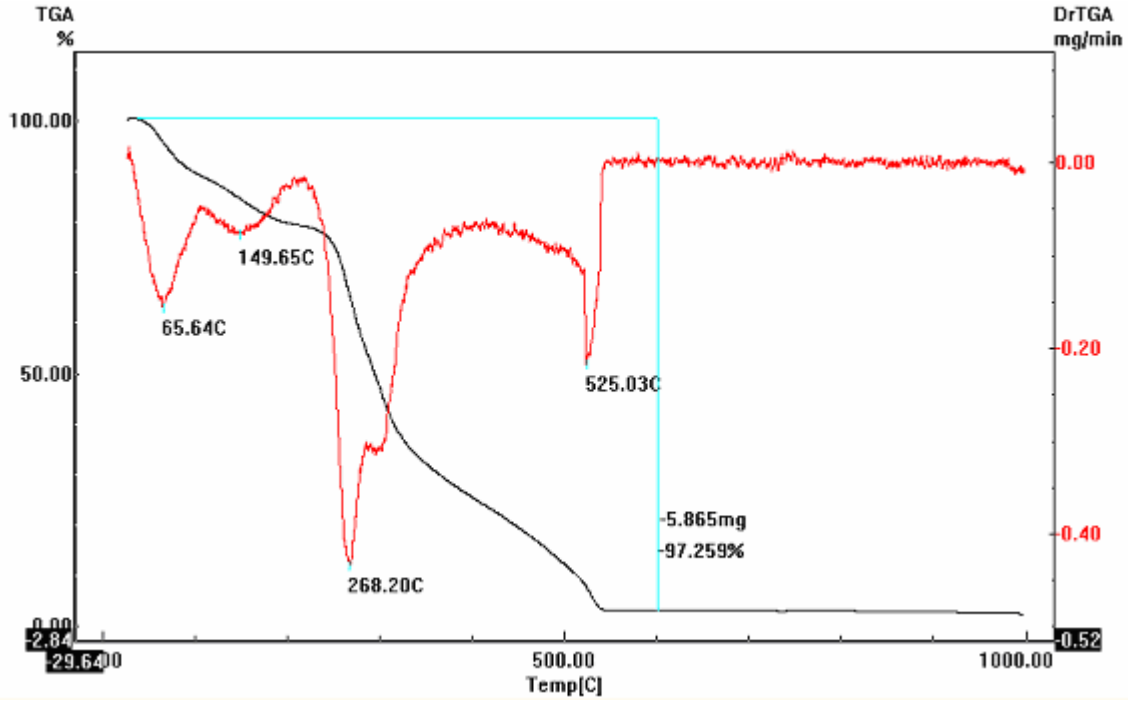
(a)



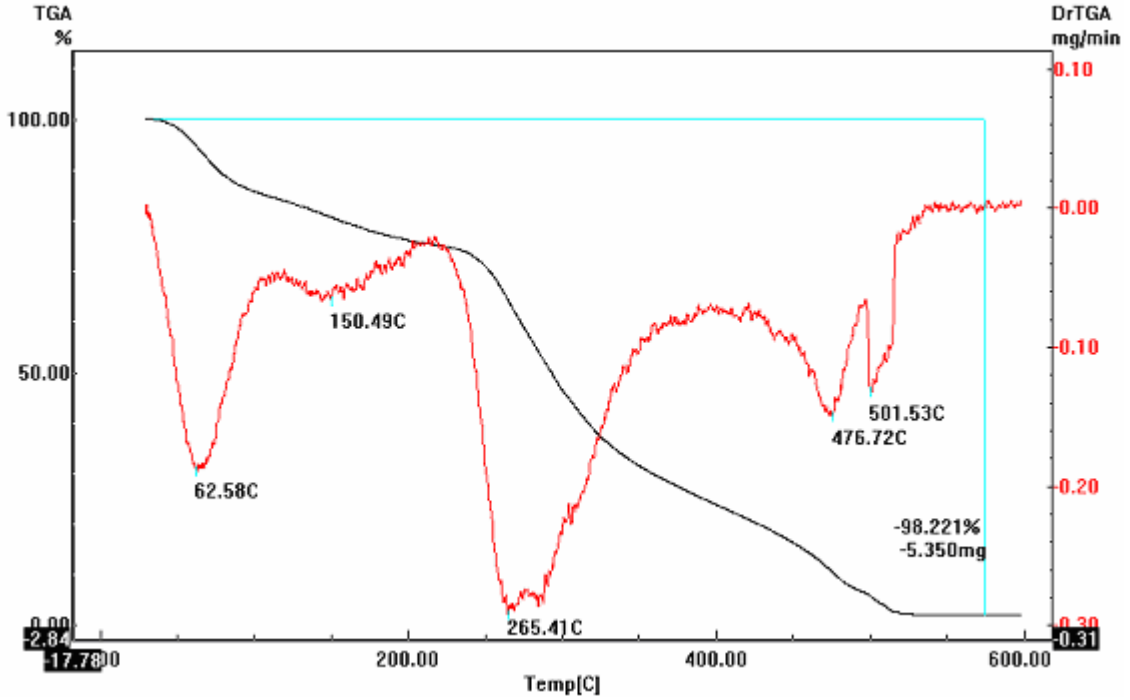
(b)



(c)



(d)

