



T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

REPUBLIC OF TURKEY  
THE MINISTRY OF HEALTH  
GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

ISSN 0377-9777 (Basılı / Printed)  
ISSN 1308-2523 (Çevrimiçi / Online)

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 77 ■ Sayı/Number 4 ■ Yıl/Year 2020

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND  
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg



# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

## TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü adına

On behalf of General Directorate of Public Health

**Fatih KARA, Genel Müdür (General Director)**

### EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

**Hasan IRMAK**

### EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

Demet CANSARAN-DUMAN

Hülya ŞİMŞEK

Pınar KAYNAR

### YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Hanefi ÖZBEK

Fatih BAKIR

Selin NAR-ÖTGÜN

Cemile SÖNMEZ

Dilek YAĞCI-ÇAĞLAYIK

Fehminaz TEMEL

Can Hüseyin HEKİMOĞLU

Şule ŞENSES-ERGÜL

Arsun ESMER

Gülsen TOPAKTAŞ

### TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Utku ERCÖMERT

Zeynep KÖSEOĞLU

Selahattin TAŞOĞLU

Gülay GÜLTAY

**HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ**

**GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH**

**ANKARA-TÜRKİYE**

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

**Tasarım - Dizgi / Design - Editing :**

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü / General Directorate of Public Health  
THDBD Teknik Kurulu / TBHEB Technical Board  
Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No:55 Sıhhiye /  
ANKARA Tel: +90 312 565 55 80

**Baskı ve Cilt / Press and Binding :**

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü / General Directorate of Public Health  
İdari ve Mali İşler Dairesi Başkanlığı - Matbaa / Administrative  
and Financial Affairs Department - Printing House  
Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No:55 Sıhhiye/ANKARA  
Tel: +90 312 565 55 88

**Yayın Türü / Type of Publication :**

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

**Basım Tarihi / Date of Publication :**

Aralık - 2020 / December - 2020

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

## ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, İsveç

Anna PAPA, Yunanistan

Aziz SANCAR, ABD

Cristina DOMINGO, Almanya

Daniel MOTLHANKA, Botsvana

Dwight D. BOWMAN, ABD

Isme HUMOLLI, Kosova

Isuf DEDUSHAJ, Kosova

Iva CHRISTOVA, Bulgaristan

Johan LINDH, İsveç

Kosta Y. MUMCUOĞLU, İsrail

Manfred WEIDMANN, İngiltere

Paul HEYMAN, Belçika

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Küba

Sıraç DİLBER, İsveç

Susana RODRIGUEZ-COUTO, İspanya

Takashi AKAMATSU, Japonya

Varalakshmi ELANGO, Hindistan

## ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Abdülkadir HALKMAN, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Ahmet KART, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADILOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül GÖZALAN, Ankara

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Çorum

Banu ÇAKIR, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Ankara

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Cemile SÖNMEZ, Ankara

Çağatay GÜLER, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Ebubekir CEYLAN, Ankara

Emrah RUH, Kıbrıs

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fehminaz TEMEL, Ankara

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

Gülberk UÇAR, Ankara

Gülnur TARHAN, Adıyaman

Hakan ABACIOĞLU, İzmir

# TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

## ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

Hanefi ÖZBEK, İstanbul

Hasan IRMAK, Ankara

Hasan TEZER, Ankara

Hayrettin AKDENİZ, Bolu

Hilal ÖZDAĞ, Ankara

Hülya ŞİMŞEK, Ankara

Hürrem BODUR, Ankara

Işıl MARAL, İstanbul

İ. Mehmet Ali ÖKTEM, İzmir

İpek MUMCUOĞLU, Ankara

İrfan EROL, Ankara

İrfan ŞENCAN, Ankara

İsmail CEYHAN, Ankara

Kemal Osman MEMİKOĞLU, Ankara

Koray ERGÜNAY, Ankara

Levent AKIN, Ankara

Mahinur AKKAYA, Ankara

Mehmet Ali ONUR, Ankara

Mehmet Kürşat DERİCİ, Çorum

Mestan EMEK, Antalya

Metin KORKMAZ, İzmir

Mithat ŞAHİN, Kars

Muhsin AKBABA, Adana

Murat DİZBAY, Ankara

Mustafa AKSOY, Ankara

Mustafa ERTEK, Ankara

Mustafa Necmi İLHAN, Ankara

Mustafa Kasım KARAHOCAGİL, Kırşehir

Mustafa Kemal BAŞARALI, Ankara

Mustafa KAVUTÇU, Ankara

Mükerrem KAYA, Erzurum

Nazan YARDIM, Ankara

Nazime MERCAN, Denizli

Nazmi ÖZER, Ankara

Nilay ÇÖPLÜ, Ankara

Nur AKSAKAL, Ankara

Nur Münevver PINAR, Ankara

Nuran ESEN, İzmir

Oğuz GÜRİSOY, Denizli

Orhan BAYLAN, İstanbul

Orhan YILMAZ, Ankara

Özlem KURT AZAP, Ankara

Pınar KAYNAR, Ankara

Pınar OKYAY, Aydın

Rahmet GÜNER, Ankara

Recep AKDUR, Ankara

Recep KEŞLİ, Afyonkarahisar

Recep ÖZTÜRK, İstanbul

Rıza DURMAZ, Ankara

S. Aykut AYTAÇ, Ankara

Saime ŞAHİNÖZ, Gümüşhane

Sami AYDOĞAN, Kayseri

Sarp ÜNER, Ankara

Seçil ÖZKAN, Ankara

Seda KARASU YALÇIN, Bolu

Seda TEZCAN, Mersin

Selçuk KAYA, Trabzon

Selçuk KILIÇ, Ankara

Selim KILIÇ, Ankara

Selin NAR ÖTGÜN, Ankara

Sema BURGAZ, Ankara

Semra Ayşe GÜREŞER, Çorum

Sercan ULUSOY, İzmir

Sultan ESER, İzmir

Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa

Sümer ARAS, Ankara

Şule SENSES ERGÜL, Ankara

Tevfik PINAR, Kırıkkale

Turan BUZGAN, Ankara

Yeşim ÖZBAŞ, Ankara

Yunus Emre BEYHAN, Van

Zafer ECEVİT, Ankara

Zafer KARAER, Ankara

Zati VATANSEVER, Kars

Zeynep GÜLAY, İzmir

# TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

Dergide yayımlanmak üzere gönderilen yazılar, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi yazım kurallarına göre hazırlanmalıdır. Başvurular [www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org) adresinden "Çevrimiçi Makale Gönder, Takip Et, Değerlendir Programı" aracılığıyla on line olarak yapılabilir.

Gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallara uyum aranır. Kurallara uymayan yazılar daha ileri bir inceleme gerektirmeksizin yazarlarına iade edilir.

1. "Telif Hakkı Devir Formu" tüm yazarlarca imzalanarak onaylandıktan sonra dergimizin makale kabul sistemine yüklenmelidir.

2. Makale başlığı, İngilizce başlık, kısa başlık, yazar adları, çalışılan kurumlara ait birimler, yazışma işini üstlenen yazarın açık adresi, telefon numaraları (sabit ve cep), elektronik posta adresi belirtilmelidir:

a. Yazının başlığı kısa olmalı ve küçük harfle yazılmalıdır.

b. Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.

c. Çalışma bilimsel bir kuruluş ve/veya fon ile desteklenmişse dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka belirtilmelidir.

d. Makale, kongre/sempozyumda sunulmuşsa sunum türü ile birlikte dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka belirtilmelidir.

3. Yazılardaki terimler mümkün olduğunca Türkçe ve Latince olmalı, dilimize yerleşmiş kelimelere yer verilmeli ve Türk Dil Kurumu'nun güncel sözlüğü kullanılmalıdır. Öz Türkçe'ye özen gösterilmeli ve Türkçe kaynak kullanımına önem verilmelidir.

4. Metin içinde geçen mikroorganizma isimleri ilk kullanıldığında tam ve açık yazılmalı, daha sonraki kullanımlarda kısaltılarak verilmelidir. Mikroorganizmaların orijinal Latince isimleri italik yazılmalıdır: Örneğin; *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa* gibi. Yazıda sadece cins adı geçen cümlelerde stafilokok, streptokok gibi dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir. Antibiyotik isimleri dil bütünlüğü açısından okunduğu gibi yazılmalı; uluslararası standartlara uygun olarak kısaltılmalıdır.

5. Metin içerisinde bahsedilen birimlerin sembolleri Uluslararası Birimler Sistemi (SI)'ne göre verilmelidir.

6. Yazılar bir zorunluluk olmadıkça "geçmiş zaman edilgen" kip ile yazılmalıdır.

7. Metnin tamamı 12 punto Times New Roman karakteri ile çift aralıklı yazılmalı ve sayfa kenarlarından 2,5 cm boşluk bırakılmalıdır.

8. Yazarlar araştırma ve yayın etiğine uymalıdır. Klinik araştırmalarda, çalışmaya katılanlardan bilgilendirilmesi olur alındığının gereç ve yöntem bölümünde belirtilmesi gerekmektedir. Gönüllü ya da hastalara uygulanacak prosedürlerin özelliği tümüyle anlatıldıktan sonra, kendilerinin bilgilendirilip onaylarının alındığını gösterir bir cümle bulunmalıdır. Yazarlar Helsinki Bildirgesi'nde ana hatları çizilen ilkeleri izlemelidir. Yazarlar, bu tür bir çalışma söz konusu olduğunda, uluslararası alanda kabul edilen kılavuzlara ve yürürlükte olan tüm mevzuatta belirtilen hükümlere uymalı ve "Etik Kurul Onayı"ni göndermelidir.

9. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar için de gereken izinler alınmalı; yazıda deneklere ağrı, acı ve rahatsızlık verilmemesi için neler yapıldığı açık bir şekilde belirtilmelidir.

10. Hasta kimliğini tanıttıkça fotoğraf kullanıldığında, hastanın yazılı onayı gönderilmelidir.

## 11. Araştırma yazıları;

Türkçe Özet, İngilizce Özet, Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma, Teşekkür (varsa) ve Kaynaklar bölümlerinden oluşmalıdır. Bu bölüm başlıkları sola yaslanacak şekilde büyük harflerle kalın yazılmalıdır. İngilizce makalelerde de Türkçe başlık, kısa başlık ve özet bulunmalıdır.

a) **Türkçe Özet:** Amaç, Yöntem, Bulgular ve Sonuç, alt başlıklarından oluşmalıdır (yapılandırılmış özet) ve en az 250, en fazla 400 kelime içermelidir.

b) **İngilizce Özet (Abstract):** Türkçe Özet bölümünde belirtilenleri birebir karşılayacak şekilde "Objective, Method, Results, Conclusion" olarak yapılandırılmalıdır.

c) **Anahtar Kelimeler:** 3-8 arasında olmalı ve Index Medicus Medical Subject Headings-(MeSH)'de yer alan kelimeler kullanılmalıdır. Türkçe anahtar kelimelerinizi oluşturmak için <http://www.bilimterimleri.com/> adresini kullanınız.

d) **Giriş:** Araştırmanın amacı ve gerekçesi güncel literatür bilgisi ile desteklenerek iki sayfaya aşmayacak şekilde sunulmalıdır.

e) **Gereç ve Yöntem:** Araştırmanın gerçekleştirildiği kurum/kuruluş ve tarih belirtilmeli, araştırmada kullanılan araç, gereç ve yöntem sunulmalı; istatistiksel yöntemler açıkça belirtilmelidir.

f) **Bulgular:** Sadece araştırmada elde edilen bulgular belirtilmelidir.

g) **Tartışma:** Araştırmanın sonunda elde edilen bulgular, diğer araştırmaların bulgularıyla karşılaştırılmalıdır. Araştırmacı, kendi yorumlarını bu bölümde aktarmalıdır.

h) **Teşekkür:** Ana metnin sonunda kaynaklardan hemen önce yer almalıdır. Teşekkür bölümünde çalışmaya destek veren kişi, kurum/kuruluşlar yer almalıdır.

i) **Kaynaklar:** Yazarlar kaynakların eksiksiz ve doğru yazılmasından sorumludur. Kaynaklar, metnin içinde geçiş sırasına göre numaralandırılmalıdır. Numaralar, parantez içinde cümle sonlarında verilmelidir. Kaynakların yazılımı ile ilgili aşağıda örnekler verilmiştir. Daha detaylı bilgi için "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997; 277: 927-934) (<http://www.nejm.org/>) bakılmalıdır.

**Sürelili yayın:** Yazar(lar)ın Soyadı Adının baş harf(ler)i (altı veya daha az yazar varsa hepsi yazılmalıdır; yazar sayısı yedi veya daha fazla yalnız ilk altısını yazıp "et al." veya "ve ark." eklenmelidir). Makalenin başlığı, Derginin Index Medicus'a uygun kısaltılmış ismi, Yıl; Cilt (Sayı): İlk ve son sayfa numaraları.

• Standard dergi makalesi için örnek: Demirci M, Ünlü M, Şahin Ü. A case of hydatid lung cyst diagnosed by kinyoun staining of bronco-alveolar fluid. Türkiye Parazitoloj Derg, 2001; 25 (3): 234-5.

• Yazarı verilmemiş makale için örnek: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the panceras (Editorial). Br Med J, 1981; 283: 628.

• Dergi eki için örnek: Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functinal asplenia: Demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). Blood, 1979; 54 (Suppl 1): 26a.

**Kitap:** Yazar(lar)ın soyadı adının baş harf(ler)i. Kitabın adı. Kaçınıcı baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı.

• Örnek: Eisen HN. Immunology: an Introduction to Molecular and Cellular Principles of the Immun Response. 5th ed. New York: Harper and Row, 1974.

**Kitap bölümü:** Bölüm yazar(lar)ın soyadı adının başharf(ler)i. Bölüm başlığı. In: Editör(ler)in soyadı adının başharf(ler)i ed/eds. Kitabın adı. Kaçınıcı baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı: Bölümün ilk ve son sayfa numaraları.

• Örnek: Weinstein L. Swarts MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. Pathologic Physiol ogy: Mechanism of Disease. Phidelphia. WB Saunders, 1974: 457-72.

**Web adresi:** Eğer doğrudan "web" adresi referans olarak kullanılacaksa adres ile birlikte parantez içinde bilgiye ulaşılan tarih de belirtilmelidir. Web erişimli makalelerin referans olarak metin içinde verilmesi gerektiğinde DOI (Digital Object Identifier) numarası verilmesi şarttır.

**Kongre bildirisi:** Entrala E, Mascaro C. New structural findings in Cryptosporidium parvum oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, Izmir-Turkey. 1994.

**Tez:** Bilhan Ö. Labirent savakların hidrolik karakteristiklerinin deneysel olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.

j) **GenBank/DNA Dizi Analizi:** Gen kalıtım numaraları ve DNA dizileri makale içinde kaynak olarak gösterilmelidir. Konuyla ilgili ayrıntılı bilgi için "National Library of Medicine" adresinde "National Center for Biotechnical Information (NCBI)" bölümüne bakınız.

k) **Şekil ve Tablolar:** Her tablo veya şekil ayrı bir sayfaya basılmalı, alt ve üst çizgiler ve gerektiğinde ara sütun çizgileri içermelidir. Tablolar, "Tablo 1." şeklinde numaralandırılmalı ve tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne yazılmalıdır. Açıklayıcı bilgiye başlıkta değil dipnotta yer verilmeli, uygun simgeler (\*,+,,+,+, v.b.) kullanılmalıdır. Fotoğraflar "jpeg" formatında ve en az 300 dpi olmalıdır. Baskı kalitesinin artırılması için gerekli olduğu durumlarda fotoğrafların orijinal halleri talep edilebilir.

12. Araştırma Makalesi türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 40 olmalıdır.

13. Derleme türü yazılarda tercih yazar sayısı ikiden fazla olmamalıdır. Yazar(lar) daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olmalı; bu deneyimlerini derleme yazısında tartışmalı ve kaynak olarak göstermelidir. Derlemelerde Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet (en az 250, en fazla 400 kelime içermelidir) ve anahtar kelimeler bulunmalıdır. Derleme türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 60 olmalıdır.

14. Olgu sunumlarında metin yedi sayfayı aşmamalıdır. Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet ve anahtar kelimeler ayrıca giriş, olgu ve tartışma bölümleri bulunmalıdır. Olgu sunumu türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 20 olmalıdır.

15. Editöre Mektup: Daha önce yayımlanmış yazılara eleştiri getirmek, katkıda bulunmak ya da bilim haberi niteliği taşıyacak bilgilerin iletilmesi amacıyla yazılan yazılar, Yayın Kurulu'nun inceleme ve değerlendirmesinin ardından yayınlanır. Editöre Mektup bir sayfayı aşmamalı ve kaynak sayısı en fazla 10 olmalıdır.

16. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

17. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

## WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Articles should be prepared according to the rules of the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology. Submissions can be made online at the address [www.turkhiyjen.org](http://www.turkhiyjen.org) through the Online "Manuscript Submission, Tracking, Evaluation Program".

Manuscripts are checked according the following rules. If the rules are not adhered to, manuscripts will be returned to the author.

1. The "Copyright Transfer Form" (Copyright Release Form) after being signed by all authors should be uploaded using the article accepting system of the journal.

2. The title of article, short title, author name(s), names of institutions and the departments of the authors, full address, telephone numbers (landline and mobile) and e-mail address should be given:

a. The title should be short and written in lower case.

b. The short title should not exceed 40 characters.

c. The study supported by a fund or scientific organisation must be mentioned in a footnote or in the acknowledgements.

d. The study presented in a conference/symposium must be mentioned with the type of presentation in footnotes or in the acknowledgements.

3. For Turkish studies; Terms used in articles should be in Turkish and Latin as much as possible, according to the latest dictionary of the "Turkish Language Institution". Importance should be given to use pure Turkish language and as many as Turkish references.

4. Latin names of microorganisms used for the first time in the text have to be written in full. If these names are used later, they should be abbreviated in accordance to international rules. The original Latin names of microorganisms should be written in *Italic*: for example, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*. Names of antibiotics should be abbreviated in accordance with international standards.

5. Symbols of the units mentioned in the text should be according to "The Système International (SI).

6. Articles should be written in one of the "past perfect, present perfect and past" tenses and in the passive mode.

7. Only one side of A4 paper should be used and should have a 2.5 cm margin on each side. 12 pt, Times New Roman font and double line space should be used.

8. The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology expects the authors to comply with the ethics of research and publication. In human research, a statement of the informed consent of those who participated in the study is needed in the section of the "Materials and Methods". In case of procedures that will apply to volunteers or patients, it should be stated that the study objects have been informed and given their approval before the study started. In case the authors do not have a local ethics committee, the principles outlined in the "Declaration of Helsinki" should have been followed. Authors should declare that they have followed the internationally accepted latest guidelines, legislation and other related regulations and should send "Approval of the Ethics Committee".

9. In case animal studies, approval also is needed; it should be stated clearly that the subjects will be prevented as much as possible from pain, suffering and inconvenience.

10. In case patient photos are used which shows his/her ID, a written informed consent of the patient on the use of the photos must be submitted.

### 11. Research Articles;

Research papers should consist of Turkish abstract, English abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements (if any), and References sections. These sections should be written in bold capital letters and aligned left. English articles should have a Turkish abstract and title in Turkish. (If the all of the authors from abroad the manuscript and abstract can be write English language).

a) Turkish Abstract should consist of the subheadings of Objective, Methods, Results and Conclusion (Structured Abstract). It should be between 250 and 400 words.

b) English Abstract: The abstract should be structured like the Turkish abstract (Objective, Methods, Results, and Conclusion). It should be between 250 and 400 words.

c) Key words The number of keywords should be between 3-8 and the terminology of the Medical Subjects Headings (Index Medicus Medical Subject Headings-MeSH) should be used.

d) Introduction: The aim of the study, and references given to similar studies should be presented briefly and should not exceed more than two pages.

e) Materials and Methods: The date of the study, institution that performed the study, and materials and methods should be clearly presented. Statistical methods should be clearly stated.

f) Results: The results should be stated clearly and only include the current research.

g) Conclusions: In this section, the study findings should be compared with the findings of other researchers. Authors should mention their comments in this section.

h) Acknowledgements should be placed at the end of the main text and before the references. In this section, the institutions/departments which supported the research should be stated.

i) References: Authors are responsible for supply complete and correct references. References should be numbered according to the order used in the text.

Numbers should be given in brackets and placed at the end of the sentence. Examples are given below on the use of references. Detailed information can be found in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997 277: 927-934) and at <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>.

Periodicals: Author(s) Last Name initial(s) name of author(s) (if there are six or fewer authors, all authors should be written; if the number of authors are seven or more, only the first six of the authors should be written and the rest as "et al"). The title of the article, the abbreviated name of the journal according to the Index Medicus, Year; Volume (Issue): The first and last page numbers.

• Example of standard journal article: Demirci M, Unlü M, Sahin U. A case of hydatid cyst diagnosed by kinyoun staining of lung bronco-alveolar fluid. *Türkiye Parazitol Derg*, 2001; 25 (3): 234-5.

• Example of an article with authors unknown: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J*, 1981; 283:628.

• Example of journal supplement: Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: Demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood*, 1979; 54 (Suppl 1): 26a.

Books: Surname of the author(s) initial name(s) of author(s). The name of the book. The edition number. Place of publication: Publisher, Publication year. Example: Eisen HN. Immunology: an Introduction to the Principles of Molecular and Cellular Immune Response. 5th ed. New York: Harper and Row, 1974.

Book chapters: The author(s) surname of the chapter initial(s) letter of the name. Section title. In: Surname of editor(s) initial (s) letter of first name(s) ed / eds. The name of the book. Edition number. Place of publication: Publisher, year of publication: The first and last page numbers of the chapter.

• Example: Weinstein L. Swarts MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. Pathologic Physiology: Mechanism of Disease. Philadelphia. WB Saunders, 1974:457-72.

Web address: If a "web" address is used as the reference address, the web address date should be given in brackets with the address. The DOI (Digital Object Identifier) number must be provided, when a web access article used in the text as a reference.

Congress papeyars: Entrala E, Mascaro C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, Izmir-Turkey, 1994.

Thesis: Bilhan Ö. Experimental investigation of the hydraulic characteristics of labyrinth weir. Master Thesis, Science Institute of Firat University, 2005.

j) GenBank / DNA Sequence Analysis: DNA sequences of genes and heredity numbers should be given as references in the article. For more information, check "National Library of Medicine" and "National Center for Biotechnical Information (NCBI)".

k) Figure and Tables: Each table or figure should be printed on a separate sheet, the top and bottom lines and if necessary column lines must be included. Tables should be numbered like "Table 1." and the table title should be written above the top line of the table. Explanatory information should be given in footnotes, not in the title and appropriate icons (\*,+,++, etc.) should be used. Photos should be in "jpeg" format. In case the quality of the photos is not good for publication, the originals can be requested.

12. Research articles should have up to 40 references.

13. In reviews, it is preferred to have not more than two authors. Author(s) must have done research and published articles previously on this subject; they should discuss their experience and use as reference in the review. Reviews should have Turkish and English titles, abstracts (it should contain minimum 250, maximum 400 words) and key words. Reference numbers for the review should be maximum 60.