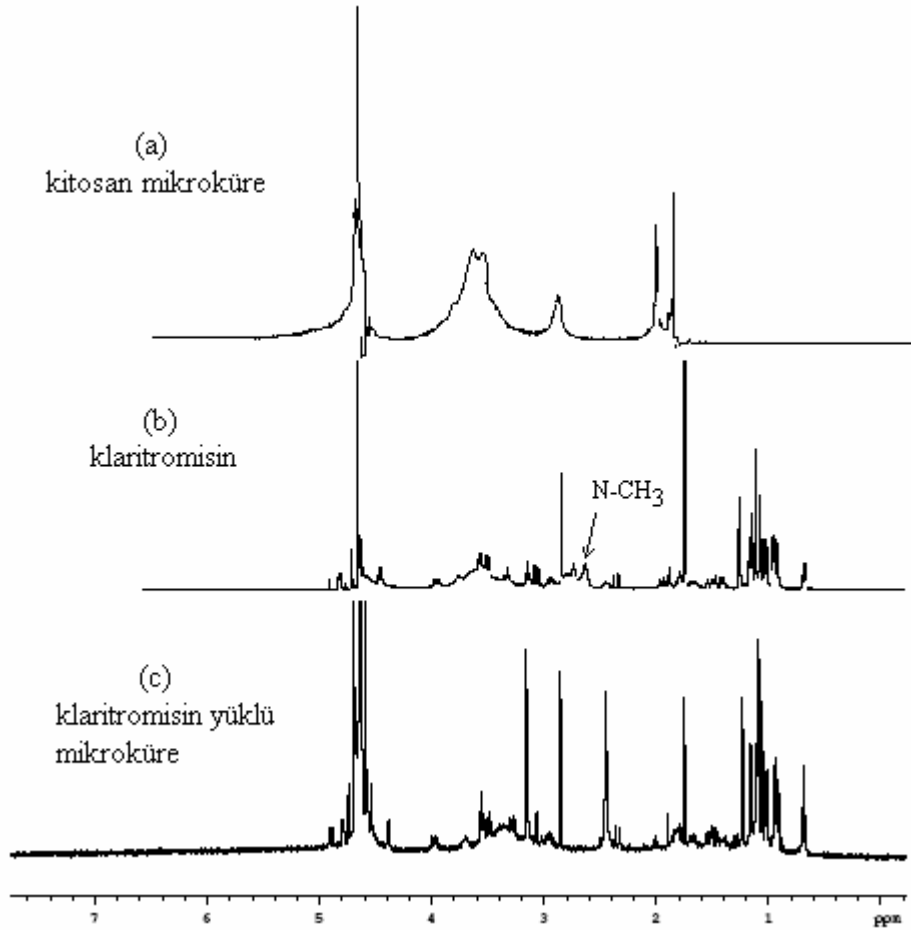


(e)

Şekil 6. Tarçın yağı DSC analizi (a); klaritromisin TGA ve DrTGA analizi (b); kontrol kitosan mikrokürelerin TGA ve DrTGA analizi (c); klaritromisin yüklü kitosan mikrokürelerin TGA ve DrTGA analizi (d); tarçın yağı yüklü kitosan mikrokürelerin TGA ve DrTGA analizi (e).

#### 4.3.4. Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi analizi (NMR)

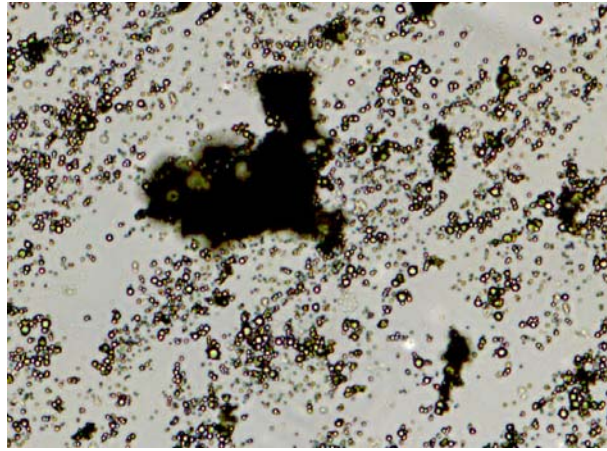
Kitosan, klaritromisin ve klaritromisin yüklü mikrokürelerin yapısı NMR spektroskopisiyle incelenmiş ve klaritromisinin kitosan mikrokürelerin içerisinde varlığı belirlenmiştir. Şekil 7’de kontrol kitosan mikrokürelerin, klaritromisin ve klaritromisin yüklü mikrokürelerin  $^1\text{H}$  NMR spektrası verilmiştir. 1.3-0.6 ppm aralığında klaritromisine ait karakteristik sinyaller klaritromisin yüklü mikrokürelere de görülmektedir. Ancak 2.7 ppm’ de klaritromisindeki (N-CH<sub>3</sub>)’e ait sinyalin klaritromisin mikrokürelere görülmemesi klaritromisinde bulunan C<sub>5</sub>’e  $\beta$ -glikozidik bağla bağlanan desozamin şekerinin mikroküre elde etme aşamasında koptuğunu göstermektedir. Klaritromisin, C<sub>3</sub>’e  $\alpha$ -glikozidik bağla bağlanan kladinoz şekeri ile *H. pylori*’nin 50S ribozomal alt ünitesinin peptidil transferaz bölgesinin klaritromisin bağlanma bölgelerine hidrojen bağı oluşturarak bağlandığından dolayı kitosan mikrokürelere yüklenen klaritromisinin antibakteriyel aktivitesini koruduğu söylenebilir.



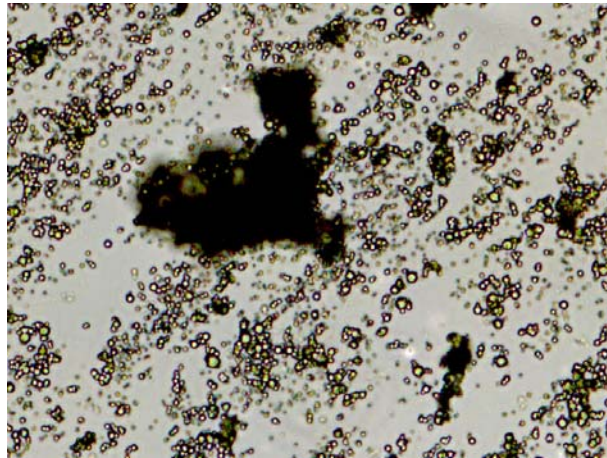
Şekil 7.  $^1\text{H}$ -NMR spektra:(a)kitosan mikroküre,(b)klaritromisin,(c)klaritromisin yüklü mikroküre

#### 4.3.5. Mikrokürelerin in Vitro Şişme ve Bozunma Davranışları

Kontrol kitosan mikrokürelerin simule mide sıvısı (SGF) içerisinde şişme ve bozunma testi faz-kontrast mikroskopuyla yapılmıştır. % 0.5 sodyum klorür ve 3 g/L pepsin içeren SGF'nin pH'sı hidroklorik asit ile 1.5'a ayarlanmıştır. Üzerine SGF damlatılan mikrokürelerin belirlenen zamanlarda faz kontrast mikroskopunda fotoğrafları çekilmiştir. Şişme oranı parçacık çapının zamana bağlı değişimiyle hesaplanmıştır. Kontrol mikrokürelerin fotoğrafları Şekil 8'de verilmiştir.

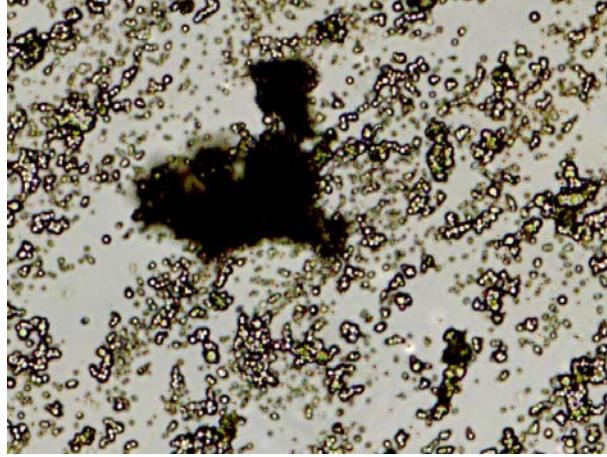


(a) t=0 dak

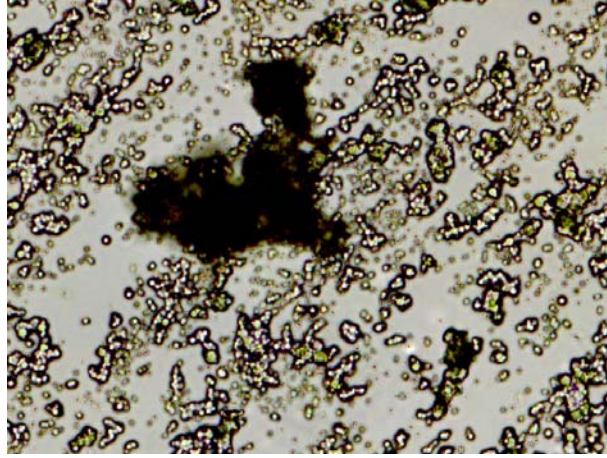


(b) t=2 dak





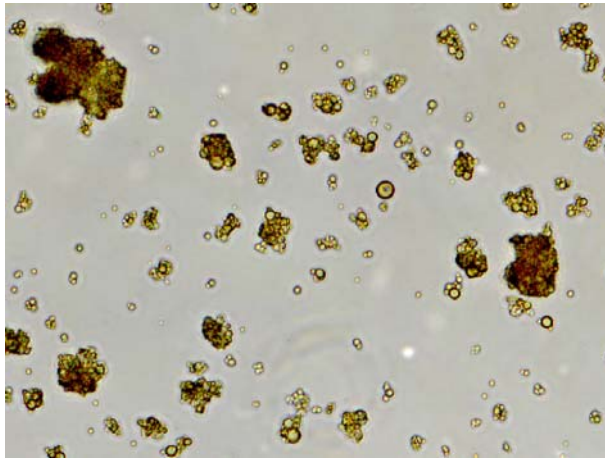
(c) t=5 dak



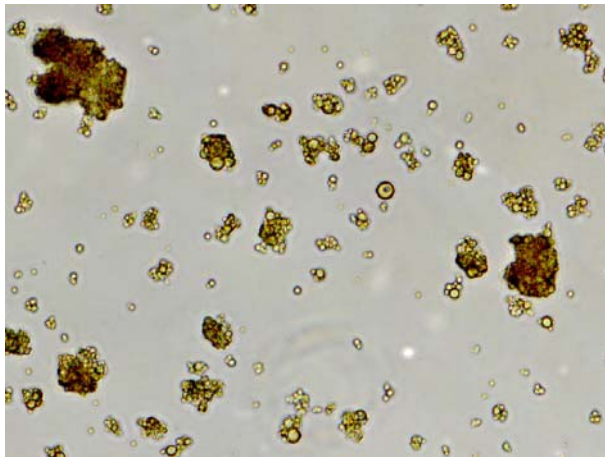
(d) t=10 dak

**Şekil 8.** Kontrol kitosan mikrokürelerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri

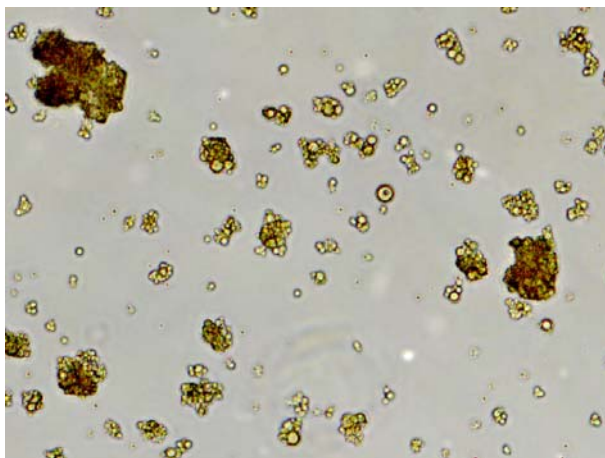
Buna göre ilk 10 dakika içerisinde mikroküreler şişmiş ve çapları ortalama % 100 artmıştır. Ancak küre yapısı 10. dakikadan sonra bozulmuştur. Bu nedenle mikrokürelere glutaraldehit ile çapraz bağlama işlemi uygulanmıştır. Bu yöntemde 0.05 g mikroküre 10 ml lik glutaraldehit solüsyonunda 30 dak. karıştırılarak çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Glutaraldehit solüsyonu 6 ml aseton, 3.5 ml deiyonize su ve 500 µl glutaraldehit içermektedir. Çapraz bağlı kitosan mikrokürelerin fotoğrafları Şekil 9'da verilmiştir. Çapraz bağlama işlemiyle mikrokürelerin SGF içerisinde dayanımı artmıştır.