14. Case reports should have a maximum of seven pages of text.

Case report should have a Turkish and English title, abstract, keyword(s) and also introduction, case description and discussion sections should be given. Number of references should be maximum 20.

15. Letters to Editor: Written to make criticisms, additions to previously published articles or scientific updates are published after review and assessment of the Editorial Board. Letters should not exceed one page of text and must be supported with up to 10 references.

16. The articles which do not comply with the journal rules are not accepted.

17. Authors should keep a copy of the article that they submit.

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

General Directorate of Public Health

Tel : +90 312 565 55 79

Fax : +90 312 565 55 91

e-mail : [hsgm.thdbd@saglik.gov.tr](mailto:hsgm.thdbd@saglik.gov.tr)

## YAYIN İLKELERİ

- Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü yayın organıdır. Dergi üç (3) ayda bir çıkar ve dört (4) sayıda bir cilt tamamlanır.
- Dergide biyoloji, mikrobiyoloji, enfeksiyon hastalıkları, farmakoloji, toksikoloji, immünoloji, parazitoloji, entomoloji, kimya, biyokimya, gıda, beslenme, çevre, halk sağlığı, epidemiyoloji, patoloji, fizyopatoloji, moleküler biyoloji, genetik, biyoteknoloji ile ilgili alanlardaki özgün araştırma, olgu sunumu, derleme, editöre mektup türündeki yazılar Türkçe ve İngilizce olarak yayımlanır.
- Dergiye, daha önce başka yerde yayımlanmamış ve yayımlanmak üzere başka bir dergide inceleme aşamasında olmayan yazılar kabul edilir.
- Dergi Yayın Kurulu tarafından uygun görülen yazılar, konu ile ilgili en az iki Bilimsel Danışma Kurulu Üyesinden olumlu görüş alındığında yayımlanmaya hak kazanır. Bu kurulların, yazının içeriğini değiştirmeyen her türlü düzeltme ve kısaltmaları yapma yetkileri vardır.
- Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.
- Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.
- Dergide yayımlanan yazıların yayın hakkı Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne aittir. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

## YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

- Bütün yazarlarca isim sırasına göre imzalanmış telif hakkı devir formu eksiksiz olarak dolduruldu.
  - Yazar isimleri açık olarak yazıldı.
  - Her yazarın bağlı bulunduğu kurum adı, yazar adının yanına numara verilerek başlık sayfasında belirtildi.
  - Yazışmalardan sorumlu yazarın adı, adresi, telefon-faks numaraları ve e-posta adresi verildi.
  - Türkçe ve İngilizce başlıklar ile kısa başlık yazıldı.
  - Türkçe ve İngilizce özetlerin kelime sayısı (300-500 arası) kontrol edildi.
  - Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler (MeSH ve Türk Tıp Terimleri Sözlüğü'ne uygun) verildi.
  - Tüm kısaltmalar gözden geçirildi ve standard olmayan kısaltmalar düzeltildi.
  - Metin içerisinde geçen orijinal Latince mikroorganizma isimleri italik olarak yazıldı.
  - Metin içerisinde bahsedilen birimlerin sembolleri the Système International (SI)'e göre verildi.
  - Yazılar "miş'li geçmiş" zaman edilgen kip ile yazıldı.
  - Metnin tamamı 12 punto Times New Roman karakteri ile çift aralıkla yazıldı.
  - Metin sayfanın yalnız bir yüzüne yazılarak her bir kenardan 2,5 cm boşluk bırakıldı.
  - Tablolar, şekiller yazım kurallarına uygun olarak ve her biri ayrı bir sayfada verildi.
  - Fotoğraflar JPEG formatında aktarıldı.
  - Kaynaklar cümle sonlarında parantez içinde ve metin içinde kullanım sırasına göre ardışık sıralandı.
  - Kaynaklar, makale sonunda metin içinde verildiği sırada listelendi.
  - Kaynaklar gözden geçirildi ve tüm yazar adları, ifade ve noktalamalar yazım kurallarına uygun hale getirildi.
- Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız.
- Etik kurul onayı alındı.
  - Bilimsel kuruluş ve/veya fon desteği belirtildi.
  - Kongre/Sempozyumda sunumu ve sunum türü belirtildi.
  - Varsa teşekkür bölümü oluşturuldu.

## EDITORIAL POLICY

- The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology is a publication of the “General Directorate of Public Health (Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)” of Ministry of Health. The Journal is published every three months and one volume consists of four issues.
- The journal publishes biology, microbiology, infectious diseases, pharmacology, toxicology, immunology, parasitology, entomology, chemistry, biochemistry, food safety, environmental, health, public health, epidemiology, pathology, pathophysiology, molecular biology, genetics, biotechnology in the field of original research, case report, reviews and letters to the editor are published in Turkish and English.
- Articles which are not previously published in another journal or not currently under evaluation elsewhere can be accepted for the journal.
- Articles approved by the Scientific Committee and Editorial Board are eligible to be released after receiving at least two positive opinions from the Scientific Committee members. Those committees have the authority to make all corrections and abbreviations but not to change the content of the article.
- The authors have the all the scientific and legal responsibilities of the articles.
- The authors must fully obey the ethics of research and publication.
- The copyright of the article published in the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology belongs to the Journal. Copyright fee is not paid to the authors.

## CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

- Copyright transfer form is completed in full and signed by all authors according to the name order.
  - Author names are written clearly.
  - Affiliated institutions of the all authors are given on the title page by the number stated after the author's name.
  - The name, address, phone-fax numbers and mail address of the author responsible for correspondence are given.
  - Turkish, English titles and short title are written.
  - The number of words in Turkish and English abstracts (between 300-500) is checked.
  - Turkish and English keywords (according to MeSH) are given.
  - All abbreviations are reviewed and non-standard abbreviations are corrected
  - Original Latin names of microorganisms are written in italic.
  - Symbols are mentioned according to the units in the Système International (SI).
  - The article is written in passive mode and given one of the “past perfect, present perfect or past ” tenses.
  - Text is written in 12 pt Times New Roman characters and with double line spacing.
  - Text is written only on one side of the page and has 2.5 cm space at each side.
  - Tables and figures are given on each separate page according to the writing rules.
  - Photos are in JPEG format.
  - References are given at the end of the sentence in brackets and are listed in order of use in the text.
  - References are listed at the end of the article in the order given in the text.
  - References are reviewed, and the name of all authors, spelling and punctuation are controlled according the writing rules.
- Furthermore, please check.**
- “Ethics Committee Approval” is given.
  - Support to a study by a fund or organization is mentioned.
  - Congress / Symposium presentations and the type of presentation are stated.
  - Acknowledgement is given, if there is.



Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne  
[www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org) adresinden online olarak makale gönderilebilir  
Submissions can be made online at the address [www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org)  
to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

INDEX COPERNICUS  
INTERNATIONAL

DOAJ DIRECTORY OF  
OPEN ACCESS  
JOURNALS



A division of the American Chemical Society



Academic Journals Database  
disseminating  
quality controlled scientific knowledge



Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi (Türk Hij Den Biyol Derg); DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, ResearchGate, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Genamics JournalSeek, Academic Journals Database, Scirus Scientific Database, EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Medoanet, SCOPUS, Türkiye Atıf Dizini, Türk - Medline ve TUBITAK - ULAKBİM Türk Tıp Dizini'nde yer almaktadır.

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (Türk Hij Den Biyol Derg) is taken part in DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, Research Gate, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Genamics JournalSeek, Academic Journals Database, Scirus Scientific Database, EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Medoanet, SCOPUS, Türkiye Atıf Dizini, Türk - Medline and TUBITAK - ULAKBİM Türk Tıp Dizini.



## İLETİŞİM

## CORRESPONDENCE

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

General Directorate of Public Health  
Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Sağlık Mahallesi Adnan Saygun Caddesi No: 55 Refik Saydam Yerleşkesi 06100 Sıhhiye/ANKARA - TÜRKİYE

Tel: 0312 565 55 79

Faks: 0312 565 55 91

e-posta: [hsgm.thdbd@saglik.gov.tr](mailto:hsgm.thdbd@saglik.gov.tr)

<http://www.hsgm.gov.tr>

[www.turkhijyen.org](http://www.turkhijyen.org)



## ■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. **Community approach towards COVID-19 in Turkey: one month after the first confirmed case**  
Türkiye’de COVID-19’a yönelik toplum yaklaşımı: ilk vaka görüldükten bir ay sonra  
Hülya ŞİRİN, Gamze KETREZ., Ahmad Abed AHMADİ, Ahmet ARSLAN, Emre ALTUNEL, İbrahim Sefa GÜNEŞ, Ebru SEÇİLMİŞ, Seçil ÖZKAN, Metin HASDE  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.87059 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 381 - 398  


---

2. **Identification of enterococci by MALDI-TOF-MS & 16S rRNA sequencing isolated from squeezed cheeses and evaluation of antibiotic susceptibility and antibacterial activity**  
Sıkma peynirlerden izole edilen enterokokların MALDI-TOF-MS ve 16S rRNA sekanslama ile tanımlanması ve antibiyotik dirençlilikleri ile antibakteriyal aktivitelerinin değerlendirilmesi  
Furkan AYDIN, Halil İbrahim KAHVE, Mustafa ARDIÇ, İbrahim ÇAKIR  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.92332 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 399 - 412  


---

3. **Age-specific anti-mullerian hormone nomogram in Şanlıurfa**  
Şanlıurfa’da yaşa özgü anti-müllerian hormon nomogramı  
Adnan KİRMİT, Ahmet Berkiz TURP  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.34392 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 413 - 420  


---

4. **Carbon monoxide contributes to the regulation of vascular tonus in renal resistance arteries in spontaneously hypertensive rats**  
Karbon monoksit, spontan hipertansif sıçanların renal direnç arterlerinde vasküler tonusun düzenlenmesine katkıda bulunur  
Günnur KOÇER, Seher NASIRCILAR, Filiz BASRALI, Oktay KURU, Ümit Kemal ŞENTÜRK  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.76736 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 421 - 430  


---

5. **TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatri Polikliniği’ne başvuran akut üst solunum yolu enfeksiyonu tanılı çocuklarda influenza virüs tip A/B ve A grubu beta hemolitik streptokok birlikteliğinin araştırılması**  
Investigation of the coexistence of influenza virus types A/B and group A beta haemolytic streptococcus in children diagnosed with acute upper respiratory infection presenting to the pediatric outpatient clinic of TOBB ETU Medical Faculty Hospital  
Neşe İNAN, Nazife Yasemin ARDİÇOĞLU-AKİSİN, Ayyüce UÇARSU, Berk ATALAY, Berrak SOPACI, Gülce HÜRKAL, Mustafa Ziya PAÇACI, Taha TUNÇKAŞIK, Jülide Sedef GÖÇMEN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.81594 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 431 - 440  


---

6. **Çorum ilinde sokak köpeklerini enfeste eden kene türlerinin belirlenmesi**  
Ticks infesting stray dogs in Çorum Province of Turkey  
Gönül ARSLAN-AKVERAN, Djursun KARASARTOVA, Arzu COMBA, Bahat COMBA, Adem KESKİN, Ayşegül TAYLAN-OZKAN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.43402 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 441 - 448  


---

7. **Yaşlanma ve yüzme egzersizinin, torasik aorta ve gastrocnemius iletim arterlerinde karbon monoksit gevşeme yanıtına etkisi**  
The effect of aging and exercise training on carbon monoxide relaxation response in thoracic aorta and gastrocnemius feed artery  
Günnur KOÇER, Seher NASIRCILAR-ÜLKER, Yusuf OLGAR, Nihal ÖZTÜRK, Semir ÖZDEMİR  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.54289 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 449 - 458  


---

8. **Klorokuin endoplazmik retikulum stresini ve enflamasyonu inhibe ederek sıçanlarda adriamisin uyarılı kardiyotoksisiteyi engeller**  
Chloroquine inhibits adriamycin-induced cardiotoxicity in rats by inhibiting endoplasmic reticulum stress and inflammation  
Emin KAYMAK, Ali Tuğrul AKIN, Emel ÖZTÜRK, Tayfun CEYLAN, Nurhan KULOĞLU, Derya KARABULUT, Birkan YAKAN  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.04378 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 459 - 466  


---

9. **Nrf2 inhibitor brusatol ameliorates cecal ligation and puncture-induced lung injury in rats via anti-inflammation and anti-oxidative stress**  
Nrf2 inhibitörü brusatol, sıçanlarda anti-inflamasyon ve anti-oksidatif stres yoluyla çekal ligasyonu ve delinmeye bağlı akciğer hasarını iyileştirir  
Ersen ERASLAN, Ayhan TANYELİ, Mustafa Can GÜLER, Fazile Nur EKİNCİ-AKDEMİR, Tuncer NACAR, Ömer TOPDAĞI, Elif POLAT  
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.75232 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 467 - 476  


10. Grup A Streptokok ve İnfluenza A/B'nin sebep olduğu üst solunum yolu enfeksiyonlarının karşılaştırılması

A comparison of upper respiratory tract infections caused by Group A Streptococci and influenza A/B

Hayrettin TEMEL, Mehmet GÜNDÜZ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.34033 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

477 - 486



11. Bir devlet hastanesinde 2013-2018 döneminde *Acinetobacter* enfeksiyonlarında antibiyotik duyarlılığı ve çoğul antibiyotik direnci

Antibiotic sensitivity and multiple antibiotic resistance of *Acinetobacter* infections in a state hospital in the period 2013-2018

Ahmet ÇALIŞKAN, Özlem KİRİŞÇİ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.46547 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

487 - 492



## ■ Olgu Sunumu / Case Report

12. Early switch therapy from ceftriaxone to ampicillin in an immunocompromised patient with *Listeria monocytogenes* septicemia and meningitis

İmmün sistemi baskılanmış hastada *Listeria monocytogenes*'e bağlı sepsis ve menenjitin tedavisinde seftriaksondan amiplisine erken geçiş

Gülşen HAZIROLAN, Gülçin DİZMAN

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.04127 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")

493 - 496



## ■ Derleme / Review

13. Gıda kaynaklı hastalıklarda intestinal mikrobiyotanın önemi

Importance of intestinal microbiota in foodborne diseases

Lütfiye PARLAK, Derya DİKMEN

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2019.54926 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

497 - 508



14. Nano-ilaç taşıma sistemleri ve toksikolojik değerlendirmeleri

Nano-drug delivery systems and their toxicological assessment

Özge MARANGOZ, Oğuzhan YAVUZ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2020.37790 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

509 - 526







# Community approach towards COVID-19 in Turkey: one month after the first confirmed case

## Türkiye’de COVID-19’a yönelik toplum yaklaşımı: ilk vaka görüldükten bir ay sonra

Hülya ŞİRİN<sup>1</sup>, Gamze KETREZ<sup>1</sup>, Ahmad Abed AHMADI<sup>1</sup>, Ahmet ARSLAN<sup>1</sup>, Emre ALTUNEL<sup>1</sup>, İbrahim Sefa GÜNEŞ<sup>1</sup>, Ebru SEÇİLMİŞ<sup>1</sup>, Seçil ÖZKAN<sup>2</sup>, Metin HASDE<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Objective:** During this time when the COVID-19 is rising in Turkey, assessing the knowledge, attitude and practices of the public about the COVID-19 will be useful in finding out whether the interventions to control the outbreak are effective and viable. Furthermore, such studies are needed to properly manage the outbreak process and cast light on future interventions. This study aims to assess the knowledge, attitude and practices of people in Turkey about the COVID-19.

**Methods:** A cross-sectional survey was implemented between 11 and 21 April 2020 using an online questionnaire. The survey was applied online, and social media platforms were used to reach out to the highest number of people who met the inclusion criteria (i.n., people aged 18 or older). The questionnaire consists of three parts (socio-demographic 40 questions, medical history, and knowledge, attitude, and practice section). Descriptive statistics and a comparison of participants’ knowledge degrees about COVID-19 is tested using the Chi square test.

**Results:** A total number of 8505 participant were

### ÖZET

**Amaç:** Yeni koronavirüs hastalığı için koruyucu önlemler hakkında toplumun bilgi tutum ve davranışlarını değerlendirmek, salgın kontrolü için uygulanan müdahalelerin etkinlik ve uygulanabilirlik düzeyini saptamakta fayda sağlayacaktır. Ayrıca, bu konudaki çalışmalar salgın sürecini yönetebilme ve yeni yapılacak müdahalelere ışık tutması açısından gereklidir. Bu nedenle çalışmamızın amacı Türkiye’de yaşayan bireylerin Yeni Koronavirüs Hastalığı hakkında bilgi, tutum ve davranışlarını saptamaktır.

**Yöntem:** Bu kesitsel çalışma 11-21 Nisan 2020 tarihleri arasında bir çevrimiçi anketi 10 kullanılarak uygulanmıştır. Anket çevrimiçi olarak uygulandı ve dâhil edilme kriterlerini karşılayan en yüksek sayıda kişiye (örneğin, 18 yaş ve üstü) ulaşmak için sosyal medya platformları kullanıldı. Anket formu sosyodemografik, sağlık özgeçmiş ve bilgi, tutum ve davranış sorularını içeren üç bölümden oluşmaktadır. Çalışmanın tanımlayıcı sonuçları verilmiştir. Katılımcıların sosyodemografik özelliklerine göre bilgi, tutum ve davranışlarının analizinde ki-kare testi kullanılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmada toplam 8505 kişi katılmıştır.

<sup>1</sup>University of Health Sciences, Gülhane School of Medicine, Department of Public Health, Ankara  
<sup>2</sup>Gazi University, School of Medicine, Department of Public Health, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Hülya ŞİRİN

Gülhane Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD. Emrah, Gülhane Cd., 06010 Keçiören Ankara - Türkiye  
E-posta / E-mail : hulya.sirin@sbu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 09.08.2020  
Kabul Tarihi / Accepted : 06.12.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.87059

Şirin H, Ketrez G, Ahmadi AA, Arslan A, Altunel E, Güneş İS, Seçilmiş E, Özkan S, Hasde M. Community approach towards COVID-19 in Turkey: one month after the first confirmed case. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 381-398

accepted for the study. 59.3% (5045) of respondents were women and 77.7% (6808) had a university degree or higher. 85.6% (7277) of the participants had a good level of knowledge about COVID-19. Over 90% of participants have answered the questions about the mode of transmission of the COVID-19, symptoms, risk groups, isolation, and treatment correctly. 55.2% (4696) of respondents thought that the disease would be successfully taken under control in Turkey and 38.6% (3282) in the world eventually. 55.6% (4731) believed that the COVID-19 will not go away when the weather gets warmer. 35.1% (2983) believed that getting the disease is preordained by fate. The most frequently practiced protective behaviors included hand hygiene, staying at home and wearing mask outside. 98.8% reported that they use their hands in order to protect themselves from COVID-19.

**Conclusion:** Though, the knowledge attitude and practice of participants in our study was evaluated high, there were some knowledge and practice gaps in study population that should be considered in further community interventions. The future interventions for the epidemic control need to consider social determinants such as the level of education, employment status and religious beliefs of people.

**Key Words:** COVID-19, pandemic, knowledge, attitude, behavior

Katılımcıların %59,3'ü (5045) kadın ve %77,7'si (6808) üniversite veya üstü seviyede eğitim düzeyine sahipti. Katılımcıların %90'ından fazlası hastalığın bulaşma yolu, belirtileri, risk grupları, izolasyon ve tedavisi ile ilgili soruları doğru yanıtlamıştır. Katılımcıların %55,2'si hastalığın Türkiye'de ve %38,6'sı ise dünyada başarıyla kontrol altına alınacağını düşünmektedir. Katılımcıların %55,6'sı Yeni Koronavirüs enfeksiyonunun hava ısınınca sona ermeyeceğini ve %35,1'i hastalanmanın kaderi olduğunu düşünmektedir. Korunmaya yönelik davranışlardan en çok uygulananları el hijyeni, evde kalma, dışarıda maske takmadır. Katılımcıların %98,8'i hastalıktan korunmak için ellerini yıkıyormuş.

**Sonuç:** Çalışmamız kapsamındaki kişilerin bilgi tutumu ve davranışları yüksek olarak değerlendirilmiş olsa da, çalışma popülasyonunda daha sonraki toplum müdahalelerinde dikkate alınması gereken bazı bilgi ve davranış boşlukları belirlenmiştir. Gelecekte olabilecek salgın kontrolü müdahalelerinde, insanların eğitim seviyesi, istihdam durumu ve dini inançları gibi sosyal belirleyicilerde dikkate alınmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, pandemi, bilgi, tutum, davranış

## INTRODUCTION

The novel coronavirus disease (COVID-19) was first defined when unexplained pneumonia cases occurred among people who worked and shopped at a seafood market in Wuhan, China, in December 2019 (1). Epidemiological studies on the disease suggested that the disease extended beyond people who consumed seafood. Therefore, people were led to think that there was evidence of human-to-human transmission (2,3). The latest studies indicate

transmission through droplets or direct contact (4).

The disease then went on to spread rapidly in other countries. On 30 January 2020, WHO declared a "public health emergency of international concern". On 11 March 2020, WHO announced the disease as a pandemic (5).

The disease symptoms often include fever, dry cough, shortness of breath, muscle soreness,



weakness, headache, chest pain, and diarrhea. Severe cases are also characterized by respiratory failure, renal failure, septic shock, and multi-organ failure (6-8). It was reported that the clinical course of the disease was more severe among people with underlying chronic illnesses (e.g., hypertension, diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases, cancer, etc.) and the elderly (6,9). Yet, it is also known that some people tested positive for COVID-19 are asymptomatic (10-12).

As COVID-19 is a communicable disease, preventive measures including wearing masks, hand hygiene, staying away from crowded areas, and social distancing are significant in the prevention and outbreak control (13).

Contacts of patients identified through contact tracing are quarantined for 14 days, which is the disease's incubation period (14).

Similar to other countries, Turkey took a number of measures, including the shutdown of schools followed by distance education, canceling all meetings, closure of houses of worship, curfew on people aged  $\geq 65$  and under 20, and obligatory use of masks in public areas in order to curb the spread of the disease. The first case was detected in Turkey on 11 March 2020. This was followed by further awareness-raising interventions such as developing and airing public spots and the use of billboards (15).

During this time, when the COVID-19 is rising in Turkey, assessing the public's knowledge, attitude, and practices about the COVID-19 will be useful in finding out whether the interventions to control the outbreak are effective and viable. There are no prior studies conducted in Turkey on the assessment of knowledge, attitude, and practices. Yet, such studies are needed to properly manage the outbreak process and cast light on future interventions.

Thus, this study aims to assess the knowledge, attitude, and practices of people in Turkey towards COVID-19.

## MATERIAL and METHOD

### Study Population

This was a descriptive survey. The survey was implemented between 11 and 21 April 2020, one month after the first case was confirmed in Turkey. The survey was applied online, and social media platforms were used to reach out to the highest number of people who met the inclusion criterion (i.e., people aged 18 or older). According to TURKSTAT (The Turkish Statistical Institute)-2020 results, the population aged 18 or older is 60278977. The minimum sample size required was calculated as 9603 people within a 95% confidence level using the EpilInfo computer programme (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA), assuming anticipated frequency of 50.0% and absolute precision of 1.0%. Respond rate was 89,9%. The survey was approved by the Decision of the Ethical Committee of Gazi University.

### Questionnaire and Data Collection

The questionnaire was developed after reviewing the literature, preventive strategies in Turkey, and frequently asked questions on reliable websites. Questionnaire language have taken as plain as possible in order to make the questions simple and easy to understand. The online questionnaire was designed using Google forms and pre-tested online on 15 people from different socio-demographic backgrounds before it was finalized. The online questionnaire was launched on Google forms on 11 April 2020, and data were collected for ten days. The survey link was shared with the public using social media (i.e., WhatsApp, Facebook, Instagram, and Twitter).

The survey included questions on participants' socio-demographic information, Medical history, knowledge, attitude, and practices towards COVID-19.

The socio-demographic section inquired about age, sex, civil status, education level, employment status, province of residence, whether there are individuals

aged  $\geq 65$  or under 20 in the household, the existence of any chronic disease and any other illness, and smoking status. The section on knowledge, attitude, and practices was included 20 questions: ten on knowledge, five on attitudes, and five on practices. The responses were designed as “True”, “False” and “I Do not know” in the section on knowledge; “Yes”, “No” and “I Do not know” in the section on attitudes, and “Do the right thing” and “Do not do the right thing” in the section on practices.

### Statistical Analysis

Categorical variables were summarized with count and percent and compared using The Chi-Square Test. Responses to the question on occupation were grouped as “health worker” and “other”, and answers to the question on the province of residence were grouped as “İstanbul” (where nearly 2/3 of the cases in Turkey occur) and “other”. Regarding responses to practices, “I never go out” and “I go out for essential needs” were considered the right behavior for the question of staying at home. The response “Yes, I wear a mask whenever I go out” was considered proper for the question of using masks. As regards the questions for measuring the knowledge level, 1 point was given to each right answer marked “True” and 0 to incorrect answers marked “False” or “Do not know”. The evaluation was based on 10 points in total. Afterward, the knowledge level of respondents was classified based on these scores (0-5: poor, 6-8: fair, and 9-10: good). A Chi-square test is used to analyze the knowledge, attitudes, and practices of respondents based on socio-demographic characteristics. All data management and statistical analysis of the study is done in SPSS 25.0 packages. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant in all statistical analyses.

## RESULTS

Eight thousand six hundred forty respondents completed the survey, of which 135 people who participated from abroad Turkey did not complete the

survey properly were excluded, and 8505 participants were considered for final evaluation. People from all provinces of Turkey participated in the survey. Of total respondents; 59.3% (5045) were woman, 38.9% (3310) aged 36-50 years, 29.1% (2471) aged 21-35 years, 68.4% (5817) were married, 63.4% (5393) were working, 77.7% (6808) had a university degree or higher, and 17.7% (1501) lived in İstanbul province. Participants’ age groups, civil status, employment status, work arrangement, and the province of residence had significantly differed across gender ( $p < 0.001$ ) (Table 1).

The knowledge level of respondents about the COVID-19 was classified as “good”, “fair” and “poor”. According to this classification, 85.6% (7277) had a good level of knowledge.

The knowledge level of participants seemed to increase in proportion to their level of education ( $p < 0.001$ ). The knowledge level was higher among married respondents compared to single participants ( $p = 0.003$ ), and respondents currently employed are better informed than unemployed individuals ( $p < 0.001$ ). Health workers had a higher level of knowledge than other professions ( $p < 0.001$ ). Detailed comparison of participants’ level of knowledge about COVID-19 according to their socio-demographic characteristics is shown in Table 2.

Over 90% of participants have answered the questions about the mode of transmission of the COVID-19, symptoms, risk groups, isolation, and treatment correctly. The percentage of correct response was the lowest in the questions about the vaccine 85.8% (7299) and transmission from pets to humans 78.3% (6657) (Table 3).

55.2% (4696) of respondents thought that the disease would be taken under control in Turkey, and 38.6% (3282) in the whole world eventually. 55.6% (4731) believed that the COVID-19 would not go away when the weather gets warmer. 35.1% (2983) believed that getting the disease is preordained by fate (Table 4).

**Table 1.** Socio-demographic Characteristics of Respondents by Sex

Variable	Male n (%)	Female n (%)	Total n (%)	p*
<b>Age (n=8505)</b>				
≤20	113(3.3)	198(3.9)	311(3.7)	<0.001
21-35	<b>889(25.7)</b>	<b>1582(31.4)</b>	2471(29.1)	
36-50	<b>1326(38.3)</b>	<b>1984(39.3)</b>	3310(38.9)	
51-64	<b>1000(28.9)</b>	<b>1164(23.1)</b>	2164(25.4)	
65E	<b>1323(3.8)</b>	<b>117(2.3)</b>	249(2.9)	
<b>Civil Status (n=8505)</b>				
Married	2587(74.8)	3230(64.0)	5817(68.4)	<0.001
Single	873(25.2)	1815(36.0)	2688(31.6)	
<b>Education Status</b>				
Primary School	189(5.5)	289(5.7)	478(5.6)	0.308
Secondary School	554(16.0)	865(17.1)	1419(16.7)	
University and higher	2717(78.5)	3891(77.1)	6608(77.7)	
<b>Employment Status (n=8505)</b>				
Employed	2425(70.1)	2968(58.8)	5393(63.4)	<0.001
Unemployed	1035(29.9)	2077(41.2)	3112(36.6)	
<b>Work Arrangement (n=5394)</b>				
Goes to work every day	<b>923(38.0)</b>	<b>614(20.7)</b>	1537(28.5)	<0.001
Goes to work in shifts	751(31.0)	881(29.7)	1632(30.3)	
On paid leave	<b>204(8.4)</b>	<b>386(13.0)</b>	590(10.9)	
On unpaid leave	<b>93(3.8)</b>	<b>155(5.2)</b>	248(4.6)	
Works from home	<b>367(15.1)</b>	<b>798(26.9)</b>	1165(21.6)	
On medical leave	66(2.7)	108(3.6)	174(3.2)	
Other	22(0.9)	26(0.9)	48(0.9)	
<b>Province of Residence (n=8502)</b>				
İstanbul	481(13.9)	1020(20.2)	1501(17.7)	<0.001
Other	2978(86.1)	4023(79.8)	7001(82.3)	

%; Column. Bold: The difference between categories was evaluated by corrected p-value (Bonferroni method), and bolded cells denote a subset of gender categories whose column proportions differ significantly from each other at the 0.05 level.

\*p-value refers to the comparison of variables by sex.

**Table 2.** Comparison of Knowledge Level of Respondents by Socio-demographic Characteristics (n=8505)

Characteristics	Good n (%)	Fair n (%)	Poor n (%)	p*
<b>Sex</b>				
Men	2963(85.6)	470(13.6)	27(0.8)	0.476
Women	4314(85.5)	702(13.9)	29(0.6)	
<b>Age</b>				
≤20	209(67.2)	95(30.5)	7(2.3)	-
21-64	6859(86.3)	1044(13.1)	42(0.5)	
65E	209(83.9)	33(13.3)	7(2.8)	
<b>Education Status</b>				
Primary School	<b>245(51.3)</b>	<b>211(44.1)</b>	<b>22(4.6)</b>	<0.001
Secondary School	<b>1040(73.3)</b>	<b>362(25.5)</b>	<b>17(1.2)</b>	
University and higher	<b>5992(90.7)</b>	<b>599(9.1)</b>	<b>17(0.3)</b>	
<b>Civil status</b>				
Married	5026(86.4)	758(13.0)	33(0.6)	0.003
Single	2251(83.7)	414(15.4)	23(0.9)	
<b>Employment Status</b>				
Employed	4757(88.2)	617(11.4)	19(0.4)	<0.001
Unemployed	2520(81.0)	555(17.8)	37(1.2)	
<b>Profession</b>				
Health worker	1586(92.9)	120(7.0)	2(0.1)	<0.001
Profession	5691(83.7)	1052(15.5)	54(0.8)	
<b>Province of residence</b>				
İstanbul	1327(88.5)	170(11.3)	2(0.1)	<0.001
Other	5948(85.0)	1001(14.3)	49(0.7)	
<b>Smoking status</b>				
Yes	1997(83.7)	380(15.9)	10(0.4)	0.001
No	5280(86.4)	792(13.0)	41(0.7)	
<b>Chronic disease</b>				
Yes	1660(85.9)	262(13.6)	11(0.6)	0.922
No	5616(85.5)	910(13.9)	40(0.6)	
<b>Is there a household member aged 20 or younger?</b>				
Yes	4026(84.2)	720(15.1)	35(0.7)	<0.001
No	3251(87.5)	450(12.1)	16(0.4)	
<b>Is there a household member aged ≥65E</b>				
Yes	1183(84.1)	210(14.9)	14(1.0)	0.039
No	6094(85.9)	960(13.5)	37(0.5)	

#: Row. \*P-values indicate column total. Bold: The difference between categories was evaluated by corrected p-value (Bonferroni method), and bolded cells denote a subset of row categories whose proportions differ significantly from each other at the 0.05 level.

**Table 3.** Correct and Wrong Answers of Respondents to Questions about the COVID-19 (n=8505)

Variable	Correct answer n(%)	Wrong answer n(%)
The COVID-19 is transmitted by inhaling the droplets from infected persons when they cough or sneeze.	8222(96.7)	283(3.3)
You may contact the COVID-19 by touching contaminated surfaces and then touching your face, eyes, nose, or mouth.	8443(99.3)	62(0.7)
The most common symptoms of the COVID-19 are fever, dry cough, and shortness of breath.	8449(99.3)	56(0.7)
The COVID-19 has a higher risk of causing severe disease and death among the elderly and persons with underlying diseases (e.g., asthma, diabetes, cardiac disease).	8432(99.1)	73(0.9)
People infected with the COVID-19 do not infect others unless they have symptoms such as fever, cough, etc.	7697(90.5)	808(9.5)
People who have contacted COVID-19 patients must be isolated in an appropriate place for at least 14 days.	8368(98.4)	137(1.6)
Isolating and treating people infected with COVID-19 is an effective way of reducing the spread of the virus.	8363(98.3)	142(1.7)
There is a vaccine for the COVID-19	7299(85.8)	1206(14.2)
Children and young adults do not need to take measures to protect from the COVID-19	7768(91.3)	737(8.7)
The COVID-19 is transmitted from pets to humans.	6657(78.3)	1848(21.7)

#: Row

**Table 4.** Respondents' Attitudes about the COVID-19 (n=8505)

Variable	Yes n (%)*	No n (%)*	I Do not know n(%)*
I think the COVID-19 will be successfully controlled in Turkey	4696(55.2)	1782(21.0)	2027(23.8)
I think the COVID-19 will be successfully controlled in the whole world	3282(38.6)	2291(26.9)	2932(34.5)
I think that the COVID-19 will go away when the weather gets warmer	1115(13.1)	4731(55.6)	2659(31.3)
I may get the COVID-19 no matter how many measures I take if it is the call of fate	2983(35.1)	4002(47.1)	1520(17.9)
I believe hand hygiene and hygiene, in general, are essential in controlling the outbreak	8450(99.4)	20(0.2)	35(0.4)

#: Row

The difference in attitudes of respondents toward the COVID-19 was statistically significant when evaluated in terms of sex, age, education status, civil status, employment status, smoking status, province of residence, and presence of a household member aged  $\geq 65$  or 20 years or younger ( $p < 0.001$ ).

Men and people with primary education tended to believe in a higher percentage that the disease will be controlled in Turkey and worldwide eventually.

Respondents aged less than 65, respondents with low education levels, health workers, respondents living in other cities than İstanbul, and participants without chronic disease tend to have a stronger belief that getting the COVID-19 is the call of fate (Table 5).

The most commonly adopted practices to protect from the COVID-19 include hand hygiene (hand washing and using disinfectants), staying at home, and wearing masks outside (Figure 1).

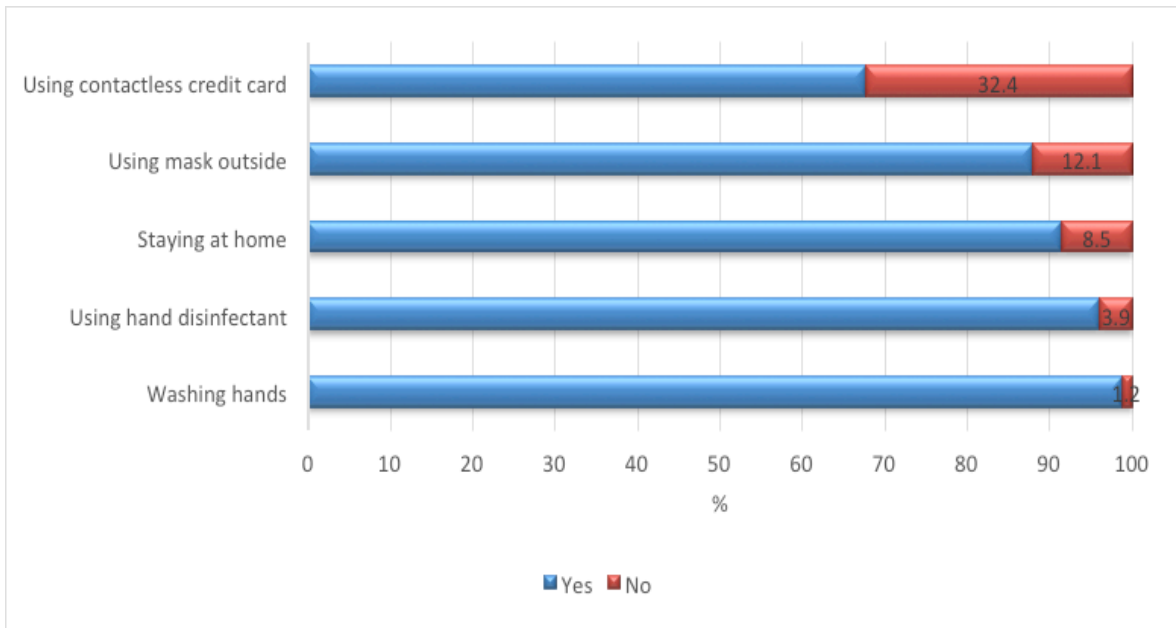
**Table 5.** Respondents' Attitudes towards the COVID-19 by Certain Characteristics (%)

	It will be controlled in Turkey	It will be controlled worldwide	It will go away when the weather gets warmer	I believe getting the disease is the call of fate	Hygiene rules are important
<b>Sex</b>					
Men	58.5	43.6	13.2	34.8	99.3
Women	53.0	35.2	13.0	35.3	99.4
p*	<0.001	<0.001	0.774	0.626	0.863
<b>Age</b>					
$\leq 20$	56.6	38.3	16.7	37.6	98.1
21-64	55.5	38.5	13.0	35.5	99.4
$\geq 65$	43.0	40.6	11.2	17.3	98.8
p*	0.003	0.806	0.113	<0.001	-
<b>Education Status</b>					
Primary School	72.6	45.4	24.3	52.5	96.4
Secondary School	59.5	40.8	16.0	39.5	99.1
University and higher	53.0	37.6	11.7	32.9	99.6
p*	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<b>Civil status</b>					
Married	57.6	39.4	13.9	35.2	99.5
Single	50.0	36.9	11.5	34.7	99.1
p*	<0.001	0.030	0.003	0.633	0.054
<b>Employment Status</b>					
Employed	56.8	38.6	12.6	36.0	99.6
Unemployed	52.5	38.5	14.0	33.5	99.0
p*	<0.001	0.930	0.053	0.022	0.002

**Table 5 (cont.).** Respondents' Attitudes towards the COVID-19 by Certain Characteristics (%)

	It will be controlled in Turkey	It will be controlled worldwide	It will go away when the weather gets warmer	I believe getting the disease is the call of fate	Hygiene rules are important
<b>Profession</b>					
Health worker	53.6	34.6	13.8	38.4	99.8
Other Profession	55.6	39.6	12.9	34.2	99.2
p*	0.310	<0.001	0.374	0.001	0.007
<b>Province of residence</b>					
İstanbul	41.8	32.5	10.5	28.2	99.3
Other	58.1	39.9	13.7	36.6	99.4
p*	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	0.918
<b>Smoking status</b>					
Yes	51.3	36.4	11.6	36.2	99.3
No	56.8	39.5	13.7	34.7	99.4
p*	<0.001	0.008	0.012	0.192	0.865
<b>Chronic disease</b>					
Yes	52.6	37.9	11.7	32.1	99.3
No	56.0	38.8	13.5	35.9	99.4
p*	0.008	0.505	0.034	0.002	0.632
<b>Is there a household member in the risky age group?</b>					
Both ≤20 and ≥65	55.5	39.9	14.1	37.0	99.5
One of the above risky age group	<b>57.9</b>	38.6	<b>13.9</b>	37.8	99.4
No household member in at-risk age group	<b>50.4</b>	38.2	<b>11.5</b>	<b>30.0</b>	99.3
p*	<0.001	0.756	0.007	<0.001	0.776

%; Row. \*P-values indicate column total. Bold: The difference between categories are evaluated by corrected p-value (Bonferroni method), and bolded cells denote a subset of row categories whose proportions differ significantly from each other at the 0.05 level.



**Figure 1.** Percentage Distribution of Practices of Respondents about Measures against the COVID-19 (n=8505)

The difference in practices of respondents was found to be statistically significant when evaluated in terms of sex, age, education status, civil status, employment status, smoking status, province of residence, and presence of a household member aged  $\geq 65$  or 20 years or younger ( $p < 0.05$ ).

Female respondents stayed at home more ( $p < 0.001$ ); the rate of wearing masks ( $p < 0.001$ ) was also higher among them, and they washed their hands more ( $p = 0.026$ ) than male participants.

From the perspective of age groups, respondents aged  $\leq 20$  and  $\geq 65$  stayed at home more, and those aged 21-64 and  $\geq 65$  years wore masks more than other participants ( $p < 0.001$ ). From the perspective of education status, the tendency to use masks outside was higher among university graduates than the primary school graduates ( $p = 0.002$ ), and using contactless credit cards were practiced lower among people with primary school level of education ( $p < 0.001$ ). Single respondents stay at home more than married participants ( $p < 0.001$ ). On the other

hand, the use of masks ( $p < 0.001$ ), hand washing ( $p < 0.001$ ), use of contactless credit cards ( $p < 0.001$ ), and using hand disinfectants ( $p = 0.033$ ) were more common among married respondents. Respondents that do not work were more attentive to staying at home and using masks outside ( $p < 0.001$ ) compared to participants that work, and the respondents that work use contactless credit cards and hand disinfectants ( $p < 0.001$ ) more than those who do not work. From the perspective of professions, respondents who are not health workers stay at home more ( $p < 0.001$ ), but the use of masks and contactless credit cards ( $p < 0.001$ ) is higher among health workers. Residents of İstanbul stay at home ( $p < 0.003$ ) and use contactless credit cards more ( $p < 0.001$ ). Non-smokers stay at home use masks outside ( $p < 0.001$ ) and contactless credit cards more than smokers ( $p = 0.016$ ). Respondents with chronic illnesses were more attentive to using masks than those without any chronic disease ( $p < 0.001$ ). The use of contactless credit cards is lower among respondents with a household member aged  $\leq 20$  and  $\geq 65$  years ( $p = 0.002$ ) (Table 6).



**Table 6.** Adopting the Right Practices about the COVID-19 by Certain Characteristics (%)

	Staying at home	Wearing masks outside	Washing hands	Using contactless credit cards	Using Hand Disinfectant
<b>Sex</b>					
Men	88.5	82.5	98.5	68.4	96.1
Women	93.5	91.5	99.0	67.0	96.1
p*	<0.001	<0.001	0.026	0.180	0.867
<b>Age</b>					
Aged 20 years and younger	98.7	81.4	95.5	62.1	95.5
Aged 21-65	91.0	88.0	98.9	67.8	96.1
Aged ≥65	98.4	91.2	98.8	66.3	97.2
p*	<0.001	<0.001	<0.001	0.094	0.579
<b>Education Status</b>					
Primary School	92.7	83.9	96.7	49.6	94.4
Secondary School	90.8	88.1	98.6	62.4	96.1
University and higher	91.5	88.1	99.0	70.0	96.2
p*	0.835	0.002	<0.001	<0.001	0.127
<b>Civil status</b>					
Married	90.9	89.1	99.1	69.4	96.4
Single	92.6	85.2	98.2	63.7	95.4
p*	0.013	<0.001	0.001	<0.001	0.033
<b>Employment Status</b>					
Employed	87.1	87.2	99.0	69.0	96.7
Unemployed	98.9	88.9	98.6	65.1	95.1
p*	<0.001	<0.001	0.095	<0.001	<0.001
<b>Profession</b>					
Health worker	81.3	91.1	99.2	74.7	96.8
Profession	94.0	87.0	98.7	65.8	95.9
p*	<0.001	<0.001	0.069	<0.001	0.098
<b>Province of residence</b>					
İstanbul	93.4	89.7	99.1	72.9	96.0
Other	91.0	87.5	98.8	66.4	96.1
p*	0.003	0.058	0.315	<0.001	0.859
<b>Smoking status</b>					
Yes	88.8	85.5	98.7	65.6	95.9
No	92.5	88.8	98.8	68.3	96.2
p*	<0.001	<0.001	0.713	0.016	0.491

**Table 6 (cont.).** Adopting the Right Practices about the COVID-19 by Certain Characteristics (%)

	Staying at home	Wearing masks outside	Washing hands	Using contactless credit cards	Using Hand Disinfectant
<b>Chronic disease</b>					
Yes	92.2	91.8	98.9	69.0	96.3
No	91.2	86.7	98.8	67.1	96.0
p*	0.182	<0.001	0.636	0.112	0.615
<b>Is there a household member in the risky age group?</b>					
Is there a household member aged 20 or younger?	90.7	87.7	98.7	66.5	95.6
Is there a household member aged ≥65?	92.3	89.9	98.9	65.3	97.4
Are there household members aged 20 years and younger and ≥65?	88.9	88.8	98.6	<b>62.0</b>	96.9
No household member in the at-risk age group	91.8	87.2	99.0	69.3	96.4
P*	0.072	0.636	0.630	0.002	0.182

#: Row. \*P-values indicate column total. Bold: The difference between categories is evaluated by corrected p-value (Bonferroni method), and bolded cells denote a subset of row categories whose column proportions differ significantly from each other at the 0.05 level.

## DISCUSSION

The female-male ratio in our study was higher. The employment status also reflected the general situation in the country; the number of employed men was higher than that of female participants (16). Likewise, smoking prevalence was higher among men than women, consistent with the data from the Turkish Tobacco Atlas (17). The overall education level of the respondents was higher than the Turkey average. This was most likely because the survey was conducted online, and respondents had to use smartphones and computers.

More than 90% of the respondents correctly answered 8 of the knowledge questions. The researchers also think that the increasing number

of epidemiological studies and the emergence of reliable information from December to the day (that this study started) helped to raise the knowledge level of the public in the country. Another critical factor is that this study was conducted one month after the pandemic announcement and the first case in Turkey. Similarly, a survey in the Netherlands showed an increase in knowledge levels in time (18).

90.5% of the participants correctly answered the question “People infected with the novel coronavirus do not infect others unless they have symptoms such as fever cough, etc.” and 91.3% correctly answered the statement “Children and young adults do not need to take measures to protect from the COVID-19”. The rates of the correct response to these questions in a similar study in the US were 79.3% and 84.9%,

respectively (19). Besides other reasons, the overall high level of education seems to explain the high knowledge level among respondents. Because the knowledge level increases in proportion to the level of education, this was the case in a study in Egypt, too (21). There was no statistically significant difference between the sexes in our study, even though many studies in the literature suggest a higher knowledge level among female participants (20, 22).