(a)  $t=0$  dak

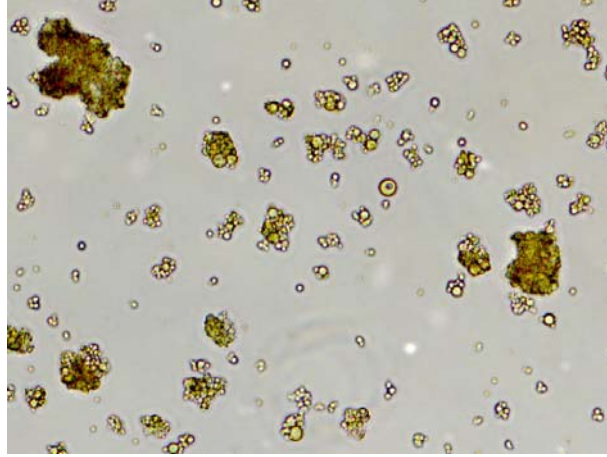


(b)  $t=30$  dak



(c)  $t=60$  dak



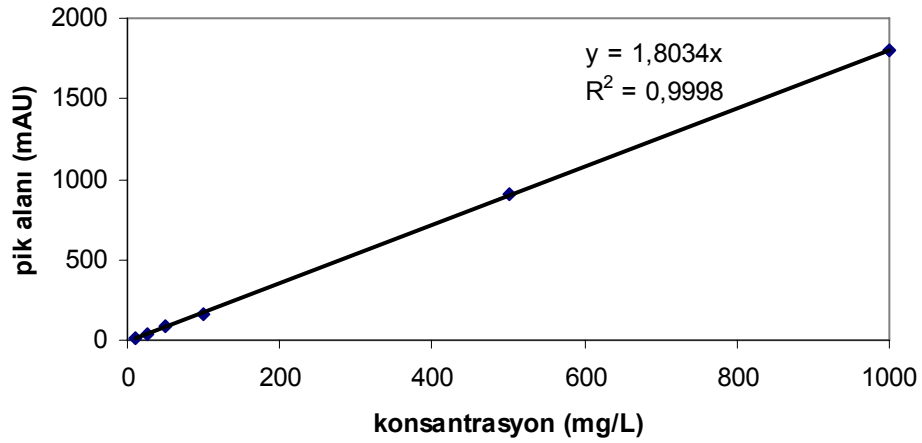


(d)  $t=120$  dak

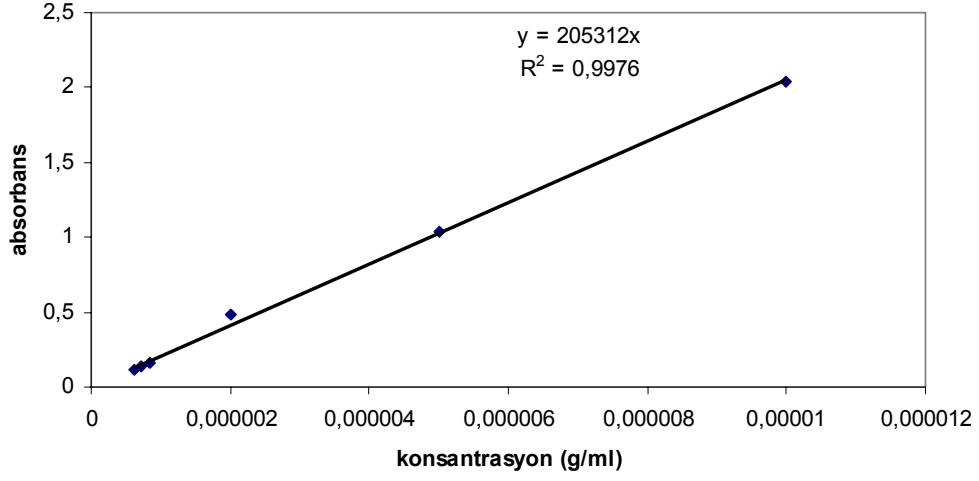
**Şekil 9.** Çapraz bağlı kitosan mikrokürelerin farklı zamanlardaki faz kontrast mikroskobu görüntüleri

#### 4.4. Klaritromisin ve Tarçın Yağının Mikrokürelerden Salımı

Klaritromisin ve Tarçın yağına ait kalibrasyon eğrileri sırasıyla Şekil 10 ve Şekil 11’de verilmiştir.

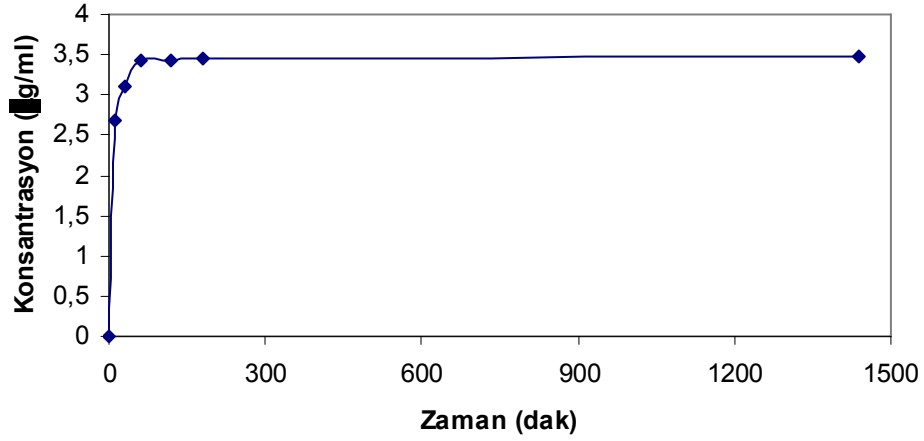


**Şekil 10.** Klaritromisine ait kalibrasyon eğrisi

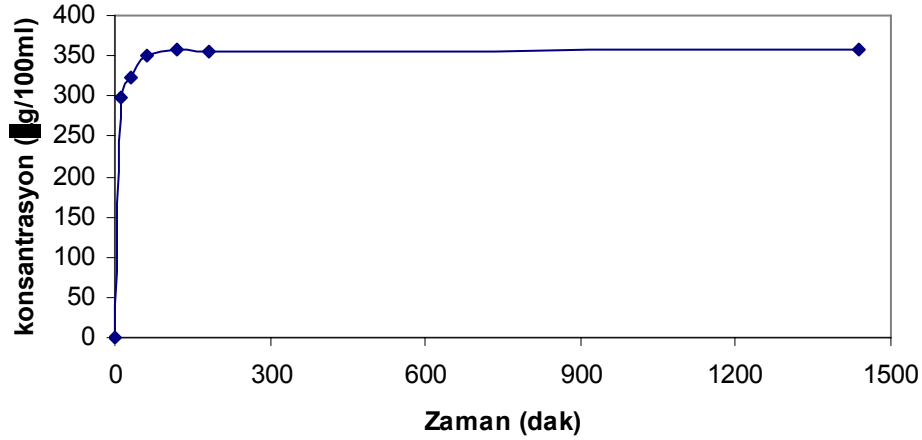


Şekil 11. Tarçın yağı kalibrasyon eğrisi

Bu kalibrasyon eğrilerine göre klaritromisin ve tarçın yağının kitosan mikrokürelerden SGF içerisine zamana bağlı salım profilleri sırasıyla Şekil 12 ve Şekil 13'te verilmiştir.



Şekil 12. Klaritromisinin kitosan mikrokürelerden salım profili



**Şekil 13.** Tarçın yağının kitosan mikrokürelerden salım profili.

Klaritromisin ya da tarçın yağı yüklü kitosan mikrokürelerden SGF'ye bu maddelerin yaklaşık % 80'i ilk 10 dakikada salınmıştır. 1 saatten sonra konsantrasyonlarda önemli bir değişiklik olmamıştır. Kitosan bazlı mikrokürelerin SGF içerisinde hızla şişerek bozunması ve çözünmesinden dolayı bu maddeler ortama çok kısa sürede salınmaktadır. Bu mikrokürelerin mide ortamında mukus tabakasına yapışarak uzun süre bozunmadan kalmasını ve daha yavaş bir salım profilini sağlamak *H. pylori* eradikasyonunda önemlidir. Etken madde taşıyıcı olarak kullanılacak mikrokürelerden etken maddenin uzun ve sabit dozlu salımını sağlamada mikroküre oluşturma yönteminin optimizasyonu, polimer/etken madde etkileşimi, çapraz bağlama ajanı kullanımı ve bu işlemin süresi etken madde yükleme kapasitesini ve salım kinetiğini belirleyen değişkenlerdir. Bu nedenle çapraz bağlama ajanı kullanılarak asidik ortamda daha dayanıklı mikroküreler ile etken madde salım çalışmalarının devam edilmesi gereklidir.

#### **4.5. Klaritromisin ve Tarçın Yağının Mikrokürelerden Salınımının *H. pylori* Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi**

*Helicobacter pylori* NCTC 11637 (*cagA*, *vacA*, *oipA*, *babA* (+)) standart suşu %7 at kanlı Columbia Blood agar besiyerine ekildi ve 37°C'de 3 gün anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda enkübe edildi. *H. pylori* standart suşu kolonilerinin üreaz, katalaz,

oksidaz testleri yapıldı, ayrıca Gram boyama ve modifiye karbol fuksin boyaması ile tipik morfolojisi incelendi.