Moreover, the difference between health workers and other professions was not statistically significant in responding to the questions on “the symptoms of the disease and isolation of contacts.” Health workers were relatively well informed about it because Turkey engaged in extensive public information activities in the period of one month from the first confirmed case until the time of our survey. One could suggest that the Ministry of Health in particular and local administrations, CSOs, professional organizations, and the media generally increased efforts to raise public awareness in the said period of time.

The rate of the correct response to the knowledge statements “There is a vaccine for the COVID-19” and “The COVID-19 is transmitted from pets to humans” was below 90%. The possible reason for this is that information about the vaccine and transmissibility of pets is still somewhat unclear.

55.2% of respondents thought that the disease would be taken under control in Turkey, and 38.6% believed it would eventually be controlled worldwide. This rate was higher in a Chinese study (20). The likely reason for this is that WHO had not announced the disease a pandemic back then, and people mostly believed that its spread would remain limited. In our study, respondents with higher education status believed that the pandemic would not be taken under control.

Fatalism is known to be associated with a lack of measures and taking risks. A high level of fatalism reduces efforts for having information and taking measures among patients of cancer and similar

diseases and increases risk-taking among adolescents (23, 24). Fatalism was included as an aspect of our survey because fatalistic attitudes in Turkey are an essential factor in health. In our study, the fatalistic attitude was significantly higher among female respondents. Similarly, a study among university students found that fatalistic attitudes were considerably higher among female students (25). This leads one to think that women have more fatalistic tendencies in general.

Although they are optimistic in general, the respondents do not think the disease will disappear when the weather gets warmer. This is possible because there are COVID-19 cases in warm climates, including African countries (26). In contrast, health workers have a stronger belief that the disease will go away when the weather gets warmer, and they display more fatalistic attitudes.

Again, non-smokers were more optimistic than smokers that the disease will be taken under control, and it will disappear when the weather gets warmer. Smokers and respondents with chronic illnesses seemed to be more worried. Married respondents and participants with someone aged 20 or younger in the household were more hopeful.

The tendency to believe that getting the disease is the call of fate and that the disease will be controlled in Turkey and worldwide gets lower as the education level increases. On the other hand, the importance attached to hygiene increases parallel to the level of education. The fact that the majority of respondents think hand hygiene and hygiene, in general, are important in outbreak control is consistent with the results of a Hong Kong study on avian influenza, where the majority of participants thought active personal hygiene measures reduced the flu risk (27). A knowledge and attitude survey of health workers in Vietnam found that the majority of respondents correctly believed that washing hands is effective in preventing transmission (28).

In our study, the most commonly practiced

preventive measure was “handwashing”. A study in Turkey indicates that 61.6% of the population wash their hands more than ten times a day. Moreover, 78% believe that washing hands is very important in preventing diseases (29). The fact that 99% of the respondents in our survey thought that hand washing is important indicates that washing hands is indeed the most crucial measure in protecting from the disease. This also shows the importance and effectiveness of public awareness to throw media and other channels. In our survey, “using contactless credit cards” ranked the lowest among the inquired protective measures. This is possible because contactless credit cards are not commonly used in Turkey.

87.9% of the respondents wear masks. This rate is lower compared to some countries (98%) and higher when compared to others (24%) (19, 20). The researchers also think that using masks could be affected by sociocultural differences in the countries and time of a given survey. Because mask use became widespread and mandatory in different countries at different times, another potential factor is the difficulty of getting masks. Furthermore, the US study was conducted before the recommendations of the WHO and CDC about mask use. The survey in Turkey was conducted after wearing masks became mandatory in Turkey. This could explain the difference between the surveys. Initially, masks were recommended for patients and contacts alone. Today, however, people are urged to wear masks in public areas (30, 31). CDC has recently recommended that cloth masks could be used to cover the face (32). The US study was conducted on 17 March.19 However, the Turkish Ministry of Interior announced mandatory use of masks when visiting marketplaces, grocery stores, and public workplaces on 3 April 2020, and our study was conducted on 11-21 2020. The researchers believe that this rule affected public behavior and the responses to the survey (33).

The rate of staying home was higher among respondents aged 20 or younger and  $\geq 65$  as both

groups were already subject to a curfew by the time our survey was collecting data. In addition, attention to other practices (including using masks, washing hands, and using hand disinfectants etc) increases in older respondents.

This is consistent with our study: women, older respondents, and participants with higher education levels better observe preventive practices. Cross-sectional studies on SARS in Singapore and Hong Kong suggested similar results (34, 35). However, no association was found between these factors and preventive methods in the Dutch study (36).

Similar to the literature, our survey found lower compliance with measures among smokers compared to non-smokers (37). Smoking is an overall risk for health, and it is expected to be a risk factor for the COVID-19.

Compliance with the measures was higher among respondents with chronic illnesses than those without any chronic condition. This was particularly true for using masks. The researchers think that an underlying chronic disease raises concerns and sensitivity, resulting in better compliance with preventive measures. A study in Canada suggested that respondents who feel more at risk of SARS took more measures. This is consistent with our study (38).

## LIMITATIONS

Given the extraordinary circumstances of the pandemic, the survey conducted online through social media platforms as the possibility of a national sampling survey using face-to-face interviews was precluded due to the measures and the social distancing rule in the country. This result may have been obtained due to the higher education and health literacy levels of the participants compared to the general population. In addition, the number of female participants in our study is higher than that of men, and they are weak in representing the general population.

## CONCLUSION

In times of public health threats such as pandemics, the prudence, strategies, and interventions of countries have a substantial effect on the knowledge, attitudes, and practices of the population. In Turkey, the first case was detected later than in other countries, and this was helpful in using the experience of others. The political measures were supported by intervention programs by the mass media in order to guide the knowledge, attitudes, and practices of the public.

Although our survey, which was conducted one month after the first case was confirmed, was limited to online media, it has nevertheless reached out to a significant number of respondents in the pandemic conditions. The findings of the survey suggest that the population is sufficiently informed about the COVID-19. This underlines the importance of informing people using mass media. The survey shows that this has been adequately done in the country. Mass media is crucial in raising the health literacy of

the population, particularly in times of emergencies that threaten public health.

Our results suggest that interventions aiming to change the knowledge, attitude, and practices of the public should consider social determinants of health, including education level, employment status, and religious beliefs.

Besides knowledge, other positive factors include country-wide restrictions (curfew on holidays, curfew imposed on specific age groups, mandatory use of masks in public areas, etc.) and enabling interventions (distributing free masks, paid and unpaid leave for employees, etc.). Our study found a high level of compliance with the measure of staying at home. In times of public health threats, therefore, informing the population needs to be supported with enabling conditions and a number of mandatory practices.

As a result, it is necessary to repeat studies on knowledge, attitudes, and practices of the population regularly in times of pandemics in order to identify gaps and develop timely recommendations.

## REFERENCES

1. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*, 2020;382(13):1199-207.
2. Chan JFW, Yuan S, Kok KH, To KKW, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*, 2020;395(10223):514-23.
3. Kang M, Wu J, Ma W, He J, Lu J, Liu T, et al. Human-to-human transmission of 2019-novel coronavirus (2019-nCoV). *medRxiv*, 2020; published online Jan 1. DOI:2020.02.03.20019141.
4. Modes of transmission of virus causing COVID-19: implications for IPC precaution recommendations. <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations> (accessed May 6,2020).
5. World Health Organization (WHO). Novel coronavirus (2019-nCoV). Situation report. [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200207-sitrep-18-ncov.pdf?sfvrsn=fa644293\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200207-sitrep-18-ncov.pdf?sfvrsn=fa644293_2) (accessed May 6,2020).
6. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 2020;323(11):1061-9.
7. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020;395(10223):497-506.
8. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020;395(10223):507-13.
9. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2020;395(10229):1054-62.
10. Bai Y, Yao L, Wei T, Tian F, Jin D-Y, Chen L, et al. Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *JAMA*, 2020;323(14):1406-7.
11. Lai CC, Liu YH, Wang CY, Wang YH, Hsueh SC, Yen MY, et al. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *J Microbiol Immunol Infect*, 2020; published online Mar 4. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.02.012>.
12. Rothe C, Schunk M, Sothmann P, Bretzel G, Froeschl G, Wallrauch C, et al. Transmission of 2019-NCOV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N Engl J Med*, 2020;382(10):970-1.
13. CDC. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), How to Protect Yourself &Others. 2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/prevention.html> (accessed May 7,2020).
14. Turkish Ministry of Health. COVID-19 (SARS-Cov-2 Infection) Guide, Scientific Committee. 2020. [https://covid19bilgi.saglik.gov.tr/depo/rehberler/COVID-19\\_Rehberi.pdf](https://covid19bilgi.saglik.gov.tr/depo/rehberler/COVID-19_Rehberi.pdf) (accessed May 5, 2020).
15. Turkish Ministry of Health. 14 Rules to Counter the Novel Coronavirus Risk, 2020. [https://covid19bilgi.saglik.gov.tr/depo/afisler/Halk/COVID-19\\_14\\_KURAL\\_AFIS\\_50X70.pdf](https://covid19bilgi.saglik.gov.tr/depo/afisler/Halk/COVID-19_14_KURAL_AFIS_50X70.pdf) (accessed May 6, 2020).
16. Türkiye İstatistik Kurumu. İstatistiklerle Kadın, 2019. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=33732> (accessed May 2,2020).
17. The Tobacco Atlas, Turkey, 2015. <https://tobaccoatlas.org/country/turkey/> (accessed May 2,2020).

18. Bults M, Beaujean DJMA, de Zwart O, Kok G, van Empelen P, van Steenberghe JE, et al. Perceived risk, anxiety, and behavioural responses of the general public during the early phase of the Influenza A (H1N1) pandemic in the Netherlands: results of three consecutive online surveys. *BMC Public Health*, 2011;11(1):2.
19. Clements JM. Knowledge and behaviors toward COVID-19 among U.S. residents during the early days of the pandemic. *medRxiv*, 2020; published online April 2. <https://doi.org/10.1101/2020.03.31.20048967> (preprint).
20. Zhong B-L, Luo W, Li H-M, Zhang Q-Q, Liu X-G, Li W-T, et al. Knowledge, attitudes, and practices towards COVID-19 among Chinese residents during the rapid rise period of the COVID-19 outbreak: a quick online cross-sectional survey. *Int J Biol Sci*, 2020;16(10):1745-52.
21. Abdelhafiz AS, Mohammed Z, Ibrahim ME, Ziady HH, Alorabi M, Ayyad M, et al. Knowledge, Perceptions, and Attitude of Egyptians Towards the Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *J Community Health*, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10900-020-00827-7>.
22. AlDowyan N, Abdallah AS, El-Gharabawy R. Knowledge, Attitude and Practice (KAP) Study about Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) among Population in Saudi Arabia. *Int Arch Med*, 2017;10 (254):1-12.
23. Ramírez AS. Fatalism and Cancer Risk Knowledge Among a Sample of Highly Acculturated Latinas. *J Cancer Educ*, 2014;29(1):50-5.
24. Haynie DL, Soller B, Williams K. Anticipating early fatality: friends', schoolmates' and individual perceptions of fatality on adolescent risk behaviors. *J Youth Adolesc*, 2013;43(2):175-92.
25. Kaya A, Bozkur B. Kadercilik Eğitimi İle Özyeterlik İnancı ve Savunma Mekanizmaları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. *Ege Eğitim Derg*, 2017;18(1):124-45
26. Euronews. Covid-19 salgını sıcak kıta Afrika'da 46 ülkeye yayıldı, virüs Avrupa'dan geldi, 2020. <https://tr.euronews.com/2020/03/30/covid-19-salg-n-s-cak-k-ta-afrika-da-46-ulkeye-yay-ld-virus-avrupa-dan-geldi> (accessed May 5, 2020).
27. Chan EYY, Cheng CKY, Tam G, Huang Z, Lee P. Knowledge, attitudes, and practices of Hong Kong population towards human A/H7N9 influenza pandemic preparedness, China, 2014. *BMC Public Health*, 2015;15(1):943.
28. Giao H, Le An P, Thi Ngoc Han N, Van Khanh T, Kim Ngan V, Van Tam V. Knowledge and attitude toward COVID-19 among healthcare workers at District 2 Hospital, Ho Chi Minh City. *Asian Pac J Trop Med*, 2020;13(March):6-11
29. Turkish Ministry of Health. Survey on Hand Washing in Turkey, Ankara, 2012. [https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/elyika\\_tr.pdf](https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/elyika_tr.pdf) (accessed May 3, 2020).
30. Critically Important Antimicrobials For Human Medicine. Geneva: World Health Organization. 6th ed. 2018. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf>, Date Accessed: 07.06.2017
31. HASUDER Yeni Koronavirüs (COVID-19) Haber Postası (06.04.2020) - Yeni Koronavirüs Hastalığı 2019. <https://korona.hasuder.org.tr/hasuder-yeni-koronavirus-covid-19-haber-postasi-06-04-2020/> (accessed May 4, 2020)
32. CDC. Recommendation Regarding the Use of Cloth Face Coverings, Especially in Areas of Significant Community-Based Transmission, 2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/cloth-face-cover.html> (accessed May 4,2020).
33. Turkish Ministry of Interior. Şehir Giriş/Çıkış Tebirleri ve Yaş Sınırlaması, 2020. <https://www.icisleri.gov.tr/sehir-giriscikis-tebirleri-ve-yas-sinirlamasi> (accessed May 3,2020).

34. Quah SR, Hin-Peng L. Crisis prevention and management during SARS outbreak, Singapore. *Emerg Infect Dis*, 2004;10(2):364-8.
35. Lau JTF, Yang X, Tsui H, Kim JH. Monitoring community responses to the SARS epidemic in Hong Kong: From day 10 to day 62. *J Epidemiol Community Health*, 2003;57(11):864-70.
36. Rugarabamu S, Byanaku A, Ibrahim M. Knowledge, attitudes, and practices (KAP) towards COVID-19: A quick online cross-sectional survey among Tanzanian residents. *medRxiv*, 2020; published online May 1. <https://doi.org/10.1101/2020.04.26.20080820>.
37. Tyas SL, Pederson LL. Psychosocial factors related to adolescent smoking: A critical review of the literature. *Tob Control*, 1998;7(4):409-20.
38. Maunder R, Hunter J, Vincent L, Bennett J, Peladeau N, Leszcz M, et al. The immediate psychological and occupational impact of the 2003 SARS outbreak in a teaching hospital. *Cmaj*, 2003;168(10):1245-51.



# Identification of enterococci by MALDI-TOF-MS & 16S rRNA sequencing isolated from squeezed cheeses and evaluation of antibiotic susceptibility and antibacterial activity

Sıkma peynirlerden izole edilen enterokokların MALDI-TOF-MS ve 16S rRNA sekanslama ile tanımlanması ve antibiyotik dirençlilikleri ile antibakteriyal aktivitelerinin değerlendirilmesi

Furkan AYDIN<sup>1</sup>, Halil İbrahim KAHVE<sup>1</sup>, Mustafa ARDIÇ<sup>1</sup>, İbrahim ÇAKIR<sup>2</sup>

## ABSTRACT

**Objective:** This study aims to identify enterococci isolated from squeezed cheeses by MALDI-TOF-MS and 16S rRNA sequence analysis and to evaluate antibiotic resistance and antibacterial effects of these isolates against some food pathogens.

**Methods:** Identification of 84 *Enterococcus* isolates obtained from squeezed cheese was carried out using MALDI-TOF-MS and 16S rRNA gene sequencing. The isolates were tested for resistance to 14 different antibiotics by the disc diffusion method. The antimicrobial effects of isolates against various food pathogens were determined by the agar spot test. SPSS 22.0.0 software (SPSS Inc., Chicago, USA) was used for the assessment of the correlation between variance analysis (ANOVA, F test) and antibacterial results.

**Results:** As a result of sequence analysis; 33 (39.3%) were described to *E. faecalis*, 29 (34.5%) to *E. faecium*, 14 (16.7%) to *E. durans*, 4 (4.8%) to *E. gallinarum*, 3 (3.5%) to *E. casseliflavus* and 1 (1.2%) to *E. thailandicus*. Eighty-one isolates gave the same identification result as the MALDI-TOF-MS method (96.43%). The difference

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, sıkma peynirlerden izole edilen enterokokların MALDI-TOF-MS ve 16S rRNA sekans analizleri kullanılarak tanımlanması ve bu izolatların antibiyotik dirençleri ile bazı gıda patojenlerine karşı antibakteriyel etkilerinin değerlendirilmesidir.

**Yöntem:** Sıkma peynirlerden elde edilen 84 *Enterococcus* izolatının MALDI-TOF-MS yöntemi ile tanımlanması yapılmış ve 16S rRNA bölgeleri çoğaltılarak sekanslanmıştır. İzolatların 14 farklı antibiyotiğe karşı dirençlilikleri disk difüzyon yöntemiyle incelenmiştir. Ayrıca izolatların çeşitli gıda patojenlerine karşı gösterdikleri antibakteriyel etkileri agar spot testi ile belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirme için varyans analizi (ANOVA, F testi) ve antibakteriyel sonuçlar arasındaki korelasyonun tespiti için SPSS 22.0.0 yazılımı (SPSS Inc., Chicago, ABD) kullanılmıştır.

**Bulgular:** Seksen-dört izolat 16S rRNA sekans analizi sonucunda; 33 (%39.3) *E. faecalis*, 29 (%34.5) *E. faecium*, 14 (%16.7) *E. durans*, 4 (%4.8) *E. gallinarum*, 3 (%3.5) *E. casseliflavus* ve 1 (%1.2) *E. thailandicus* olarak tanımlanmıştır. Seksen bir izolat MALDI-TOF-MS yöntemi ile aynı tanımlama sonucunu vermiştir (%96.43). İzolatların

<sup>1</sup>Aksaray University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department, Aksaray

<sup>2</sup>Bolu Abant İzzet Baysal University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department, Bolu



İletişim / Corresponding Author : Halil İbrahim KAHVE

Aksaray University, Food Engineering Department 68100 Aksaray - Türkiye

E-posta / E-mail : hibrahimkahve@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 21.01.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 03.06.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.92332

Aydın F, Kahve Hİ, Ardiç M, Çakır M. Identification of enterococci by MALDI-TOF-MS & 16S rRNA sequencing isolated from squeezed cheeses and evaluation of antibiotic susceptibility and antibacterial activity. Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 399-412

between two identification methods has not been found to be statistically significant ( $p>0.05$ ); however, MALDI-TOF-MS has some advantages over 16S rRNA sequencing, such as being less labor-intensive, more economical and faster. In total, 83.3% of the strains exhibited multidrug-resistant phenotypes. A high incidence of resistance was detected for nalidixic acid, oxacillin, and streptomycin. *E. faecalis* isolates were found to show lower sensitivity to antibiotics tested than *E. faecium* ( $p < 0.05$ ). The anti-listerial effect of *E. faecalis* was determined among all enterococcal isolates ( $p < 0.05$ ). Along with this, a strong correlation was found between *L. innocua* and *L. monocytogenes* inhibition. The results of antibacterial activity revealed that enterococci are more effective for the inhibition of Gram-positive food pathogens.

**Conclusion:** The correlation between the results from the two identification methods showed that MALDI-TOF-MS is a fast, economical, robust, and reliable method for the characterization of enterococci. When the results were examined in terms of food safety, it was observed that squeezed cheese produced from raw milk without using starter culture was reservoirs of *Enterococcus* spp. with multiple antibiotic resistance. Enterococci, which does not carry multiple antibiotic resistance, can be used in starter culture combinations and in hurdle technology to prevent the growth of Gram-positive food pathogens; however, to this end, virulence determinants must be determined to achieve these goals.

**Key Words:** Food, *Enterococcus*, MALDI, sequencing, antibiotic resistance

tanımlanmasında kullanılan iki tanımlama yönteminin arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Ancak MALDI-TOF-MS yönteminin daha az iş gücü gerektirmesi, ekonomik ve hızlı olması gibi bazı avantajlarının olduğu görülmüştür. İzolatların %83.3'ünün çoklu antibiyotik direnci taşıdığı tespit edilmiştir. İzolatların nalidiksik asit, oksasilin ve streptomisine karşı dirençliklerinin yüksek olduğu saptanmıştır. *E. faecalis* suşlarının kullanılan antibiyotiklere karşı *E. faecium*'dan daha düşük duyarlılık gösterdiği bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Tüm enterokok izolatları içerisinde *E. faecalis*'in anti-listerial etkisi belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Bununla birlikte, *L. innocua* ve *L. monocytogenes* inhibisyonu arasında güçlü bir korelasyon saptanmıştır. Antibakteriyel aktivitenin sonuçları incelendiğinde, izolatların gıda patojeni olan Gram-pozitif bakterilere karşı inhibasyon etkilerinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

**Sonuç:** İki tanımlama yönteminden elde edilen sonuçlar arasındaki korelasyon MALDI-TOF-MS'nin enterokokların karakterizasyonu için hızlı, ekonomik, sağlam ve güvenilir bir yöntem olduğunu göstermiştir. Sonuçlar gıda güvenliği açısından incelendiğinde, starter kültür kullanılmadan direkt olarak çiğ süttten üretilen sıkma peynirlerin çoklu antibiyotik direnci taşıyan enterokok rezervuarları olduğu görülmüştür. Çoklu antibiyotik direnci taşımayan enterokoklar, peynir üretim teknolojisindeki başlangıç kültürü kombinasyonlarında, engel teknolojileri bağlamında ise Gram-pozitif gıda patojenlerinin gelişmesini engellemek için kullanılabilir, ancak bu amaca ulaşabilmek için virülans determinantlarının belirlenmesi gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Gıda, *Enterococcus*, MALDI, sekanslama, antibiyotik direnci

## INTRODUCTION

Enterococci are complex and essential members of lactic acid bacteria (LAB). Owing to their strong adaptability and resistance to extreme environmental conditions, they are ubiquitously found in nature, mostly in the gastrointestinal tracts of mammals as well as soil, water, and some of the food products, especially those of animal origin (1). It was assumed that the presence of enterococci in dairy products occurred due to inadequate hygiene practices as a consequence of solely direct fecal contamination (2). The Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 'on microbiological criteria for foodstuffs' declares that enterococci in food is not always due to fecal contamination and therefore sets no limit for their presence in foods (3). They play significant roles during the fermentation of cheese products by enhancing the organoleptic characteristics generally by proteolysis, lipolysis, and citrate metabolism (4). They are also known to produce bacteriocins, so-called enterocins, which inhibit the growth of some food spoilage and pathogenic bacteria comprising *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* (5). Because of the ability to be used as adjunct or co-culture, they have comprehensively been studied for possessing beneficial properties in different foods, especially in traditional raw milk cheeses (1).

Enterococci are not assumed as GRAS (Generally Recognized as Safe) unlike most of other LAB. The European Food Safety Authority did not recommend them in the QPS (Qualified Presumption of Safety) approaches (6). On the other hand, they are considered to be opportunist pathogens and are often associated with hospital-acquired infections. Because some of the species may be intrinsically resistant to some antibiotics and show the ability to acquire, accumulate, and transfer their plasmids encoding antimicrobial resistance genes or virulence traits to several food pathogens by horizontal gene transfer (7).

Enterococci can be found in raw milk as a consequence of direct or indirect fecal contamination, and due to their ability to resist extreme environmental conditions, they can survive through the cheese-making process and ripening (1). The researchers reported that enterococci populations in cheeses produced from raw milk might vary between  $10^4$  -  $10^6$  cfu/g and  $10^5$  -  $10^7$  cfu/g in curd and during ripening, respectively (8). Traditional 'sikma/squeezed' cheeses are manufactured using raw milk (from raw sheep's or cows' milk or mixtures of these milks) coagulated with artisanal animal rennet without starter culture addition. Then the curd is pressed by using heavy stones before scalding at high temperatures. Scalded curd is molded by squeezing with the hand before ripening (9). Although squeezed cheese resembles 'traditional Sicilian cheeses', they differ in shaping and ripening processes. To date, *Enterococcus* spp. isolated from squeezed cheese samples have not been deeply investigated regarding their antibiotic and antimicrobial susceptibility.

For the identification of enterococci, traditional or molecular methods, in which 16S rRNA region of ribosomal DNA is amplified or species-specific primers are used without additional sequence knowledge, have been widely used so far (10). Since traditional methods take time as well as giving indecisive results, and molecular methods are expensive and require trained laboratory staff, alternative methods have been developed. Such as Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) in which protein signatures of each microorganism is characterized and then compared to a reference spectrum with a succession log score ranging from 0.000 - 3.000 (11).

Based on the considerations mentioned above, this study aims to identify enterococci isolated from squeezed cheeses by MALDI-TOF-MS and 16S rRNA sequence analysis, to evaluate antibiotic resistance of the isolates to various clinically significant

antibiotics, and to determine their inhibition against different food pathogens.

## MATERIAL and METHOD

### Bacterial strains

The study has been conducted in Aksaray University and Abant İzzet Baysal University Food Microbiology laboratories in the summer of 2019. Eighty-four *Enterococcus* isolates were supplied by Aydin and Ardic (12) where detailed information of isolation sources were given. The isolates were identified on the species level by MALDI-TOF-MS (Bruker, Germany) as described before (12). Briefly, single colonies were smeared onto target polished steel plate (MSP 384; Bruker Daltonik GmbH, Karlsruhe, Germany), and overlaid with 2 µL α-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix solution in acetonitrile (Sigma-Aldrich):ddH<sub>2</sub>O:TFA (Sigma-Aldrich) (50:47.5:2.5, v/v). After crystallization, MALDI plate was inserted into Microflex TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany) equipped with an N<sub>2</sub> laser. The mass range used was 2.000-20.000 m/z. The MALDI-TOF mass spectra were analyzed with MALDI-bioTyper 3.0 software (Bruker Daltonics, Karlsruhe, Germany) with a laser intensity of 50 Hz. Results were recorded as log scores. Score values between 2.300-3.000 were

evaluated to be true species identification, 2.000-2.300 were secure genus identification, but probable species identification, 2.000-3.000 were probable genus identification. A list of identified strains to have been used in the present study is in Table 1.

### Molecular identification of the strains

The total DNA of the strains was extracted from overnight cultures in Tryptic Soy Broth (Merck, Germany) (TSB) following the protocol provided by Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). The DNA concentration was evaluated spectrophotometrically by NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). Finally, the DNA of the strains were stored at -20 °C until used as templates for amplification.

The DNA templates were used to amplify the 16S rRNA region. Amplification was performed as reported, using the forward primer (Amp-F) 5'-GAG AGT TTG ATY CTG GCT CAG-3' and reverse primer (Amp-R) 5'- AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA-3' (Y is C or T; R is A or G). PCR mixture contained 1 µL of template DNA, 10 µL 5× PCR buffer, 0.4 µL dNTPs, 1 µL of 20 mM primers FP and RP, 0.25 µL 5 U Taq polymerase and sterile ddH<sub>2</sub>O up to 50 µL of total volume. The reaction was performed with the following program: 95 °C for 2 min, 20 cycles of 95 °C

**Table 1.** Bacterial strains previously identified by MALDI-TOF-MS

<i>Enterococcus</i> spp.	Number of isolates
<i>Enterococcus faecalis</i>	32
<i>Enterococcus faecium</i>	31
<i>Enterococcus durans</i>	13
<i>Enterococcus gallinarum</i>	4
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	3
<i>Enterococcus thailandicus</i>	1
<b>Total</b>	<b>84</b>

for 30 s, 55 °C for 20 s, and 72 °C for 30 s with a final extension of 72 °C for 5 (13). The PCR products were purified using a GeneJET PCR purification kit (Thermo Scientific, USA) and analyzed on 1.2% agarose gel electrophoresis to check the amplification. Then the amplicons were sent to Soygen Biotechnology (Istanbul, Turkey) for sequencing. The sequence data were analyzed and performed via BLAST search in the GenBank database to identify the closest available reference sequences in the complete National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide collection (14). Accordingly, the accession numbers of the isolates submitted to NCBI are MK962023 through MK962106. The 16S rRNA sequences of the strains were arranged using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 7.0 software. Phylogenetic trees were constructed using the Neighbor-Joining (NJ) method with 1000 bootstrap replicates (15).

### Antibiotic susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility tests were performed by the disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (16). For this purpose, clinically significant antibiotics were spotted on Muller-Hinton Agar (Merck, Germany). These include; ampicillin (10 µg), penicillin (10 µg), teicoplanin (30 µg), vancomycin (30 µg), gentamycin (120 µg), streptomycin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), tetracycline (30 µg), erythromycin (15 µg), nalidixic acid (30 µg), norfloxacin (10 µg), oxacillin (1 µg) and rifampin (5 µg) (Bioanalyse, Turkey). Then the plates were incubated aerobically at 37 °C for 24 h. According to diameter of the inhibition zone, strains were categorized as susceptible, intermediate, or resistant by taking into account the criteria of the CLSI (16).

### Growth inhibition of bacterial pathogens

An agar spot test was performed as described elsewhere (17) with minor modifications. Briefly, overnight cultures ( $10^6$  cfu/mL) of each isolate to be tested were spotted onto the surface of Tryptic Soy

Agar (TSA) (Merck, Germany) (containing 1.5%, w/v, agar) and incubated for 24 h at 37 °C. The pathogenic bacteria, which are *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *L. innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were inoculated into 8 mL of TSA (containing 0.7%, w/v, agar) at a final concentration of approximately  $5 \times 10^6$  cfu/mL and poured over the plate on which the potentially antimicrobial producer strain was grown. After incubation for 16-24 h at 37 °C, the diameter of the inhibition zone has been measured. Accordingly, 5-10 mm inhibition zone was evaluated as strong inhibition (++), whereas inhibition zone between 1-5 mm were assessed to be weak inhibition (+). No-diameter zone was evaluated to be no-inhibition as negative (-).

### Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA, F test) to compare identification methods, and the correlation between antibacterial results was performed using SPSS 22.0.0 software (SPSS Inc., Chicago, USA) to analyze between groups. The level of significance of differences between treatments was determined at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Among 84 enterococcal strains: 33 (39.3%) were ascribed to *E. faecalis*, 29 (34.5%) to *E. faecium*, 14 (16.7%) to *E. durans*, 4 (4.8%) to *E. gallinarum*, 3 (3.5%) to *E. casseliflavus* and 1 (1.2%) to *E. thailandicus*. Comparing to MALDI-TOF-MS results, only three isolates have been characterized differently as a result of 16S rRNA sequencing, as indicated in Table 2. The difference between the two identification methods has not been found to be statistically significant ( $p > 0.05$ ).

Figure 1. represents the MEGA 7.0 alignments of the 16S rRNA genes of genetically close and distinct enterococcal strains indicating their phylogenetic relationship with the formation of different subgroups. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The analysis involved 84 nucleotide sequences. The cluster

alignments analysis indicates that *E. faecalis* differs from all other five species in a different cluster. *E. thailandicus* differs from *E. durans* with a number of nucleotides substitution, however, these two species

were clustered within the same subgroup. Similar to the relationship between *E. faecium* and *E. durans*, *E. casseliflavus*, and *E. gallinarum* strains stay close to each other, as well.

Table 2. Comparative identification results of the strains which differ in two methods

Isolate	MALDI score	MALDI-TOF-MS	16S rRNA Sequencing
AU11	2.090	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i>
AU24	2.165	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>
AU45	2.127	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecalis</i>

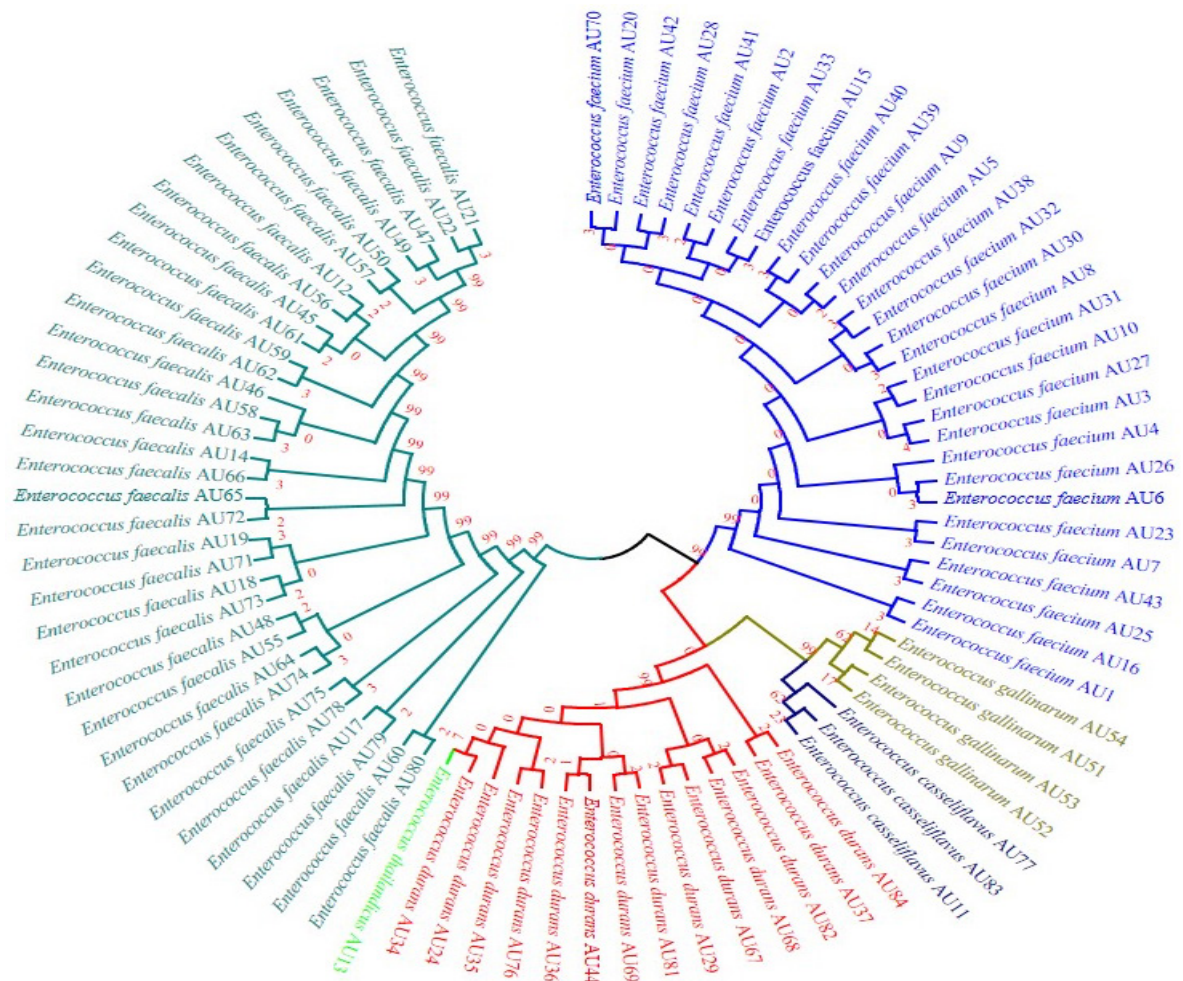


Figure 1. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method

Numbers on the branches represent bootstrap values obtained from 1000 bootstrap replications

The results of antibiotic susceptibility testing, according to CLSI, are summarized as percentages of strains showing resistance (R), intermediate resistance (I) and no-resistance (S) in Table 3. Accordingly, analysis of the antimicrobial susceptibility of the 84 Enterococcus isolates revealed that all of the strains were found to be resistant to nalidixic acid (100.0%), which is followed by oxacillin (83.3%) and streptomycin (79.8%). On the other hand, all strains were assessed to be susceptible to norfloxacin. Along with this, *E. faecium* strains were more resistant to  $\beta$ -lactam group antibiotics than other species. Among glycopeptides, a minimal amount of strains (n=3)

showed intermediate-resistance to teicoplanin, while most of *E. faecalis* strains (93.9%) displayed either intermediate or strict resistance to vancomycin.

On the other hand, 62.1% of *E. faecium* strains were found to be susceptible to vancomycin. Among aminoglycosides, especially strains of *E. faecalis* (90.9%) and *E. faecium* (79.3%) exhibited more resistance to streptomycin rather than gentamycin. Furthermore, *E. faecalis* strains were assessed to be more resistant to chloramphenicol, tetracycline, and rifampin than others. Additionally, low frequencies of resistance (n= 6) have been detected to ciprofloxacin among all strains.

**Table 3.** Antimicrobial resistance profiles of enterococci against tested antibiotics (%)

Antibiotic	<i>E. faecalis</i> (n = 33)			<i>E. faecium</i> (n = 29)			<i>Enterococcus</i> spp.* (n = 22)			Total (n = 84)		
	S**	I**	R**	S	I	R	S	I	R	S	I	R
<b><i>B-lactams</i></b>												
Ampicillin	87.9	-	12.1	58.6	-	41.4	77.3	-	22.7	73.8	-	26.2
Penicilin	100	-	-	44.9	24.1	31.0	100	-	-	80.9	8.4	10.7
<b><i>Glycopeptides</i></b>												
Teicoplanin	93.9	6.1	-	96.5	3.5	-	100	-	-	96.4	3.6	-
Vancomycin	6.1	63.6	30.3	62.1	17.2	20.7	81.8	9.1	9.1	44.1	34.5	21.4
<b><i>Aminoglycosides</i></b>												
Gentamycin	60.4	15.2	24.4	34.3	17.4	48.3	9.1	18.2	72.7	38.1	16.7	45.2
Streptomycin	-	9.1	90.9	6.9	13.8	79.3	13.7	22.7	63.6	5.9	14.3	79.8
<b><i>Quinolones</i></b>												
Ciprofloxacin	75.8	15.2	9	75.9	17.2	6.9	95.5	-	4.5	80.9	11.9	7.2
<b><i>Amphenicols</i></b>												
Chloramphenicol	15.1	15.1	69.8	48.3	10.3	41.4	45.5	4.5	50.0	35.7	9.5	54.8
<b><i>Tetracyclines</i></b>												
Tetracycline	6.1	39.4	54.5	62.1	13.8	24.1	50	45.5	4.5	36.9	28.6	34.5
<b><i>Macrolides</i></b>												
Erythromycin	24.3	24.2	51.5	17.3	31.0	51.7	27.3	13.6	59.1	22.6	23.8	53.6
<b><i>Others</i></b>												
Nalidixic acid	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100
Norfloxacin	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
Oxacillin	-	15.2	84.8	-	31.1	68.9	-	-	100	-	16.7	83.3
Rifampin	18.2	15.2	66.6	44.8	31	24.2	59.1	18.2	22.7	38.1	21.4	40.5

\*: *Enterococcus* spp. includes *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, and *E. thailandicus* strains

\*\* : S: susceptible; I: Intermediate-resistant; R: resistant

-: Not detected.

The summary of enterococci exhibiting resistance to at least three antimicrobial agents is given in Table 4. Accordingly, since enterococci are known to have resistance to nalidixic acid intrinsically, it was excluded while evaluating the multidrug resistance. Out of 84 isolates, 70 (83.3%) were found to be resistant at least three antibiotics, while 14 (16.7%) of the isolates did not carry multidrug resistance. Among species, *E. faecalis* was found to show more resistance phenotypes than other species.

The antibacterial results of enterococcal strains against selected food pathogens are summarized in Table 5. Most of the isolates showed low inhibition level against *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus*

ATCC 43300. Along with this, 26 out of 33 strains of *E. faecalis* showed strong inhibition effects against *L. innocua* ATCC 33090, while three strains were found to have had a more weakly inhibition effect. It is followed by the strong effect of *E. faecalis* to *L. monocytogenes* ATCC 13932. Comparing to other Enterococcus species identified in this study, the inhibition effects of *E. faecalis* against *L. innocua* ATCC 33090, and *L. monocytogenes* ATCC 13932 were statistically found to be significant ( $p < 0.05$ ). Moreover, a strong correlation has been found on the antimicrobial effect of *E. faecalis* against these two food pathogens ( $p = 0.941$ ).

**Table 4.** Resistance to multiple antibiotics detected among the strains

	<i>E. faecalis</i> (n = 33)	<i>E. faecium</i> (n = 29)	<i>Enterococcus</i> spp.* (n = 22)	Total (n = 84)
Resistance to 3 antibiotics	7	5	9	21
Resistance to 4 antibiotics	6	11	6	23
Resistance to 5 antibiotics	17	4	3	24
Resistance to 6 antibiotics	-	2	-	2

\*: *Enterococcus* spp. includes *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, and *E. thailandicus* strains

∴: Not detected

## DISCUSSION

Fast and reliable identification in food microbiology has become a real challenge. Since biochemical methods based on phenotypic characteristics take time and give indecisive results, these methods have been mostly replaced by PCR based molecular methods, particularly sequencing of the 16S rRNA region in bacteria (18). Sequencing requires an additional cost as well as being time-consuming. Alternative methods, such as MALDI-TOF-MS, are still

of concern, which gives identification result on species level within a few minutes from a single colony grown on an agar plate (19). Therefore, the comparison of MALDI-TOF-MS and 16S rRNA sequencing, as well as antibiotic resistance and antimicrobial activity to various food pathogens, were aimed.

The results of this study revealed that 81 of 84 (96.4%) isolates were identified correctly on species level ( $p > 0.05$ ) and are in accordance with several studies, revealing that MALDI-TOF-MS could be a powerful tool for fast and reliable identification



**Table 5.** Antibacterial activity of Enterococcus strains against selected reference food pathogens strains

Pathogens	<i>E. faecalis</i> (n = 33)	<i>E. faecium</i> (n = 29)	<i>Enterococcus</i> spp.* (n = 22)
<b><i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932</b>			
++	23 (69.6%)	8 (27.6%)	1 (4.6%)
+	5 (15.2%)	2 (6.9%)	3 (13.6%)
-	5 (15.2%)	19 (65.5%)	18 (81.8%)
<b><i>L. innocua</i> ATCC 33090</b>			
++	26 (78.8%)	9 (31.0%)	2 (9.1%)
+	3 (9.1%)	1 (3.4%)	2 (9.1%)
-	6 (18.1%)	19 (65.6%)	18 (81.8%)
<b><i>E. coli</i> ATCC 25922</b>			
++	1 (3.0%)	2 (6.9%)	4 (18.2%)
+	8 (24.2%)	12 (41.4%)	7 (31.8%)
-	24 (72.8%)	15 (51.7%)	11 (50.0%)
<b><i>S. aureus</i> ATCC 43300</b>			
++	2 (6.0%)	3 (10.3%)	5 (22.7%)
+	11 (33.3%)	8 (27.6%)	2 (9.1%)
-	20 (60.7%)	18 (62.1%)	15 (68.2%)

\*: *Enterococcus* spp. includes *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, and *E. thailandicus* strains

Results are expressed as a result of diameters of the inhibition zone

++ inhibition zone 5-10 mm, + inhibition zone 1-5 mm, -: no inhibition zone

(20). Apart from other studies, two of *E. faecium* strains and one *E. casseliflavus* strain have been characterized differently as a result of 16S rRNA sequencing. Strictly related species are likely a problem owing to similarities in ribosomal proteins that are the main proteins targeted by MALDI-TOF-MS (20). Besides, assessment of intensities of the common peaks obtained is sometimes not applicable for differentiation between phase variants, especially in the case of the high similarity of their profiles (21). Based on the MALDI scores obtained for Enterococcus

isolates as seen in Table 2, which are below 2.300, are in accordance with the fact that scores between 2.000-3.000 should not be accepted as correct identification. According to results reported by Aydın and Ardic (12), 17 out of 84 isolates had MALDI scores between 2.000 - 2.300. 16s rRNA sequencing confirmed 14 of them, for which identification confidence is 82.35%. Since most of the researchers assume 2.000 and higher MALDI scores as correct identification on species level (2,44-45), care must be taken within this regard.

The 16S rRNA sequencing of the strains revealed the presence of *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* and *E. thailandicus*. Among all, *E. faecalis* and *E. faecium* were reported to have been isolated from traditional cheeses as members of dominant microflora by researchers (22). The prevalence of *E. faecalis*, *E. faecium* and *E. durans* have been associated with geographical location and to lack of hygienic production conditions since they are the most abundant in the human gastrointestinal tract. At the same time, *E. casseliflavus* and *E. gallinarum* strains are ubiquitously found in environmental reservoirs (23). Fewer reports have been released regarding the identification of *E. gallinarum*, and *E. casseliflavus* (13) from cheese samples, which are known to be intrinsically vancomycin-resistant enterococci (VRE) and to cause bloodstream infections (24). To best of our knowledge, it is the first report revealing *E. thailandicus* as a result of 16S rRNA gene sequencing from traditional cheeses, which reveals that this species cannot only be found in meat and meat-based products. Therefore, the prevalence and the contribution of this species to cheese technology should be of interest as well as other non-dominant enterococci. Such as *E. hirae*, *E. gallinarum*, and *E. italicus*. This species was firstly isolated from sausage specimens in Thailand by Tanasupawat et al. (25). It is genetically similar to *E. hirae* by a ratio of 99.3-99.6% and assumed to be isolated from mostly bovine feces, which explains its prevalence in mostly meat and fermented meat products (25). Although genetically close species sometimes cause some problems when MALDI-TOF-MS is used due to similarities in ribosomal proteins, 16s rRNA sequencing indicated that MALDI-TOF-MS is capable of differentiating *E. thailandicus* from *E. durans*. These two species were clustered in the same subgroup in the phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining method with 1000 bootstrap (Fig 1).

The food chain is of great concern owing to being the main route for the introduction of antibiotic-

resistant enterococci from animal and environment sources into the human gastrointestinal tract, where the genes might be transferred to pathogenic bacteria (7). In recent years, the concern about antibiotic resistance has increased dramatically. Raw milk cheeses harbor many sorts of bacteria, among which enterococci constitute a considerable portion (1). Among  $\beta$ -lactams, glycopeptides, and aminoglycosides group antibiotics, only 5.9% of enterococci have been found to be susceptible to streptomycin. These results are in accordance with those reported by Karaalioglu et al. (26). In combination with cell wall inhibiting antibiotics like penicillin, and ampicillin which were found to have inhibited the growth of the strains by rates of 80.9%, and 73.8%, are the antibiotics of choice for treating enterococcal infections, as well (27). Since streptomycin or gentamycin has been used in combination with penicillin in drinking water to treat some animals, there is a possibility that antibiotic-resistant enterococci may develop, and be transmitted by food (7). The results obtained in this study reveals that enterococci exhibited a lower resistance to glycopeptides than other groups. The reason for this is thought to arise from using  $\beta$ -lactams and aminoglycosides more in common alone or combination.