Üreyen *H. pylori* standart suşu kolonileri %7 At Kanlı Columbia Blood Agar besiyerine subkültürleri yapıldı. Subkültürde üreyen koloniler %5 FBS'li Brucella Buyyon içerisine ekildi. 37°C'de anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda steril manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak 4 gün enkübe edildi. Dört gün sonra, %5 FBS'li Brucella Buyyon içerisinden 200 µl alınarak %7 At Kanlı Columbia Blood Agar besiyerine ekildi ve 37°C'de 3 gün anaerobik jar (Oxoid) içerisinde GasPak Campy Container System (Becton Dickinson and Company) kullanılarak oluşturulan mikroaerofilik ortamda enkübe edildi. Standart suşun üreyen kolonilerinin üreaz, katalaz, oksidaz testleri yapıldı, ayrıca Gram boyama ve modifiye karbol fuksin boyaması ile tipik morfolojisi incelendi. Sıvı besiyerinde dört gün boyunca *H. pylori* suşunun canlılığını kaybetmediği %7 At Kanlı Columbia Blood Agar besiyerinde üreyen *H. pylori* kolonileri ile saptandı.

Kontrol kitosan mikrokürelerin t=0, t=8, t=24, t=32 ve t=48. saatlerde ekim yapılan tüm kültür plaklarında her birinin enkübasyon süresi (3 gün mikroaerofilik ortamda) bittiğinde *H. pylori* üremesi saptandı. Sıvı besiyeri içerisinde 4 gün canlılığını sürdürebildiğini saptadığımız *H. pylori*'nin kontrol kitosan mikroküreler eklendiğinde ise 48 saat içerisinde canlılığını kaybetmediği; kontrol kitosan mikrokürelerin *H. pylori*'nin üremesini inhibe etmediği saptandı.

Klaritromisin yüklü kitosan mikrokürelerde, t=0 süresinde *H. pylori* üremesi saptanırken, t=8, t=24, t=32 ve t=48 süresinde herhangi bir üreme saptanmadı. Klaritromisin yüklü kitosan mikrokürelerden ortama salınan klaritromisin antimikrobiyal etki gösterdiği ve *H. pylori*'nin üremesini inhibe ettiği saptandı.

Tarçın yağı yüklü kitosan mikrokürelerde ise, t=0 süresinde *H. pylori* üremesi saptanırken, t=8, t=24, t=32 ve t=48 saatte herhangi bir üreme saptanmadı. Tarçın yağı yüklü kitosan mikrokürelerden ortama salınan tarçın yağının antimikrobiyal etki gösterdiği ve *H. pylori*'nin üremesini inhibe ettiği saptandı.

## 5. TARTIŞMA/SONUÇ

*H. pylori* NCTC 11637 standart suşuna karşı klaritromisinin MİK değeri agar dilüsyon yöntemi ile 0.125 µg/ml olarak saptandı ve klaritromisin duyarlı olduğu belirlendi. Vega ve ark. *H. pylori* NCTC 11638 standart suşuna karşı klaritromisinin MİK değerini benzer şekilde 0.125 µg/ml olarak belirtmişlerdir (Vega, 2009). Ustun ve ark'da NCTC 11637 standard suşu ile çalışarak klaritromisin için MİK değerinin 0.12 µg/ml olarak saptamışlardır (Ustun 2006). Ohno ve ark ise ATCC 43504 (NCTC 11637) ile CPY2052 suşlarının MİK değerinin <1 µg/ml olduğu ve duyarlı olduğunu saptamışlardır (Ohno, 2003).

*H. pylori* standart suşu üzerine en etkili uçucu yağın, 8 µg/ml MİK değerine sahip olan tarçın yağı olduğu saptandı. Bergonzelli ve ark. tarçın yağı, limonotu yağı ve kekik yağının *H. pylori* üzerine minimum bakterisidal konsantrasyonunu 40 µg/ml, karanfil yağıninkini ise 100 µg/ml olarak belirlemişlerdir. İklim, toprak yapısı ve bitkinin yaşı, bitkiden elde edilecek uçucu yağın kalitesini, miktarını ve kompozisyonunu etkilediğinden antibakteriyel özelliklerin kullanılan uçucu yağın orijinine ve elde edilme yöntemine göre farklılık gösterebileceğini, bu nedenle aktif bileşenlerin antibakteriyel etkilerinin belirlenmesinin daha iyi olacağını belirtmişlerdir (Bergonzelli, 2003). Çalışmamızda kullanılan uçucu yağların antioksidan aktiviteleri incelendiğinde en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan yağın karanfil yağı olduğu belirlendi. Buna göre yüksek antioksidan aktivite sağlayan fenolik bileşenler yerine tarçın yağında bulunan sinamaldehit bileşeninin *H. pylori* üzerine daha güçlü inhibisyon etkisi gösterdiği düşünülmektedir.

Mikrokürelerin yüzey morfolojileri, termal özellikleri, şişme ve bozunma özellikleri incelendiğinde çapraz bağlama işlemiyle mikrokürelerin SGF içerisinde dayanımı artmıştır. Ancak şişme özelliği azaldığından dolayı ilaç salınımında kullanılabilmesi için çapraz bağlama ajanı konsantrasyonu, polimer oranı, çapraz bağlama işlemi süresi gibi parametreler ilaç salınım kinetiğini etkilediğinden bu parametrelerin ilaç salım kinetiğine olan etkilerinin incelenmesi ve istenilen şartlar için optimizasyonunun yapılması gereklidir.

Kitosan mikrokürelere salınan tarçın yağı ve klaritromisinin *H. pylori* üzerindeki etkisi sıvı besiyerinde 48 saat boyunca incelendiğinde *H. pylori* üremesinin inhibe edildiği saptandı. Buna göre püskürtmeli kurutma esnasında tarçın yağı ve klaritromisinin aktivitesini kaybetmediği belirlendi. *H.pylori* enfeksiyonu eradikasyonunda kitosan mikrokürelere yüklenmiş tarçın yağının

tek başına ya da antibiyotik ile birlikte kullanımının, antibiyotik direncinin bulunduğu durumlarda alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

## 6. REFERANSLAR

ABASCAL K., Yarnell E., Herbs and Drug Resistance: Part 1—Herbs and Microbial Resistance to Antibiotics. *Alternative and Complementary Therapies*. 8(4), 237-241, (2002).

AKYON YILMAZ Y., *Helicobacter pylori sempozyumu kitapçığı*. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (2003), Pp: 1-6.

ALLEN LH., Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. *Cell Microbiol* 9(4), 817-828, (2007).