VRE has spread globally and has become a significant cause of nosocomial infections as opportunistic pathogens. Treatment of VRE infections is hindered owing to resistance to multiple other agents (28). The emerge of enterococci resistance to vancomycin includes clinical overuse of antibiotics, cross-resistance, and use of avoparcin, which is a growth promoter in cattle, and which shares a chemical similarity with vancomycin causing the prevalence of vancomycin-resistant strains of bacteria (29). According to the results, the resistance between vancomycin (55.9%) and teicoplanin (3.6%) was found to be significant ( $p < 0.05$ ), which are two major glycopeptides. They constitute one of the few available therapies of severe infections that occurred by enterococci. Given the high number of cases, the

previously documented occurrence of transmission of VRE to people via the food chain, and the failure in the treatment, glycopeptides are classified as being of the highest priority (30). Since the cow milk is mostly used in the geographical regions in which squeezed cheeses are manufactured, the difference in the effect of these two antibiotics belonging to glycopeptides on the strains is noteworthy. When the results are investigated, *E. faecalis* strains displayed lower sensitivity than *E. faecium* did ( $p < 0.05$ ), which are in accordance with the results reported by Shridhar and Dhanashree (31).

Erythromycin, chloramphenicol, and tetracycline resistances, which are significant concerns for dairy enterococci, were 77.4%, 64.3%, 63.1%, respectively. Although the results reported by Sanlibaba and Senturk (22) show lower resistance profiles, the results obtained in this study are in accordance with those reported by Yogurtcu and Tuncer (32). The high prevalence of tetracycline and erythromycin resistance is in keeping with several studies revealing the ubiquitous presence of tetracycline and erythromycin resistance genes in the environment, and animal facilities, and due to the efficient transfer mechanisms of the resistance genes by conjugative plasmids and transposons (33,34). The reason for the difference between studies are thought to be often strain- and region-dependent.

The highest resistance was observed in nalidixic acid in all strains, which is an expected result since most of the enterococcal strains have been reported to have resistance to nalidixic acid intrinsically (35). Resistance to rifampin, which inhibits the transcription of mRNA, and evaluated to be an alternative drug to cure VRE infections, was found to be the highest among *E. faecalis* strains (81.8%). Our findings also indicate that all of the strains were either intermediate or strictly resistant to oxacillin, for which most enterococci have innate resistance (36).

Multidrug resistance refers to resistance at least

three antimicrobial agents, which are found to be 83.33% (70 out of 84) in this study. Although Cariolato et al. (37) previously reported that multiple antibiotic resistance was uncommon among dairy enterococci, our results are not in accordance with what they stated. This frequency in multidrug resistance can be related to efficient mechanisms for the transfer of transposable genetic elements (33). On the other hand, *E. faecalis* strains showed more resistance phenotype than *E. faecium* did, which differs from the results revealed by Sanlibaba and Senturk (22) but resembles with those reported by Yuksel et al. (36). Therefore, thinking that resistance to a significant amount of antibiotics can be acquired from the strains sharing the same microflora or environment, the difference between the outcome of contrary studies can be attributed to working with strains obtained from different regions.

Antimicrobial metabolites synthesized by enterococci contain mainly hydrogen peroxide, and antibacterial peptides, namely bacteriocins/enterocins (13). Our results have revealed that *E. coli*, which is a Gram-negative bacterium, seems to be more resistant to the antimicrobial activity of enterococci to some extent than the Gram-positive bacterial strains which agree with the results reported by Veljovic et al. (38). As mentioned above, even though the results obtained from other studies are species- and strain-dependent, the anti-listerial effect of *E. faecalis* strains has been statistically found significant in this study ( $p < 0.05$ ), which resembles the results reported by some other researchers (39).

To sum up, the correlation between the results obtained from both MALDI-TOF-MS and 16s rRNA sequencing demonstrates that MALDI-TOF-MS is a fast, economical, robust, and reliable method for characterization of enterococci, thereby could be used as an alternative method on routine analysis. From the point of view of safety perspective, squeezed cheeses produced from raw milk without the addition of starter culture includes a great

amount of multiple antibiotic-resistant enterococci. On the other hand, the results of antibacterial activity revealed enterococci to be more effective against tested Gram-positive food pathogens. In this way, enterococci which do not carry multiple antibiotic resistance can be used in starter culture combinations

in cheese manufacturing technology to inhibit the growth of Gram-positive food pathogen bacteria within the context of hurdle technologies, however, to this end, more studies on safety perspectives, such as determining virulent determinant, are required.

## ACKNOWLEDGEMENTS

A major part of this research was supported by Aksaray University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number is 2018-066).

## REFERENCES

- Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol*, 2003; 88 (2-3): 215-2.
- Gaglio R, Couto N, Marques C, Lopes MDFS, Moschetti G, Pomba C, et al. Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. *Int J Food Microbiol*, 2016; 236: 107-14.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 (OJ L338, p1, 22/12/2005 ) of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. 2005; L 338/1-L 338/26.
- Yuvasen A, Macit E, Dertli E. Microbial species playing roles for the production of traditional kasar cheese during pre-maturation period. *LWT*, 2018; 91: 406-13.
- Egan K, Field D, Rea MC, Ross RP, Hill C, Cotter PD. Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? *Front Microbiol*, 2016; 7: 461.
- Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Girones R, et al. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA J*, 2017; 15(3):177.
- Jahan M, Zhanel GG, Sparling R, Holley RA. Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol*, 2015; 199: 78-85.
- Picon A, Garde S, Avila M, Nunez M. Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. *Int Dairy J*, 2016; 58: 14-22.
- Ceylan ZG, Turkoglu H, Dayisoğlu KS. The microbiological and chemical quality of sikma cheese produced in Turkey. *Pakistan J Nutr*, 2003; 2 (2): 95-7.
- Bareika HA, Sidarenka AV, Novik GI. Starter cultures of lactic acid bacteria for special diet products, *Eurobiotech J*, 2017; 1(1): 89-90.

11. Carbonnelle E, Grohs P, Jacquier H, Day N, Tenza S, Dewailly, A, et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification, *J Microbiol Methods*, 2012; 89(2): 133-6.
12. Aydin F, Ardic M. Determination of microbiological and chemical properties of sikma cheeses collected from different provinces. *Gıda*, 2019; 44(5): 826-6.
13. Ispirli H, Demirbas F, Dertli E. Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. *LWT*, 2017; 75: 358-65.
14. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, Date Accessed: 12.01.2020.
15. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016; 33(7): 1870-4.
16. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-sixth Informational Supplement, M100-S26. Wayne: Clinical Laboratory Standards Institute. 2016.
17. Schillinger U, Lucke, FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol*, 1989; 55(8): 1901-6.
18. Aras Z. Mikrobiyolojide kullanılan hızlı tanı yöntemleri. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2011; 68(2): 97-104.
19. Quintilla R, Kolecka A, Casaregola S, Daniel HM, Houbraken J, Kostrzewa M, et al. MALDI-TOF MS as a tool to identify foodborne yeasts and yeast-like fungi. *Int J Food Microbiol*, 2018; 266, 109-8.
20. Quintela-Baluja M, Böhme K, Fernández-No IC, Morandi S, Alnakip ME, Caamaño-Antelo S, et al. Characterization of different food-isolated *Enterococcus* strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 2013; 34 (15): 2240-50.
21. Kryazhevskikh NA, Loiko NG, Demkina EV, Mulyukin AL, Lebedev AT, Gaponov, AM, et al. Applicability of MALDI mass spectrometry for diagnostics of phase variants in bacterial populations. *Microbiol*, 2015; 84 (3): 328-46.
22. Sanlibaba P, Senturk E. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of enterococci from traditional cheeses in Turkey. *Int J Food Prop*, 2018; 21(1): 1955-63
23. Russo N, Caggia C, Pino A, Coque TM, Arioli S, Randazzo CL. *Enterococcus* spp. in ragusano PDO and pecorino siciliano cheese types: a snapshot of their antibiotic resistance distribution. *Food Chem Toxicol*, 2018; 120: 277-86
24. Britt NS, Potter EM. Clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* bloodstream infections. *J Glob Antimicrob Resist*, 2016; 5: 57-61
25. Tanasupawat S, Sukontasing S, Lee JS. *Enterococcus thailandicus* sp. nov, isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008; 58(7): 1630-4
26. Karaalioğlu O, Özmen-Togay S, Ay M, Soysal G, Çardak M, Bağcı U, et al. Çiğ balık örneklerinden izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* suşlarının gıda güvenliği yönünden bazı özelliklerinin değerlendirilmesi. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2019; 76(3): 341-52
27. Davies J, Wright GD. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol*, 1997; 5 (6): 234-40
28. Aamodt H, Mohn SC, Maselle S, Manji KP, Willems R, Jureen R, et al. Genetic relatedness and risk factor analysis of ampicillin-resistant and high-level gentamicin-resistant enterococci causing bloodstream infections in Tanzanian children. *BMC Infect Dis*, 2015; 15(1): 107
29. Bager F, Madsen M, Christensen J, Aarestrup FM. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Vet Med*, 1997; 31 (1-2): 95-112
30. Critically Important Antimicrobials For Human Medicine. Geneva: World Health Organization. 6th ed. 2018. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf>, Date Accessed: 07.06.2017
31. Shridhar S, Dhanashree B. Antibiotic susceptibility pattern and biofilm formation in clinical isolates of *Enterococcus* spp. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2019; 1-6

32. Yogurtcu NN, Tuncer Y. Antibiotic susceptibility patterns of *Enterococcus* strains isolated from Turkish Tulum cheese. *Int J Dairy Technol*, 2013; 66 (2): 236-42.
33. Diarra MS, Rempel H, Champagne J, Masson L, Pritchard J, Topp E. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*, 2010; 76 (24): 8033-43.
34. Coleri A, Çökmüş C. Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2008; 65 (2): 87-96.
35. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2014; 12(10): 1221-36.
36. Yuksel FN, Akcelik N, Akcelik M. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains, isolated from traditional cheeses in Turkey. *Mol Genet Microbiol Virol*, 2015; 30 (4): 206-15.
37. Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*, 2008; 19 (9): 886-92.
38. Veljovic K, Fira D, Terzic-Vidojevic A, Abriouel H, Galvez A, Topisirovic L. Evaluation of antimicrobial and proteolytic activity of enterococci isolated from fermented products. *Eur Food Res Technol*, 2009; 230 (1), 63.
39. Masalam B, Maged S, Bahieldin A, Alharbi MG, Al-Masaudi S, Al-Jaouni SK, et al. Isolation, molecular characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria in Saudi raw and fermented milk. *Evidence-Based Complement Altern Med*, 2018; 2018: 7970463.

# Age-specific anti-mullerian hormone nomogram in Şanlıurfa

## Şanlıurfa'da yaşa özgü anti-müllerian hormon nomogramı

Adnan KİRMİT<sup>1</sup>, Ahmet Berkiz TURP<sup>2</sup>

### ABSTRACT

**Objective:** Antimullerian hormone (AMH) levels are generally considered a good predictor of ovarian reserve. Şanlıurfa, is the city with the highest fertility rate in Turkey. The aim of this study is to determine the age spesific serum AMH nomogram of the patients with infertility complaints in Şanlıurfa and its relationship with fertility.

**Methods:** The records of patients who applied to Harran University Research and Application Hospital infertility outpatient clinic and whose AMH levels were measured were reviewed retrospectively. All patients registered between February 2017 and September 2018 were included in this retrospective study. A total of 3667 patient data were included in the study. Age-specific distribution of AMH levels was determined. Serum AMH levels of patients included in the study were routinely determined in a single laboratory using the ECLIA method in a C601 autoanalyser with the same brand kits, and the results were expressed as ng/mL. Excessive values (> 30 ng/mL) were excluded from evaluation and only the first AMH value among multiple AMH measurements was included in the nomogram.

**Results:** In the histogram analysis, we found that AMH levels showed two peaks at the age of 19 and 23 and

### ÖZET

**Amaç:** Antimüllerian hormon (AMH) seviyeleri genellikle yumurtalık rezervinin iyi bir öngörücüsü olarak kabul edilmektedir. Şanlıurfa, Türkiye'nin en yüksek doğurganlık oranına sahip ilidir. Bu çalışmanın amacı Şanlıurfa'daki infertilite şikâyeti olan hastaların serum AMH düzeylerinin yaşa özgü nomogramlarını belirlemek ve doğurganlıkla ilişkisini saptamaktır.

**Yöntem:** Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi infertilite polikliniğine müracaat eden ve AMH düzeyleri ölçülmüş olan hastaların kayıtları retrospektif olarak incelendi. Bu retrospektif çalışmaya Şubat 2017 ile Eylül 2018 arasında kayıtlı olan tüm hastalar dahil edildi. Çalışmaya toplam olarak 3667 hasta verisi dâhil edildi. AMH seviyelerinin yaşa özgü dağılımı tespit edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların serum AMH düzeyleri, aynı marka kitlere sahip bir C601 otoanalizöründe ECLIA yöntemi kullanılarak tek laboratuvarında rutin olarak saptanmış ve sonuçlar ng/mL olarak ifade edildi. Aşırı değerler (>30 ng/mL) değerlendirme dışında tutuldu ve birden fazla AMH ölçümlerinden yalnızca ilk AMH değeri nomograma dahil edildi.

**Bulgular:** Histogram analizinde, AMH düzeylerinin 19 ve 23 yaşında iki tepe noktası gösterdiğini ve daha sonra azalan bir eğilim gösterdiğini tespit ettik. Serum AMH

<sup>1</sup>Harran University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Şanlıurfa  
<sup>2</sup>Silifke State Hospital, Department of Obstetrics and Gynecology, Mersin



İletişim / Corresponding Author : Adnan KİRMİT

Harran Üni. Hast. Tıbbi Biyokimya Lab. Osmanbey Kampüsü, Haliliye 63290 Şanlıurfa - Türkiye  
E-posta / E-mail : adnankirmit@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 05.03.2020  
Kabul Tarihi / Accepted : 03.06.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.34392

Kirmit A, Turp AB. Age-specific anti-mullerian hormone nomogram in Şanlıurfa.  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 413-420

then entered a decreasing trend. Serum AMH levels were negatively correlated with age ( $r = -0.518$ ,  $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** This study presents a review of age-specific AMH reference values detected in the same conditions, based on a great number of women with infertility complaints evaluated in Şanlıurfa. It is clear that, without clinical outcome data, the reference values provided for AMH cannot be used alone for counseling about a woman's successful ovulation induction or chances of having a child. Whereas, these data may be useful for clinicians to evaluate the ovarian reserve of infertile patients and individualizing the treatment for this, by providing options to evaluate the AMH value together with regional nomogram, instead of mere the AMH value.

**Key Words:** Antimüllerian hormone, in vitro fertilization, infertility, ovarian reserve

düzeyleri yaş ile negatif korelasyon gösterdi ( $r = -0.518$ ,  $p < 0.001$ ).

**Sonuç:** Bu çalışma, Şanlıurfa'da değerlendirilen infertilite şikayeti olan çok sayıda kadında, aynı koşullarda saptanan yaşa özgü AMH referans değerlerinin incelemesini sunmaktadır. Klinik sonuç verileri olmadan, AMH için sağlanan referans değerlerinin, bir kadının başarılı yumurtlama indüksiyonu veya çocuk sahibi olma şansı hakkında danışmanlık için tek başına kullanılamayacağı açıktır. Bununla birlikte, bu veriler klinisyenlerin infertil hastaların yumurtalık rezervini değerlendirmesinde ve bunun için tedavinin bireyselleştirilmesinde sadece AMH değeri yerine bölgesel nomogramla birlikte değerlendirmelerine imkân sunarak yararlı olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Antimüllerian hormon, yardımcı üreme teknikleri, kısırlık, over rezervi

## INTRODUCTION

Şanlıurfa is the city with the highest fertility rate in Turkey (1). It is located in southeastern Turkey, it is based on the pre-existing history of 10.000 BC. Being an important city in the Middle East, Şanlıurfa is home to many different ethnic cultures and has the characteristics of representing the Middle East ethnically.

Although the rate of fertility is the highest in Turkey, infertility rate tends to rise here as well as all over the world. In this respect, it has become an attractive subject to investigate the factors affecting fertility and infertility in Şanlıurfa.

Many tests are currently being used in the female factor research of infertility. Of these, age, antral follicle count (AFC) and antimüllerian hormone (AMH) levels are generally accepted as the best predictors of ovarian reserve (2). AMH is a common marker of

ovarian reserve (3). However, AMH is accepted as the best biochemical test for ovarian reserve (4).

AMH was first discovered in 1947 by Alfred Jost (5). AMH is also called müllerian inhibiting agent, müllerian inhibiting factor and müllerian inhibiting hormone. It is a dimeric glycoprotein hormone belonging to the "transforming growth factor-beta" family (4). In humans, the Antimüllerian Hormone is encoded by the AMH gene located on chromosome 19p13.3 (6), while the AMH receptor is encoded by the AMHR2 gene located on chromosome 12 (7).

Although the AMH assay is frequently used today, there are discrepancies in the literature regarding its direct association with pregnancy or birth rates. In general, AMH levels play an important role in determining the counseling provided for the patient and choice of infertility treatment.



Currently, many studies have shown the correlation between AMH and age. However, no data are based on large samples of AMH values with age in Turkey. AMH may have racial or environmental differences (8). Thus, the external reference values may not apply to Turkey.

The aim of our study was to determine the distribution of AMH levels, which is the ovarian reserve test, of the patients who applied to the infertility outpatient clinic of the University Hospital in Şanlıurfa due to their desire to have a child, and also to partly help determine the correct treatment strategies for the patients in the future.

## MATERIAL and METHOD

### Study population

In this study, records of patients who applied to Harran University Research and Application Hospital Obstetrics Outpatient Clinic with the complaint of child request, diagnosed with infertility and was measured AMH levels were reviewed retrospectively. All patients registered between February 2017 and September 2018 were included in our retrospective study. AMH data in the records were included regardless of the period in which the menstrual cycle occurred. Data of 3667 patients were included in the study. 7 patients' data were excluded because of abnormal results ( $> 30$  ng/mL) and among the subsequent AMH measurements only the first AMH value was included in the nomogram. As a result 3660 results were used for calculation. Demographic characteristics of the patients were also examined from the file records.

### AMH assay

All serum AMH levels were measured as routinely in same laboratory using ECLIA (Electrochemiluminescence Immunoassay Analyzer) method on an C601 autoanalyzer (Roche, Rotkreuz,

Switzerland) with same-brand kits and the results are presented as ng/mL. Within-run CV for AMH concentrations ranging between 0.7 and 3.4%; and the repeatability CV value were 1.2% for cobas e 601/ MODULAR ANALYTICS E 170 analyzers (9). The limit of detection for AMH was 0.01 ng / mL. AMH values of 125 patients whose results were below this were adjusted to 0.01 ng / mL for statistical calculation.

### Statistical analysis

Analyses was performed using SPSS for Windows version 22 (SPSS Inc. Co., Chicago, IL, USA). The normality evaluation of AMH values was done by Kolmogorov-Smirnov test and it was found that it did not show normal distribution. Spearman's correlation analysis was used to analyze correlation between serum AMH values and age. The linear R<sup>2</sup> value was calculated to evaluate the degree of fitting of the curve and log-transformed AMH values were used to establish the Simple linear regression model.

## RESULTS

In our histogram analysis, we found that AMH levels showed two peaks at the age of 19 and 23 and then entered a decreasing trend (Figure-1). Table-1 summarizes the mean (95% Confidence Interval), median, minimum, maximum and Interquartile Range (IQR) values of different age groups. Figure 2 illustrates the trend of change of AMH presented in Table 1.

Table 2 shows the patterns of decrease in AMH levels according to age groups. Decrease rates of AMH according to age groups increased with increasing age. However, the increased acceleration in this decline is not easily noticeable, as AMH levels decline with age. The highest decreases were observed in the age groups of 31-35, 26-30 and 21-25, respectively.

Although the rate of decrease was found to be different for each age group, when all age groups

were taken together, the correlation between AMH levels and age was investigated and regression was formulated.

The correlation of serum AMH values with patient ages was negative ( $r = -0.518$ ,  $p < 0.001$ ). The simple

linear regression model was  $\log(\text{AMH}) = 1.698 - 0.052 * \text{age}$  ( $R^2 = 0.249$ ,  $p < 0.001$ ), indicating that approximately 24.9% of serum AMH concentrations were age-related and that AMH values would decrease by an average of 5.2% per year.

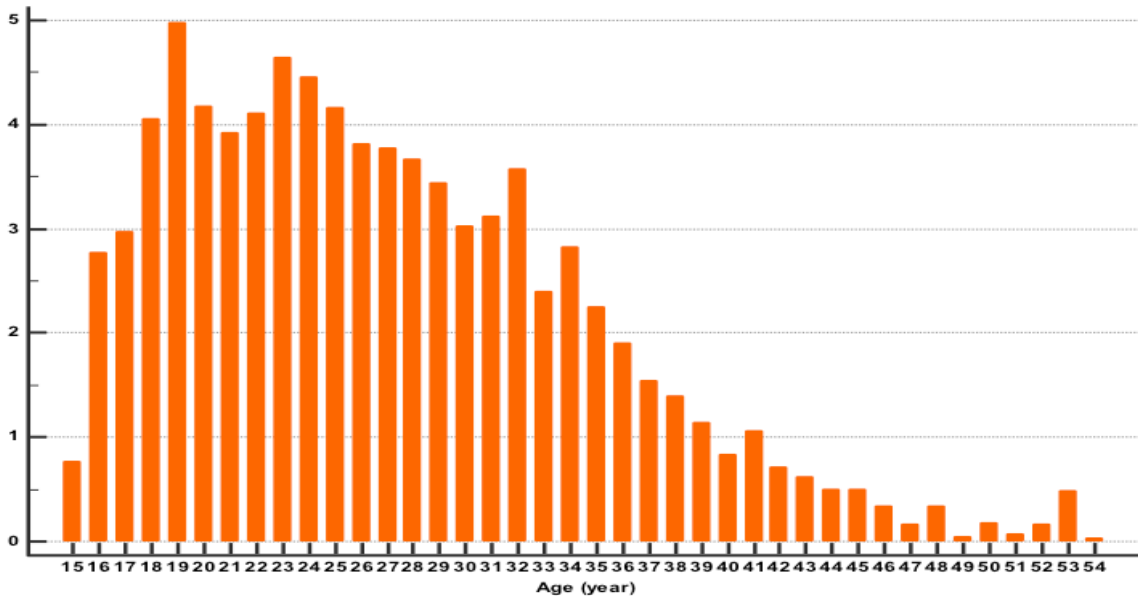
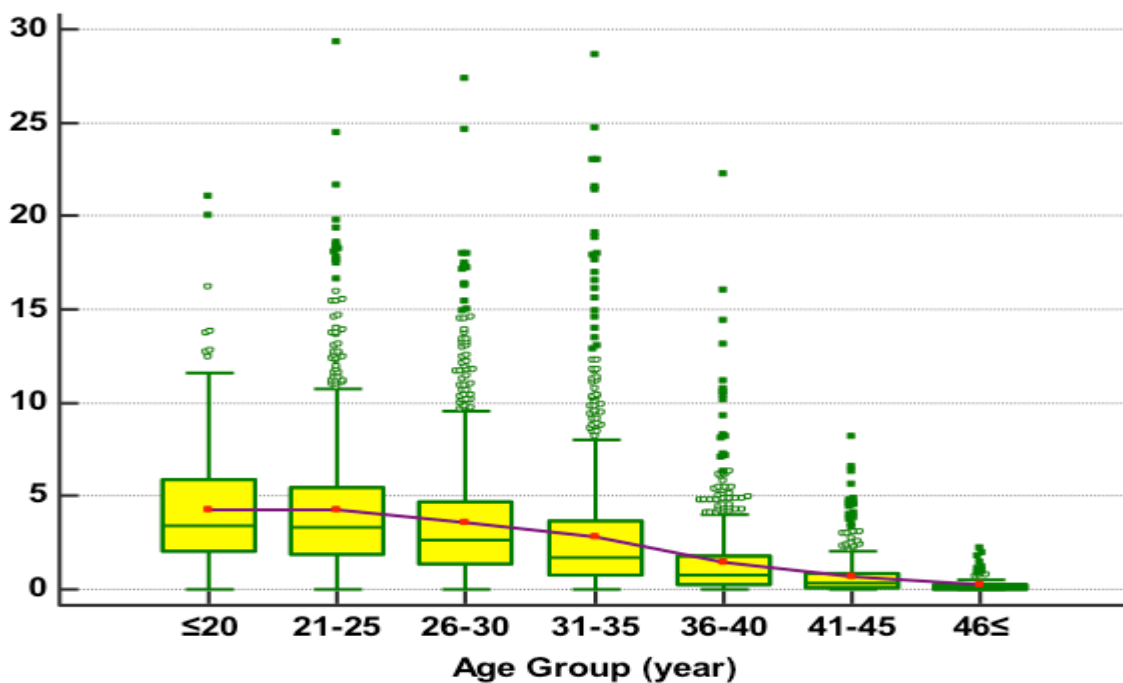


Figure 1. Age specific AMH levels

Table 1. Distribution of AMH levels (ng/mL) in different age groups

Age Group	n	Mean	SD	Median	Min	Max	Q1	Q3	IQR
≤20	150	3,89 (3,71 - 4,87) <sup>a</sup>	3,6	3,38	0,01	21,08	2,05	5,92	3,86
21-25	662	3,85 (3,99 - 4,58)	3,85	3,30	0,01	29,30	1,87	5,42	3,55
26-30	893	3,16 (3,32 - 3,76)	3,34	2,67	0,01	27,40	1,33	4,65	3,32
31-35	780	2,34 (2,60 - 3,10)	3,54	1,72	0,01	28,60	0,73	3,68	2,94
36-40	695	1,14 (1,28 - 1,58)	2,03	0,79	0,01	22,27	0,26	1,77	1,50
41-45	375	0,52 (0,58 - 0,81)	1,09	0,30	0,01	8,14	0,06	0,88	0,81
≥46	105	0,16 (0,15 - 0,31)	0,40	0,06	0,01	2,23	0,01	0,23	0,21

a : 95% Confidence Interval  
IQR : Interquartile Range



**Figure 2.** Serum AMH concentrations of different age groups. Values are median (short lines), mean (red point), 25-75th percentiles (boxes) and 95% confidence interval (whiskers).

**Table 2.** Declining tendencies of AMH levels according to different age groups

Age Group	n	Mean <sup>a</sup>	AMH Reduction Amount (ng/mL)	AMH Reduction Ratio (%)
≤20	150	3,89	0,04	1
21-25	662	3,85	0,69	18
26-30	893	3,16	0,82	26
31-35	780	2,34	1,20	51
36-40	695	1,14	0,62	54
41-45	375	0,52	0,36	69
≥46	105	0,16		

a: According to 95% Confidence Interval

## DISCUSSION

In our study, serum AMH values was oppositely proportional to rising age, and previous studies confirm this output (10-12). There are similar analysis data concerning AHM which is distributed according to age in both Turkey and the entire world. Scheffer et. al. stated that the AMH reached its peak level after the 20s and progressively decreased after this age (13). In the study by Zhu et al., the age at which serum AMH levels reached its peak was 24 years (14). In our study, the ages at which AMH reached its peaks was 19 and 23 years old.

The fact that AMH reaches its peak at the age of 19, that the decline is stable after 23 years of age and that the ovarian reserve decreases excessively after the age of 31-35 seems to explain the biological reason for the observational early child demand of the people in Şanlıurfa region. Akira Iwase recent review showed also that AMH is the most reliable marker of ovarian reserve in a wide group of clinical settings however poor for predicting menopause age for rAMH trajectories of time to menopause and the usability of AMH in the assessment of current fertility is limited and dependent on age (15). See Ling Loy et. al. study similiar results with Chinese women however their study population different from ours. Our study age starts detecting AMH values from age 16 compared to their starting age 26 which made it possible to detect an earlier decline of AMH value at an early age (16).

Such nomograms may have different local results, as we have done and we have seen in other study results. Such original studies are likely to benefit from the following: When examining a patient with such nomograms to be extracted in the future, it may be more logical to evaluate the patient's own age range in her own region rather than merely assessing the outcome of AMH as an indicator of ovarian reserve.

In this context, Barad et al. (10) demonstrated that in women reaching IVF (In Vitro Fertilization),

age-specific AMH predicts low oocyte yield when it is below the 25th percentile and higher oocyte yield if it is above the age-specific 75th percentile. Our study was retrospective and no antral follicle count was performed. However, these local nomograms can help clinicians choose the right treatment strategies at the right time, taking into account local differences. These local nomograms can help clinicians choose the right treatment strategies at the right time, taking into account local differences.

As a result, when considering the AMH value, the patient can be provided with better information and counseling compared to the average value generated by the data pool. If local differences are too small to be taken into account, perhaps in the future more accurate AMH reference ranges can be identified by combining all these data.

Although AMH is a very good ovarian reserve marker, it is seen that some issues remain inadequate in explaining infertility. One of them, AMH does not have a full predictive value in terms of pregnancy and delivery (17). So it is not a marker that guarantees pregnancy or birth.

High AMH values can only stimulate the clinician to be careful and take the necessary precautions. By gathering such data in different parts of the world in a common pool, it can be hoped that these data will contribute to a more accurate clinical prediction. It is important to include such nomograms in the literature.

Although the AMH assay is frequently used today, there are discrepancies in the literature regarding its direct association with pregnancy or birth rates (15, 16). In general, AMH levels play an important role in determining the counseling and choice of infertility treatment.

We hope that with such published studies, regional AMH nomograms can be used to increase the pregnancy rate and success rate in infertility treatments by providing more accurate counseling to patients. One of the missing points of our study is that

the AMH blood levels, which are ovarian reserve, do not include all women in Şanlıurfa region. The results here belong only to the patient population. Since AMH is still an expensive test, it is not used as a screening test in the world. In the future, as the test price decreases and accessibility increases, larger data can be obtained. Nevertheless, the data included in our study reflects the general population to a large extent because it is as high as 3600. The real weakness of this study that we do not know the patients pregnancy rates. This study consists of ovarian reserve data of patients only. Future studies may designed as ovarian reserves corelated with pregnancy rates. This study can open a horizon also for future studies. We know that AMH is not a scanning test of ovarian reserve because of it is high costs, hence this study can open a horizon also for future studies.

## CONCLUSION

This study provides a review of age-specific AMH reference values detected in the same conditions, based on a great number of women with infertility complaints evaluated in Şanlıurfa. In similar studies around the world, the presence of peaks at the age of 23-24 for serum AMH value was expressed, whereas two peaks (19 and 23 years) were detected at an earlier ages in this study may be related to the high fertility rate in Sanliurfa. Whereas, these data may be useful for clinicians to evaluate the ovarian reserve of infertile patients and individualizing the treatment for this, by providing options to evaluate the AMH value together with regional nomogram, instead of mere the AMH value.

## REFERENCES

1. Doğum İstatistikleri, 2016. Ankara: Türkiye İstatistik Kurumu;18.05.2017. Report No: 24647. Available from: <http://tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24647>.
2. Lehmann P, Vélez MP, Saumet J, Lapensée L, Jamal W, Bissonnette F, et al. Anti-Müllerian hormone (AMH): a reliable biomarker of oocyte quality in IVF. *J Assist Reprod Genet*, 2014;31(4):493-8.
3. Nelson SM, Yates RW, Fleming R. Serum anti-Müllerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles—implications for individualization of therapy. *Hum Reprod*, 2007;22(9):2414-21.
4. Demir M. Over Rezerv Tayininde En İyi Belirteç: Anti-Müllerian Hormon (AMH). *Türk Klinik Biyokimya Derg*, 2013;11(2):79-85.
5. Wilson JD. Sexual differentiation of the gonads and of the reproductive tract. *Biology of the neonate*, 1989;55(6):322-30.
6. Cate R, Mattaliano R, Hession C, Tizard R, Farber N, Cheung A, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell*, 1986;45(5):685-98.
7. Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, Mattéi M-G, di Clemente N, Tizard R, et al. Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. *Nature Genetics*, 1995;11(4):382-8.
8. Tal R, Seifer DB. Potential mechanisms for racial and ethnic differences in antimüllerian hormone and ovarian reserve. *Internal J Endocrin*, 2013;2013818912.

9. Anckaert E, Öktem M, Thies A, Cohen-Bacrie M, Daan NMP, Schiettecatte J, et al. Multicenter analytical performance evaluation of a fully automated anti-Müllerian hormone assay and reference interval determination. *Clin Biochem*, 2016;49(3):260-7.
10. Barad DH, Weghofer A, Gleicher N. Utility of age-specific serum anti-Müllerian hormone concentrations. *Reprod Biomed Online*, 2011;22(3):284-91.
11. Seifer DB, Baker VL, Leader B. Age-specific serum anti-Müllerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. *Fertil Steril*, 2011;95(2):747-50.
12. Yoo JH, Kim HO, Cha SW, Park CW, Yang KM, Song IO, et al. Age specific serum anti-Müllerian hormone levels in 1,298 Korean women with regular menstruation. *Clin Exp Reprod Med*, 2011;38(2):93-7.
13. Scheffer JAB, Scheffer B, Scheffer R, Florencio F, Grynberg M, Lozano DM. Are age and anti-Müllerian hormone good predictors of ovarian reserve and response in women undergoing IVF? *JBRA Assist Reprod*, 2018;22(3):215.
14. Zhu J, Li T, Xing W, Lin H, Ou J. Chronological age vs biological age: a retrospective analysis on age-specific serum anti-Müllerian hormone levels for 3280 females in reproductive center clinic. *Gynecol Endocrinol*, 2018;1-5.
15. Iwase A, Osuka S, Goto M, Murase T, Nakamura T, Takikawa S, et al. Clinical application of serum anti-Müllerian hormone as an ovarian reserve marker: A review of recent studies. *J Obstetrics Gynaecol Res*, 2018;44(6):998-1006.
16. Loy SL, Cheung YB, Fortier MV, Ong CL, Tan HH, Nadarajah S, et al. Age-related nomograms for antral follicle count and anti-Müllerian hormone for subfertile Chinese women in Singapore. *PloS one*, 2017;12(12).
17. Casadei L, Dominici F, Scaldaferrì D, Vicomandi V, Ciacci S, Piccione E. Anti-Müllerian hormone levels and spontaneous pregnancy in women undergoing surgery for benign ovarian cysts. *Gynecol Endocrinol*, 2018;34(10):909-12.

# Carbon monoxide contributes to the regulation of vascular tonus in renal resistance arteries in spontaneously hypertensive rats

## Karbon monoksit, spontan hipertansif sıçanların renal direnç arterlerinde vasküler tonusun düzenlenmesine katkıda bulunur

Günnur KOÇER<sup>1</sup>, Seher NASIRCILAR<sup>2</sup>, Filiz BASRALI<sup>3</sup>, Oktay KURU<sup>4</sup>, Ümit Kemal ŞENTÜRK<sup>3</sup>

### ABSTRACT

**Objective:** Carbon monoxide (CO), an end product of heme oxygenase (HO) involved in the regulation of vascular tone, may show a compensatory effect in the course of hypertension. This study aimed to assess the effects of the HO/CO system on the vascular tone of renal resistance arteries in spontaneously hypertensive rats (SHRs).

**Methods:** The contribution of endogenous CO to vascular tone in renal resistance arteries was evaluated by the phenylephrine (Phe) contraction response with or without an HO inhibitor. The effect of the exogenous CO relaxation response was assessed by a CO releasing molecule (CORM). The mechanism of the CO relaxation effect was evaluated by a guanylate cyclase inhibitor, ODQ, or a potassium channel blocker, TEA. HO-1 and HO-2 enzyme protein expressions in renal resistance arteries were determined by Western blot analysis.

**Results:** Phe-induced constriction responses were higher in renal resistance arteries of SHRs compared to control animals. The extent of the same type of constriction was even higher in the SHR group after inhibition of CO production. Relaxation responses to a CO donor, CORM, were greater in the SHR group versus the control group. TEA, but not ODQ, suppressed CORM

### ÖZET

**Amaç:** Vasküler tonusun düzenlenmesinde yer alan karbon monoksit (CO), hipertansiyon gelişimi sırasında kompensatuar etki gösterebilir. Bu çalışma, spontan hipertansif sıçanlarda (SHR) HO / CO sisteminin renal direnç arterlerinin vasküler tonusu üzerine etkilerini değerlendirmeyi amaçlamıştır.

**Yöntem:** Renal direnç arterlerinde endojen CO'nun vasküler tonusa katkısı, bir HO inhibitörü varlığında ve yokluğunda fenilefrin (Phe) kontraksiyon yanıtı ile test edildi. Ekzojen CO gevşeme yanıtı da CO donörü (Carbon monoxide-releasing molecule (CORM)) kullanılarak değerlendirildi. CO gevşeme yanıtının mekanizması, guanilat siklaz inhibitörü (ODQ) veya potasyum kanal blokörü TEA ile değerlendirildi. Renal direnç arterlerindeki HO-1 ve HO-2 protein ekspresyonları Western blot analizi ile saptandı.

**Bulgular:** SHR'lerde kontrol grubuna kıyasla Phe'ye verilen kasılma yanıtı anlamlı olarak yüksekti ( $p<0,05$ ). HO inhibisyonu ile CO üretimi engellendiğinde SHR'de kasılma yanıtı daha da arttı ( $p<0,05$ ). SHR sıçanlarda CORM'a verilen gevşeme yanıtları da daha yüksekti ( $p<0,05$ ). Her iki grupta da CORM yanıtlarını ODQ baskılamazken TEA anlamlı

<sup>1</sup>Near East University, Department of Physiology, Nicosia, TRNC

<sup>2</sup>Alanya Alaaddin Keykubat University, Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Antalya, Turkey

<sup>3</sup>Akdeniz University, Department of Physiology, Antalya, Turkey

<sup>4</sup>Muğla Sıtkı Koçman University, Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Muğla, Turkey



İletişim / Corresponding Author : Günnur KOÇER

Yakın Doğu Bulvarı, YDÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji AD Kat: 2 Oda: 212, 99138 Lefkoşa - K.K.T.C.

E-posta / E-mail : gunnurkocer@neu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 20.03.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 16.07.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.76736

Koçer G, Nasırcılar S, Basralı F, Kuru O, Şentürk ÜK. Carbon monoxide contributes to the regulation of vascular tonus in renal resistance arteries in spontaneously hypertensive rats. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 421-430

responses in both groups. HO-2 protein expression patterns were not different between the groups, while HO-1 expression was remarkably higher in SHR when compared to that in control rats.

**Conclusion:** Consequently, our results revealed a CO-based compensatory effect in SHR by the induction of CO production and an increase in its bioavailability.

**Key Words:** CO, HO-1, SHR, renal resistance artery

olarak baskıladı ( $p < 0,01$ ). HO-2 protein ekspresyonu açısından gruplar arasında farklı olmamakla birlikte HO-1 ekspresyonu SHR'lerde kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksekti.

**Sonuç:** Sonuç olarak verilerimiz, SHR'lerin böbrek direnç arterlerinde karbon monoksidin kompensatuar etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** CO, HO-1, SHR, renal direnç arteri

## INTRODUCTION

Carbon monoxide (CO) is one of the recently accentuated relaxing mediators contributing to vascular tone. CO is endogenously produced by the heme oxygenase (HO) enzyme via degradation of heme substances and acts as an important regulator of vascular tone and blood pressure (1, 2). Its vasodilator effect and consequent decrease in peripheral vascular resistance is based on the interaction with soluble guanylate-cyclase (sGC) or with the calcium-activated potassium channels located in vascular smooth muscle cells (2-4). CO and nitric oxide (NO) have similar physiological implications, and there is cross-talk between the two, which affects the production and function of each other (5). Deterioration of NO metabolism and function is a well-known process in the development of spontaneously hypertensive rats (SHRs). Accordingly, the expressions of HO-1 and HO-2 enzymes, which are endogenous sources of CO production, are upregulated during the course of hypertension to compensate for NO deficiency (5). Despite similar biological effects, CO and NO cannot replace each other. In some instances, their functions may be different; in others, their functions may be synergistic or antagonistic (6). Low CO concentrations induce

NO release by eNOS activation, while high levels of CO reduce eNOS enzyme activity (7). The effects of the HO/CO system on renal vascular tone are well described. HO-1 and HO-2 expressions are present in both vascular and tubular structures of the kidney (8). CO acts as a vasodilator in the renal circulation regardless of being endogenous or exogenous (3, 4, 8, 9), and in vivo studies have demonstrated that the inhibition of HO enzymes reduces renal blood flow and depresses renal function (8, 10-12).

CO, produced during the development of hypertension, has protective effects on the kidney. For instance, besides its blood pressure-lowering effects by the stimulation of the HO-1 enzyme, shown in the one kidney - one clip (1K1C) renovascular hypertension model (13), and the angiotensin II (Ang II) salt-sensitive hypertension model stimulating renal damage (14), CO can also reduce renal damage. However, alterations in the HO/CO system in SHR kidneys are still unknown.

The kidney has important implications in blood pressure regulation, and renal damage by hypertension is common (15-17). Functional impairment of the renal vascular bed is an early sign of renal damage in both SHRs and other experimental



hypertension models. Renal vascular damage is first seen in the juxtamedullar cortex (18, 19), followed by an elevation in systemic blood pressure (20).

Hypertension leads to vascular damage of resistance vessels in the periphery, but renal vasculature is affected as well (20). There are no data elucidating the process, possible alterations in CO production, and CO bioavailability in renal resistance arteries of SHR. It is speculated that CO acts as a backup for the NO molecule, and thus, the changes in the HO/CO system in resistance vessels of SHR are worth investigating. Our present study aims to investigate if CO affects renal resistance arteries of SHR functionally, and if so, to evaluate the possible mechanisms involved in the process.

## MATERIAL and METHOD

### Animals

Animals in the hypertensive group were 12-15 week-old SHR, while Wistar Kyoto rats (WKY) represented the age-matched normotensive group (Harlan Laboratories, Israel). The rats were housed on a 12:12 h light-dark cycle at  $23 \pm 2$  °C with free access to standard rat chow and drinking water. All animal handling and experimental procedures were approved by the Animal Care and Usage Committee of Akdeniz University.

Systolic blood pressure measurements were performed using a noninvasive tail-cuff method. Blood pressure data were obtained with a MAY-BPHR 9610-PC unit and an MP 150 data-acquisition system (BIOPAC Systems; Santa Barbara, CA, USA) as measurements were completed immediately before euthanizing the animals.

### Preparation of vessels

The animals were euthanized under pentobarbital anesthesia by withdrawing the blood from the abdominal aorta. Whole kidney samples were immediately removed and then transferred to a dissecting dish containing a cooled Krebs solution (110

mM NaCl, 5 mM KCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, and 0.02 mM EDTA). Resistance arteries of renal tissues (the second-order; 2A branches of the renal artery; 200-220 µm in diameter) were carefully isolated and then dissected into 2-mm-long pieces under a dissection microscope. Vessel segments were then mounted onto a wire myograph chamber (EMKA Technologies, Paris, France), and their basal wall tensions were calculated using computer software (Normalize v1.0, EMKA Technologies, Paris, France). All vessel samples were rested for an hour at 37 °C and maintained at the determined baseline tension.

### Protocols

The equilibration period was followed by a preconditioning and vitalization process by adding 20 mM KCl and  $10^{-7}$  M phenylephrine (Phe, Sigma, St. Louis, USA)]. All vessel rings were then precontracted by a submaximal dose of Phe ( $10^{-6}$  M) and relaxation responses to  $10^{-6}$  M acetylcholine (Sigma, St. Louis, USA) were evaluated to examine the presence of endothelium; >70% relaxation represented acceptable level. NO production was typically inhibited in CO studies to observe the true CO-based effects by the addition of a nonspecific NOS inhibitor L-NAME (1 mM, Sigma, St. Louis, USA) to the bath solution during each of the following steps in our experimental protocols. The chambers were left for 30 min resting intervals prior to the next protocol application, explained below.

### Endogenous CO responses

Cumulative contraction responses to Phe ( $10^{-9}$  to  $3 \times 10^{-5}$  M) were recorded, and the vessels were then incubated with the HO inhibitor, chromium mesoporphyrin (CrMP; 30 µM, Frontier, Utah, USA) for 30 min to repeat the recording of Phe dose-response curves. The expected increase in the Phe-induced contraction response was used to demonstrate the contribution of endogenous CO to vascular tone after the suppression of CO production by CrMP treatment.

## Exogenous CO responses

Cumulative doses ( $10^{-9}$  to  $3 \times 10^{-4}$  M) of tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer (CORM, carbon monoxide-releasing molecule, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were used to monitor vasodilation responses in vessel rings pretreated with  $3 \times 10^{-6}$  M Phe.