AZEVEDO NF., Almeida C., Cerqueira L., Dias S. et al., Coccoid form of *Helicobacter pylori* as a morphological manifestation of cell adaptation to the environment, *Appl Environ Microbiol* 73(10), 3423-3427, (2007).

AZEVEDO NF., Pacheco AP., Keevil CW., Vieira MJ., Nutrient shock and incubation atmosphere influence recovery of culturable *Helicobacter pylori* from water. *Appl Environ Microbiol* 70(1), 490-493, (2004).

BERGER J., Reist M., Mayer JM., Felt O., Peppas NA., Gurny R., Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 57, 19–34, (2004).

BERGONZELLI GE., Donnicola D., Porta DN., Corthesy-Theulaz IE., Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47, 3240-3246, (2003).

BROOKS GF., Butel JS., Morse SA., *Medical microbiology*, Twenty-second edition, USA, Appleton & Lange, (2001) Pp: 421-423.

BRUCE MG., Maarros HI., Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection, *Helicobacter* 13(1), 1-6, (2008).

BURT S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 94, 223-253, (2004).

BURY-MONE S., Mendz GL., Ball GE., Thibonnier M. et al., 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, *Infect Immun* 76(2), 497-509, (2008).

CAMBAU E., Allerheiligen V., Coulon C., Corbel C., Lascols C., Deforges L., Soussy CJ., Delchier JC., Megraud F., Evaluation of a new test, Genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 47(11), 3600-3607, (2009).

CELLINI L., Grande R., Campli ED., Bartolomeo SD. et al., Characterization of an *Helicobacter* environmental stain, *J Appl Microbiol*, 1-9, (2008).

Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları 16. Bilgi Eki. M100-S16 Cilt 26 Sayı 3 Pp 142. (2006).

CLYNE M., Dolan B., Reeves EP., Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett*, 268, 135-143, (2007).

DEBETS-OSENKOPP YJ., Sparrius M., Kusters JG., Kolkman JJ. et al., Mechanism of clarithromycin resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 142, 37-42, (1996).

DEMIRAY E., Yılmaz Ö., *Helicobacter pylori* infeksiyonunda üreaz enziminin rolü ve önemi, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 37(2), 112-117, (2007).



DEMIRAY E., Yılmaz Ö., Şarkış C., Soytürk M. et al., Comparison of invasive methods and two different stool antigen tests for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric bleeding. *World J Gastroenterol*, 12(26), 4206-4210, (2006).

DESAI KGH., Park HJ., Preparation and characterization of drug-loaded chitosan-tripolyphosphate microspheres by spray drying. *Drug Development Research* 64, 114-128, (2005).

DINOS GP., Connell SR., Nierhaus KH., Kalpaxis DL., Erythromycin, roxithromycin, and clarithromycin: use of slow-binding kinetics to compare their in vitro interaction with a bacterial ribosomal complex active in peptide bond formation. *Mol Pharmacol* 63,617-623, (2003).

DUNN BE., Cohen H., Blaser MJ., *Helicobacter pylori*, *Clin Microbiol Rev*, 10, 720-741, (1997).

FONTANA C., Favaro M., Minelli S., Criscuolo AA., Pietroiusti A., Galante A., Favalli C., New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 46(12), 3765-3769, (2002).

FORBES BA., Sahm DF., Weissfeld AS., *Helicobacter pylori*, Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology. Eleventh Edition, USA, (2002) Pp:479-481.

GARRIDO L., Toledo H., Novel genotypes in *Helicobacter pylori* involving domain V of the 23S rRNA gene. *Helicobacter* 12, 505-509, (2007).

GAYNOR M., Mankin AS., Macrolide antibiotics: Binding site, mechanism of action, resistance. *Frontiers in Medicinal Chemistry* 21-35, (2005).

GERRITS MM., van Vliet AHM., Kuipers E., Kusters JG., *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet Infect Dis* 6, 799-709, (2006).

GIBREEL A., Kos VN., Keelan M., Trieber CA., Levesque S., Michaud S., Taylor DE., Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 49(7), 2753-2759, (2005).

GOBIN AS., Froude VE., Mathur AB., Structural and mechanical characteristics of silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 74A, 465-473, (2005).

GONZALEZ AG., Igea, SA., Espinar, FJO. and Mendez, JB. Chitosan and chondroitin microspheres for oral-administration controlled release of metoclopramide, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 48, pp. 149-155, (1999).

GOUIN S, Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 15, 330–347, (2004).

GRAHAM SK., Graham DY., *Contemporary diagnosis and management of H. pylori-associated gastrointestinal diseases*. Second edition, USA, Handbooks in Health Care Co, (2002). Pp: 40-125.

GUANG WY., The Effect of Chitosan and Its Derivatives on the Dyeability of Silk, *Ph.D. Thesis*, Hong Kong Polytechnic University, (2002).

HEJAZI R., Amiji M., Stomach-specific anti-*H. pylori* therapy Part III: Effect of chitosan microspheres crosslinking on the gastric residence and local tetracycline concentrations in fasted gerbils, *International Journal of Pharmaceutics*, 272, 99–108, (2004).

HEJAZI R., Amiji M., Stomach-specific anti-*H. pylori* therapy. I: preparation and characterization of tetracycline-loaded chitosan microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 235, 87–94, (2002).

HOCKER M., Hohenberger M., *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture, *Lancet* 362, 1231-1233, (2003).

HSIEH WC., Chang CP., Gao YL., Controlled release properties of Chitosan encapsulated volatile Citronella Oil microcapsules by thermal treatments, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53, 209–214(2006).

[http://en.wikipedia.org/wiki/Helicobacter\\_pylori](http://en.wikipedia.org/wiki/Helicobacter_pylori)

<http://nobelprize.org/medicine/laureates/2005/press.html>

[http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguides/unit2/control/macresp\\_illus.html](http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguides/unit2/control/macresp_illus.html)

JAYAKUMAR R., Prabakaran M., Nair SV. , Tokura S., Tamura H., Selvamurugan N., Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Progress in Materials Science* 55, 675-709, (2010).

JUTTNER S., Vieth M., Miehle S., Schneider-Barchert W. et al., Reliable detection of macrolide-resistant *Helicobacter pylori* via fluorescence *in situ* hybridization in formalin-fixed tissue. *Mod Pathol* 17, 684-689, (2004).

KEMPF VAJ., Trebesius K., Autenrieth IB. Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* 38, 830-838, (2000).

KOHANTEB J., Bazargani A., Saberi-Firoozi M., Mobasser A., Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* to selected agents by agar dilution method in Shiraz-Iran. *Indian J Med Microbiol* 25(4), 374-377, (2007).

KOSARAJU SL., Dath L., Lawrence A., Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydr Polymer*. 64, 163-167, (2006).

KUSTERS JG., Gerrits MM., Strijp JAG., Vandenbroucke-Grauls MJE., Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphological manifestation of the cell death, *Infect Immun* 65(9), 3672-3679, (1997).

KUSTERS JG., van Vliet AHM., Kuipers EJ., Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol*, 19(3), 449-490, (2006).

LASCOLS C., Lamarque D., Costa J-M., Copie-Bergman C. et al., Fast and Accurate Quantitative Detection of *Helicobacter pylori* and Identification of Clarithromycin Resistance Mutations in *H. pylori* Isolates from Gastric Biopsy Specimens by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 41, 4573–4577, (2003).

LEHOURS P., Yilmaz O., Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection, *Helicobacter* 12(1), 1-3, (2007).

LU X., Ji C., Xu H., Li X., Ding H., Ye M., Zhu Z., Ding D., Jiang X., Ding X., Guo X, Resveratrol-loaded polymeric micelles protect cells from A<sub>2</sub>-induced oxidative stress. *International Journal of Pharmaceutics*, 375, 89-96, (2009).

MAJITHIYA RJ., Murthy RSR., Chitosan-based mucoadhesive microspheres of clarithromycin as a delivery system for antibiotic to stomach. *Curr Drug Deliv* 2, 235-242, (2005).

MALFERTHEINER P., Megraud F., O'Morain C., Bazzoli F., El-Omar E., Graham D., Hunt R., Rokkas T., Vakil N., Kuipers EJ., The European Helicobacter Study Group (EHSg)., Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 56, 772-781, (2007).

MCKENNA S., Evans GA., the Canadian Infectious Disease Society Antimicrobial Agents Committee., Macrolides: A canadian Infectious Disease Society position paper. *Can J Infect Dis* 12(4),218-231, (2001).

MEGRAUD F., *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 53, 1374-1384, (2004).

MEGRAUD F., Lehours P., *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing, *Clin Microbiol* 20(2), 280-322, (2007).

MEGRAUD F., Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics and its impact on treatment options. *Drug Resist Updat* 4, 178-186, (2001).

MEGRAUD F., Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Aliment Pharmacol Ther* 11, 43-53, (1997).

MOGG KJ., Kim JS., Kim N., Kim YJ. et al., Gene mutations of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated Korean patients, *J. Microbiol. Biotechnol*, 18(9), 1584-1589, (2008).

NILSSON H., Bloom J., Al-Spud W., Ljungh A. et al., Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*, 68(1), 11-19, (2002).

O'TOOLE PW., Lane MC.; Porwollik S., *Helicobacter pylori* motility. *Microbes and Infection*, 1207-1214, (2000).

OHNO T., Kita M., Yamaoka Y., Imamura S., Yamamoto T., Mitsufuji S., Kodama T., Kashima K., Imanishi J., Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 8, 207-215, (2003).

ONDER G, Aydin A, Akarca U, Tekin F, Ozutemiz O, Ilter T. High *Helicobacter pylori* Resistance Rate to Clarithromycin in Turkey. *J Clin Gastroenterol* 41, 747-750, (2007).

ÖZDEN A., Bozdayı G., Bağlan P., Azap A. et al., *Helicobacter pylori* 'nin klaritromisine karşı direncinin sıklığı. 21. Ulusal Gastroenteroloji Haftası 31 Ağustos-5 Eylül 2004, Antalya SB07/6. *The Turkish Journal of Gastroenterology* 15, 40, (2004).

OZEN A., Ertem D., Pehlivanoglu E., Natural History and Symptomatology of *Helicobacter pylori* in Childhood and Factors Determining the Epidemiology of Infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 42(4),398-404, (2006).

PANAYOTOPOULOU EG., Sgouras DN., Papdakos K. et al., Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori*. Clinical Isolates. *J Clin Microbiol* 45(2), 488-495, (2007).

PATEL JK., Patel MM., Stomach Specific Anti-*Helicobacter Pylori* Therapy: Preparation and Evaluation of Amoxicillin-Loaded Chitosan Mucoadhesive Microspheres, *Current Drug Delivery.*, 4, 41-50, (2007).

PATEL VR., Amiji MM., Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach, *Pharmaceutical Research*, 13, 588-593, (1996).

PFLOCK M., Kennard S., Finsterer N., Acid-responsive gene regulation in the human pathogen *Helicobacter pylori*, *J Biotechnol* 126, 52-60, (2006).

POLNOK A, Verhoef JC, Borchard G, Sarisuta N, Junginger HE, In vitro evaluation of intestinal absorption of desmopressin using drug-delivery systems based on superporous hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, **269**, 303–310, (2004).

PRANOTO Y., Rakshit SK., Salokhe VM., Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT*. 38, 859-865, (2005).

QIAO Z., Shi-he S., Lei-lei C., Run-hong M. et al., Type IV secretion system in *Helicobacter pylori*: a new insight into the pathogenicity, *Chin Med J*, 120(23), 2138-2142, (2007).

RADOSZ-KOMONIEWSKA H., Bek T., Jozwiak J., Martirosian G., Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection, *Clin Microbiol Infect*, 11, 602-610, (2005).

RODVOLD KA., Piscitelli SC., New oral macrolide and fluoroquinolone antibiotics: An overview of pharmacokinetics, interactions, and safety. *Clin Infect Dis* 17(Suppl 1), S192-9, (1993).

ROMERO C., Medina E., Vargas J., Brenes M., Decastro A., In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*", *J Agric Food Chem* 55, 680-686, (2007).

RUDI J., Kolb C., Maiwald M., Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production and associated disease, *J Clin Microbiol* 36(4), 944-948, (1998).

RUJIRAVANIT R., Kruaykitanon S., Jamieson AM., Tokura S., Preparation of Crosslinked Chitosan/Silk Fibroin Blend Films for Drug Delivery System. *Macromolecular Bioscience*, 3, 604-611, (2003),

RUSSMANN H., Adler K., Haas R., Gebert B. et al., Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol* 39, 4142-4144, (2001).

RUSSMANN H., Kempf VAJ., Koletzko S., Heesemann J. et al., Comparison of fluorescent *in situ* hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 39, 304-308, (2001).

RUSSMANN H., Schmidt AF., Adler K., Aust D. et al., Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded and in shock-frozen gastric biopsy samples by fluorescent *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol* 41: 813-815, (2003).

SADEGHI-KHOMAMI A., Lumsden MD., Jakeman DL., Glycosidase inhibition by macrolide antibiotics elucidated by STD-NMR spectroscopy. *Chemistry Biology* 15, 739-749, (2008).

SAFAK B., Ciftci IH., Ozdemir M., Kiyildi N., Cetinkaya Z., Aktepe OC., Altindis M., Asik G, *In vitro anti-Helicobacter pylori* activity of usnic acid. *Phytother Res* 23, 955-957, (2009).

SALYERS AA., Whitt DD., *Bacterial pathogenesis, A molecular approach*, Second edition. ASM Press, Washington DC (2002) Pp: 339-351.