## Determination of HO-1 and 2 expressions

The collected arterial tissue samples were stored at  $-80$  °C before assessing the expression levels of HO isoforms. Then, 100 µg of tissue protein lysates were applied per lane for SDS-PAGE (in 12.5% gel) separation, followed by electroblotting to transfer the samples onto PVDF membranes. A 5% non-fat dry milk medium was used for the blocking process before the membranes were incubated overnight at 4 °C room temperature with primary antibodies:  $\beta$ -actin (1:500; Abcam, Cambridge, UK), HO-1 (1:1000; StressGen, Victoria, BC, Canada), and HO-2 (1:1000; StressGen, Victoria, BC, Canada). All membranes were then treated for 1 h with appropriate HRP-

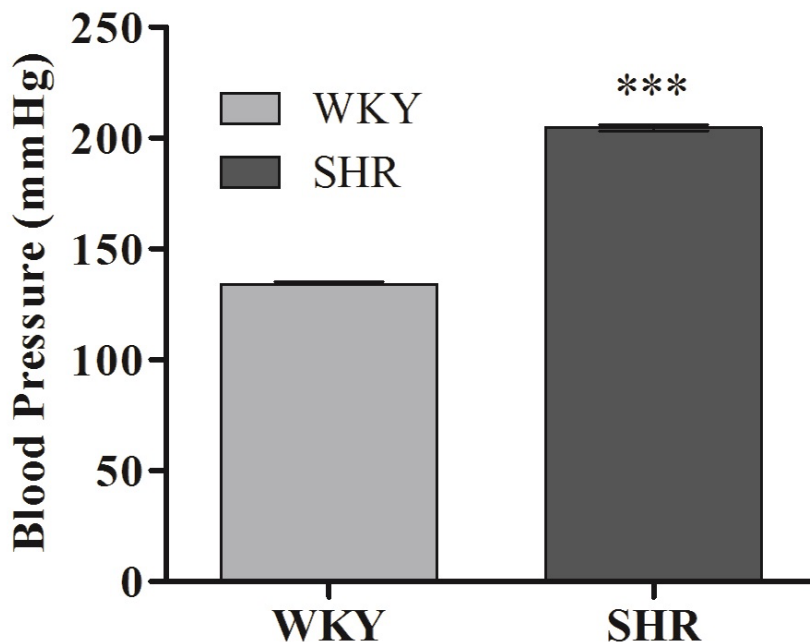
conjugated secondary antibodies (1:80.000; Sigma, St. Louis, USA). The Image-J program was used for densitometric analysis and quantification of relative changes in protein expression.

## Statistical analysis

The results are presented as mean  $\pm$  SE. Non-repeated measurements (blood pressure, HO expression, and the maximum contraction/dilation responses-E<sub>max</sub>) were evaluated by t-test (between groups) and paired t-test (within groups). Differences between the dose-response curves were tested for significance using two-way ANOVA for repeated measurements, followed by the Newman-Keuls post hoc test. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

Mean arterial blood pressure levels were significantly higher in SHR compared to the WKY control group ( $p < 0.001$ , Fig. 1).

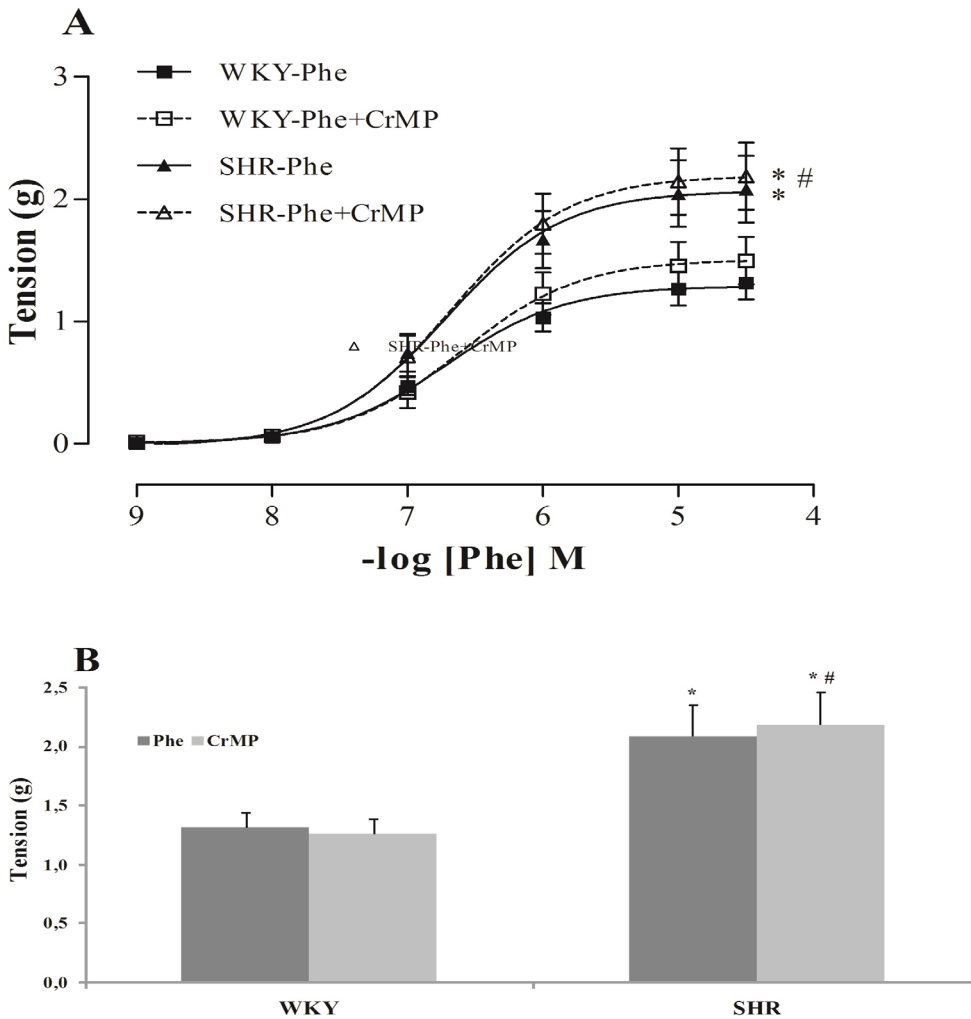


**Figure 1.** Systolic blood pressure (mmHg).  
\*\*\* $p < 0.001$  difference from WKY

### Endogenous CO responses

The differences between the contraction response to Phe and the endogenously produced CO response after pre-incubation with CrMP and exposure to Phe are shown in Fig. 2. Contraction dose-response curves to Phe were significantly higher in the SHR group compared to normotensive animals ( $p < 0.05$ , Fig. 2A). When the HO inhibitor CrMP was used for pre-incubation prior to Phe application, no statistical change in contraction responses was seen in the WKY

group, while a significant increase was observed in the SHR group ( $p < 0.05$ , Fig. 2B). Comparison of  $E_{max}$  values of Phe constriction between the groups demonstrated significantly higher values in the SHR group than the WKY group ( $p < 0.05$ , Fig. 2B). Comparison of  $E_{max}$  values of Phe constriction between samples with and without CrMP pre-incubation showed no difference in the normotensive group, but a statistically significant difference in the hypertensive group ( $p < 0.05$ , Fig. 2B).



**Figure 2.** Constriction responses in renal resistance artery rings induced by Phe, A; Dose-response curves to Phe at baseline and in the presence of HO inhibitor CrMP, B;  $E_{max}$  values at baseline and in the presence of HO inhibitor CrMP. \*  $p < 0.05$  difference from WKY, #  $p < 0.05$  difference from basal Phe contractions for each group

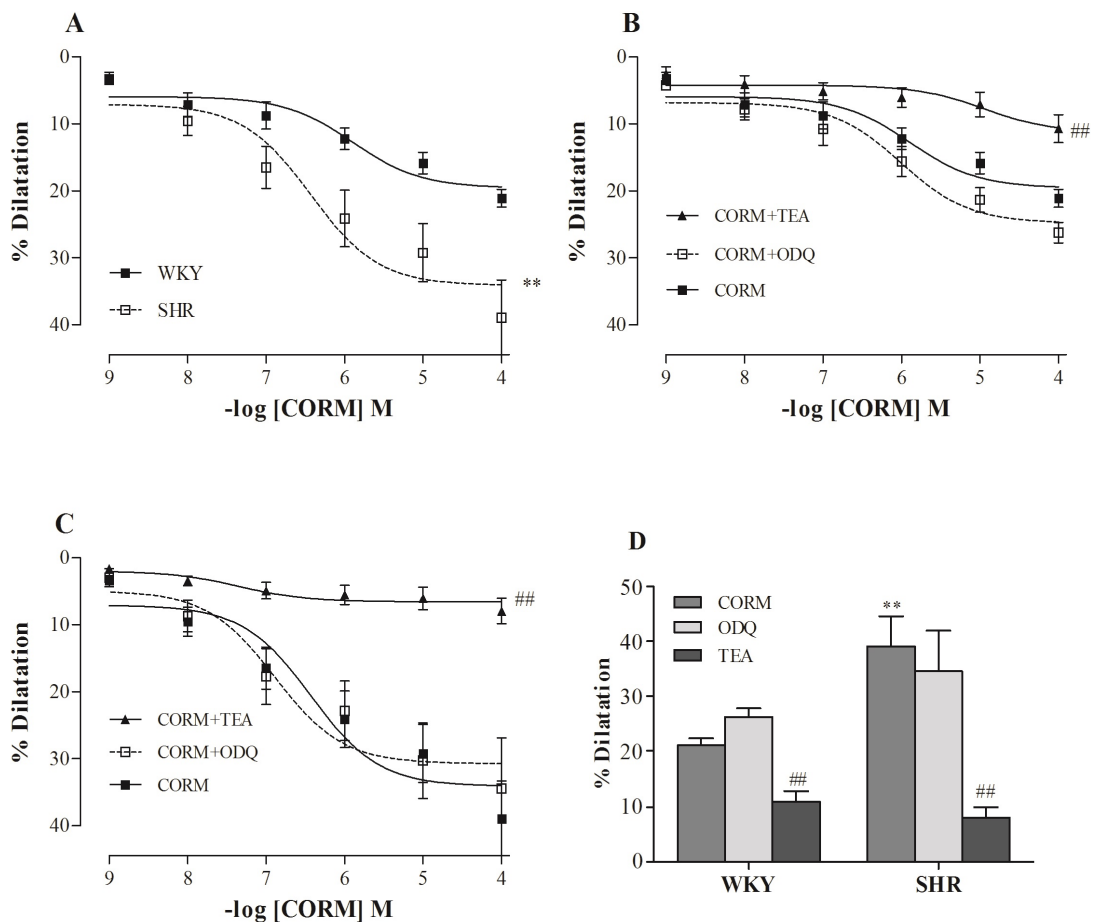
## Exogenous CO responses

Relaxation dose-response curves to the CO donor, CORM, as well as Emax values, were statistically higher in the SHR group compared to the WKY group ( $p < 0.01$ , Fig. 3A and D). However, CORM responses after pre-incubation with ODQ or TEA were similar in WKY (Fig. 3B and D) and SHR (Fig. 3C-D) groups. CORM relaxation patterns were similar in both the groups with or without ODQ pretreatment, while TEA pre-incubation resulted in suppression of the CORM-

induced relaxation response and Emax values in both groups ( $p < 0.01$ ).

## HO-1 and 2 expressions

No differences in HO-2 protein expression was observed between the groups (Fig. 4B), but HO-1 expression was found to be higher in the SHR group compared to the normotensive control group ( $p < 0.01$ , Fig. 4A).



**Figure 3.** Dose-response curves in renal resistance artery rings for dilatation induced by CORM and maximal dilatation responses,

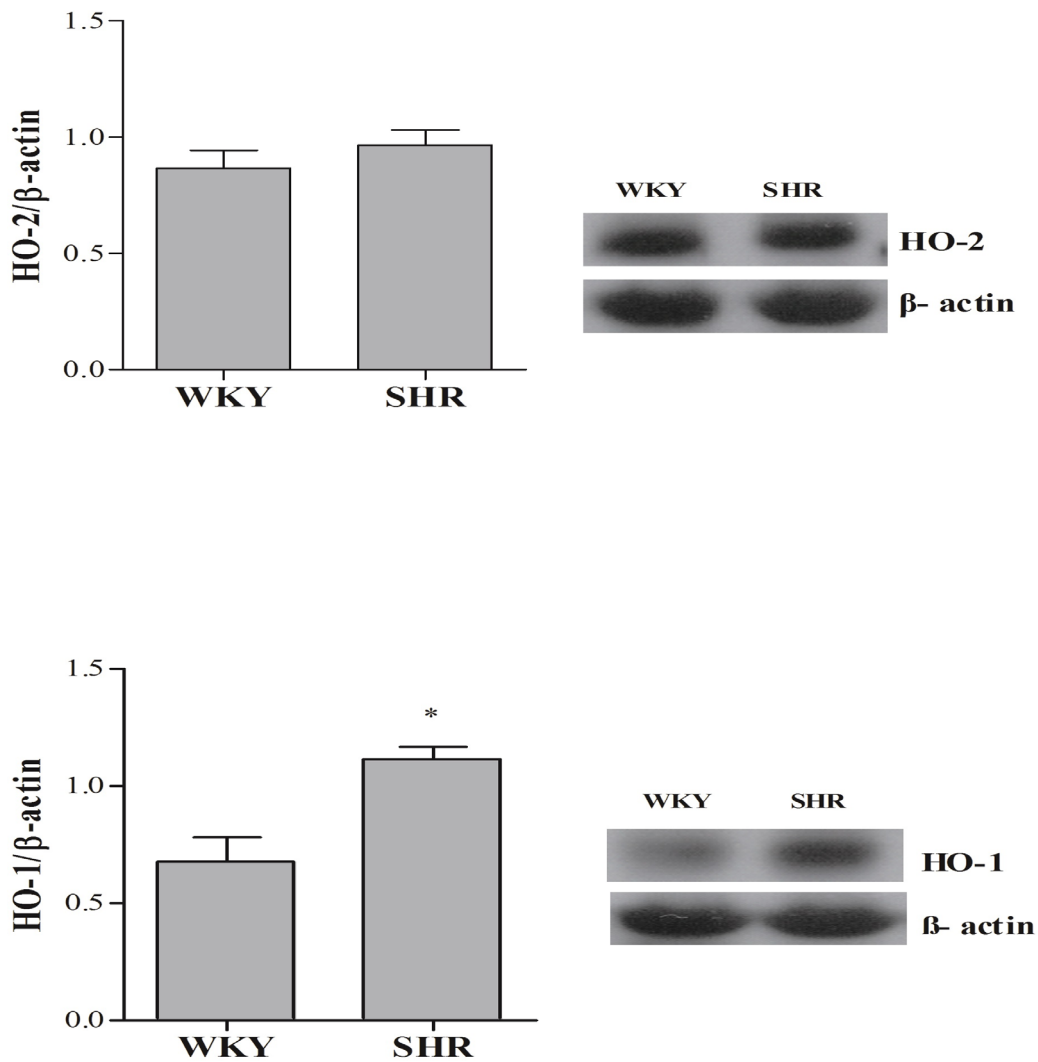
A; Curves representing CORM responses in both groups,

B; CORM responses in WKY at baseline and after pre-incubation with ODQ or TEA,

C; CORM responses in SHRs at baseline and after pre-incubation with ODQ or TEA,

D; Emax values at baseline and after pre-incubation with QDQ or TEA in experimental groups.

\*\*  $p < 0.01$  difference from WKY, ##  $p < 0.01$  difference from basal CORM within groups



**Figure 4.** HO enzyme expression in renal resistance artery rings.

A; HO-1 expression,

B; HO-2 expression.

\*  $p < 0.05$  difference from WKY

## DISCUSSION

The kidneys are most the important organs to be affected by hypertension. This study investigated the contribution of the HO/CO system to vascular tone in renal resistance arteries in SHR. Important findings of our study are; 1- The vasodilatory effect and endogenously contribution of CO increases because of the elevated HO-1 enzyme expression in renal

resistance arteries in SHR. 2-The vasodilatation response of CO primarily is induced by potassium channels in renal resistance arteries.

The contribution of CO to the regulation of blood pressure has been shown in various experimental hypertensive models (21). We used SHR, which is a model of essential hypertension in humans, in our study. As expected, the blood pressure values were found to be significantly higher in the SHR group

compared to the normotensive controls. In addition, greater vasoconstrictive responses in renal resistance arteries of SHR reflect an increase in vascular tone. The increase in vasoconstrictive responses in SHR induced by Phe is presented in other studies as well (21-23). However, the original finding of our study is that CO contributes to the increased vascular responses of renal resistance arteries in SHR. Phe-induced constrictive responses in hypertensive animals, repeated after CRMP incubation (HO enzyme inhibitor), were seen in SHR to a greater extent than in controls. The additional increase in the already elevated vascular tone in SHR can be explained by the lack of compensatory effect of CO due to HO inhibition. However it is well known that the role of CO as a vasodilator and protective agent in renal circulation (2, 12, 24, 25) under physiological and some pathophysiological conditions, its protective effects against to elevated vascular tone in SHR was shown first time in this study.

The findings of Western blotting procedure for HO protein expression levels in renal resistance arteries support the hypothesis that CO has compensatory effects against the constrictive effects of Phe. Our expression results for the HO-2 enzyme, the constitutive form of HO, showed no differences between the groups, similar to the findings from other studies (26, 27). However, the expression of HO-1, the inducible form of HO, was significantly higher in the SHR group compared to the controls. Taken together, these results suggest that HO-1-derived CO contributes to the alleviation of the increased vascular tone in renal vascular tissues of SHR. After the detection of elevated endogenous CO production in hypertensive animals, we proceeded to examine possible changes in responses to CO by

evaluating the relaxation responses to CORM, a CO donor. Renal resistance arteries in the SHR group exhibited significantly increased dilation of 39% in SHR and 21% in WKY controls after CORM incubation.

CO exerts its vasodilator effect mainly by increasing the intracellular levels of cGMP (28) or by opening calcium-activated potassium channels (BKCa) in smooth muscles (29). The effects of CO on the relaxation mechanism were investigated by the inhibition of cGMP production and by the blockage of potassium channels by ODQ and TEA, respectively. Relaxation responses were not altered in either group after incubation with ODQ, but TEA incubation suppressed CORM-induced dilation by inhibiting potassium channels; a greater decline in relaxation responses was observed in the SHR group (39% to 7.9%) compared to the WKY group (21% to 10%). These data suggest a role of potassium channels in CO-dependent relaxation responses in renal resistance arteries of SHR. These results are supported by previous studies, which revealed an increased conductance of potassium ions and BKCa density in aortas of SHR (30, 31). A higher number of BKCa channels on the vascular smooth muscle surfaces may lead to improved vasodilation responses to exogenously applied CO.

The results of the present study indicate that CO production stimulated by an increase in HO-1 enzyme expression contributes to the suppression of vascular tone in renal resistance arteries. Relaxation responses to exogenous CO in renal resistance arteries were also improved. The compensatory effect of CO in renal resistance arteries of hypertensive animals is an important finding for delay in impairment in renal function.

## ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by Akdeniz University Research Projects Unit (Project number 04.01.0200.004).

## REFERENCES

1. Chan EC, Dusting GJ, Liu GS, Jiang F. Redox mechanisms of the beneficial effects of heme oxygenase in hypertension. *J Hypertens.* 2014;32(7):1379-86;87.
2. Ndisang JF, Tabien HE, Wang R. Carbon monoxide and hypertension. *J Hypertens.* 2004;22(6):1057-74.
3. Botros FT, Prieto-Carrasquero MC, Martin VL, Navar LG. Heme oxygenase induction attenuates afferent arteriolar autoregulatory responses. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295(4):904-11.
4. Botros FT, Navar LG. Interaction between endogenously produced carbon monoxide and nitric oxide in regulation of renal afferent arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(6):2772-8.
5. Ushiyama M, Morita T, Katayama S. Carbon monoxide regulates blood pressure cooperatively with nitric oxide in hypertensive rats. *Heart Vessels.* 2002;16(5):189-95.
6. Kim YM, Pae HO, Park JE, Lee YC, Woo JM, Kim NH, et al. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(1):137-67.
7. Thorup C, Jones CL, Gross SS, Moore LC, Goligorsky MS. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol.* 1999;277:882-9.
8. Rodriguez F, Zhang F, Dinocca S, Nasjletti A. Nitric oxide synthesis influences the renal vascular response to heme oxygenase inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284(6):1255-62.
9. Zou AP, Billington H, Su N, Cowley AW, Jr. Expression and actions of heme oxygenase in the renal medulla of rats. *Hypertension.* 2000;35:342-7.
10. Aizawa T, Ishizaka N, Taguchi J, Nagai R, Mori I, Tang SS, et al. Heme oxygenase-1 is upregulated in the kidney of angiotensin II-induced hypertensive rats : possible role in renoprotection. *Hypertension.* 2000;35(3):800-6.
11. Arregui B, Lopez B, Garcia Salom M, Valero F, Navarro C, Fenoy FJ. Acute renal hemodynamic effects of dimanganese decacarbonyl and cobalt protoporphyrin. *Kidney Int.* 2004;65(2):564-74.
12. O'Donoghue TL, Walker BR. Renal vasodilatory influence of endogenous carbon monoxide in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(6):2908-15.
13. Wiesel P, Patel AP, Carvajal IM, Wang ZY, Pellacani A, Maemura K, et al. Exacerbation of chronic renovascular hypertension and acute renal failure in heme oxygenase-1-deficient mice. *Circ Res.* 2001;88(10):1088-94.
14. Pradhan A, Umezu M, Fukagawa M. Heme-oxygenase upregulation ameliorates angiotensin II-induced tubulointerstitial injury and salt-sensitive hypertension. *Am J Nephrol.* 2006;26(6):552-61.
15. Jadhav A, Torlakovic E, Ndisang JF. Hemin therapy attenuates kidney injury in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(3):521-34.

16. Artunc F, Amann K, Nasir O, Friedrich B, Sandulache D, Jahovic N, et al. Blunted DOCA/high salt induced albuminuria and renal tubulointerstitial damage in gene-targeted mice lacking SGK1. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(9):737-46.
17. Shimamura T. 11-Deoxycorticosterone-induced hypertension, glomerulosclerosis and renal arterial and arteriolar lesions. *Jpn J Exp Med* 1988;58(5):225-8.
18. Leh S, Hultstrom M, Rosenberger C, Iversen BM. Afferent arteriopathy and glomerular collapse but not segmental sclerosis induce tubular atrophy in old spontaneously hypertensive rats. *Virchows Arch* 2011;459(1):99-108.
19. Ofstad J, Iversen BM. The interlobular artery: its possible role in preventing and mediating renal disorders. *Nephrol Dial Transplant* 1988;3(2):123-9.
20. Hultstrom M. Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2012;30(6):1087-91.
21. Kong JQ, Taylor DA, Fleming WW. Mesenteric vascular responses of young spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991;258(1):13-7.
22. Nilsson H, Folkow B. Vasoconstrictor nerve influence on isolated mesenteric resistance vessels from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand*. 1982;116(2):205-8.
23. Coelho EB, Ballejo G, Salgado MC. Nitric oxide blunts sympathetic response of pregnant normotensive and hypertensive rat arteries. *Hypertension*. 1997;30:585-8.
24. Kaide JI, Zhang F, Wei Y, Jiang H, Yu C, Wang WH, et al. Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. *J Clin Invest*. 2001;107(9):1163-71.
25. Kaide J, Zhang F, Wei Y, Wang W, Gopal VR, Falck JR, et al. Vascular CO counterbalances the sensitizing influence of 20-HETE on agonist-induced vasoconstriction. *Hypertension*. 2004;44(2):210-6.
26. Ndisang JF, Wang R. Alterations in heme oxygenase/carbon monoxide system in pulmonary arteries in hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228(5):557-63.
27. Ndisang JF, Wang R. Age-related alterations in soluble guanylyl cyclase and cGMP pathway in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2003;21(6):1117-24.
28. Christodoulides N, Durante W, Kroll MH, Schafer AI. Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation*. 1995;91(9):2306-9.
29. Wang R, Wang Z, Wu L. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *Br J Pharmacol*. 1997;121(5):927-34.
30. Rusch NJ, De