SCHLUNZEN F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A., Franceschi F., Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413, 814-821, (2001).

SCHMIDT AF., Rüssmann H., Lehn N., Fischer A. et al., Fluorescence *in situ* hybridization vs. epsilometer test for detection of clarithromycin-susceptible and clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains in gastric biopsies from children. *Aliment Pharmacol Ther* 16, 2073-2079, (2002).

SEGAL ED., Falkow S., Tompkins LS., *Helicobacter pylori* attachment to gastric epithelial cell induces cytoskeletal rearrangement and tyrosine phosphorylation of host cell proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 1259-1264, (1996).

SHIKOV AN., Pozharitskaya ON., Makarov VG., Kvetnaya AS., Antibacterial activity of *Chamomilla recutita* oil extract against *Helicobacter pylori*", *Phytother Res.* 22, 252-253, (2008).

STINGL K., Schauer K., Ecobichon C., *In vitro* interactome of *Helicobacter pylori* urease revealed by tandem affinity purification. *MCP* (2008) (in press).



TAYLOR DE., Pathophysiology of antibiotic resistance: Clarithromycin. *Can J Gastroenterol* 14(10):891-894, (2000).

TOMAINO A., Cimino F., Zimbalatti V., Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem* 89, 549–554, (2005).

TOMB JF., White O., Kerlavage AR., Clayton RA. et al., The complete genome sequences of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*, *Nature* 388, 539-547, (1997).

TORACHIO S., Aceto GM., Mariani-Constantini RM., Battista P., Marzio L., Identification of a novel mutation affecting domain V of the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 9(5), 396-399, (2004).

TOROGLU S., Çenet M., Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. KSU. *Journal of Science And Engineering* 9(2), 12-20, (2006).

TORRADO S., Prada P., Torre PM., Torrado S., Chitosan-poly(acrylic) acid polyionic complex: in vivo study to demonstrate prolonged gastric retention, *Biomaterials*, 25, 917–923, (2004).

TORRE PM., Enobakhare Y., Torrado G., Torrado S., Release of amoxicillin from polyionic complexes of chitosan and poly(acrylic acid) study of polymer/polymer and polymer/drug interactions within the network structure, *Biomaterials*, 24,1499–1506, (2003).

TORRE PM., Torrado G., Torrado S., Poly (acrylic acid) Chitosan Interpolymer Complexes for Stomach Controlled Antibiotic Delivery, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: applied Biomaterials*, 72, 191-197, (2004).

TREBESIOUS K., Panthel K., Strobel S., Vogt K. et al., Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridization. *Gut* 46, 608-614, (2000).

US D., Hascelik G., Seroprevalance of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic Turkish population. *J Infect* 37,148-180, (1998).

USTUN O., Ozcelik B., Akyon Y., Abbasoglu U., Yesilada E., Flavonoids with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Cistus laurifolius* leaves, *J Ethnopharmacol* 108, 457-461, (2006).

VAN DOORN LJ., Glupczynski Y., Kusters JG., Megraud F. et al., Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother* 5, 1500–1504, (2001).

VEGA AE., Wendel GH., Maria AOM., Pelzer L., Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* and dehydroleucodine against *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol* 124, 653-655, (2009).

VELIN D., Michetti P., Immunology of *Helicobacter pylori* infection, *Digestion* 73, 116-123, (2006).

VERSOLOVIC J., Fox JG., *Helicobacter* In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH. Manual of Clinical Microbiology, 8th edition, USA, ASM pres, (2003) Pp: 915-928.

VERSOLOVIC J., Shortridge D., Kibler K., Grify MV. et al., Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 477-480, (1996).

VESTER B., Douthwaite S., Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob Agents Chemother* 45(1), 1-12, (2001).

WALLIS-CRESPO MC., Crespo A., *Helicobacter pylori* infection in pediatric population: epidemiology, pathophysiology and therapy, *Fetal Pediatr Pathol* 23,11-28, (2004).

WANG GE., Jiang Q., Taylor DE., Genotypic characterization of clarithromycin-resistant and – susceptible *Helicobacter pylori* strains from the same patient demonstrates existence of two unrelated isolates. *J Clin Microbiol* 36(9), 2730-2731, (1998).

WILSON DN., Nierhaus KH., The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and molecular Biology* 42, 187-219, (2007).

XUAN SH., Zhou YG., Shao B., Cui YL., Li J., Yin HB., Song XP., Cong H., Jing FX., Jin QH., Wang HM., Zhou J., Enzymic colorimetry-based DNA chip: a rapid and accurate assay for detecting mutations for clarithromycin resistance in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 58, 1443-1448, (2009).

YAO JDC., Moellering RC., Antibacterial Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology, 9th edition, USA, ASM pres, 2007. Pp. 1077-1114.

ZHENG J., Liu C., Bao D., Zhao Y., Ma X., Preparation and evaluation of floating-bioadhesive microparticles containing clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori*. *J Appl Polym Sci Symp* 102,2226-2232, (2006).

## PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

<b>Proje No:</b> 109M028
<b>Proje Başlığı:</b> <i>Helicobacter pylori</i> 'nin Eradikasyonunda Etkili Uçucu Yağların Ve Klaritromisinin Kitosan Bazlı Mikrokürelerden Kontrollü Salımı
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Prof.Dr. Funda Tıhminlioğlu Prof. Dr. Özlem Yılmaz Araş. Gör.Duygu Altıok Araş. Gör. Ebru Demiray Gürbüz Neslihan Bekmen
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Urla, İzmir
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> TÜBİTAK, Ankara
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01/08/2009 - 01/08/2010
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Uçucu yağlar hidrofobik, kuvvetli kokulu ve hidrofobik sıvılardır. İçerdikleri aktif bileşenlerden dolayı antimikrobiyal ve antioksidatif etki gösterirler. Bu çalışmada, <i>H. pylori</i> 'nin eradikasyonunda kullanılabilecek limon otu yağı, kekik yağı, karanfil yağı, limon yağı ve tarçın yağı gibi uçucu yağların ve klaritromisinin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi, uçucu yağ ve antibiyotik yüklü kitosan bazlı mikrokürelerin hazırlanması; hazırlanan mikrokürelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi; <i>in vitro</i> sistemlerde ilaç ve uçucu yağların kontrollü salım kinetiklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> <i>Helicobacter pylori</i> , uçucu yağlar, Klaritromisin, kitosan mikroküreler, Püskürtmeli kurutma
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> 1) Altıok D, Bekmen N, Demiray Gürbüz E, Tıhminlioğlu F, Yılmaz Ö. Antimicrobial activity of essential oils against <i>H. pylori</i> , European Helicobacter Study Group (EHSG) XXIII. International Workshop on Helicobacter and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. September 16-18, 2010, Rotterdam, Holland, P1.11. <i>Helicobacter</i> 2010; 15(4): 335.

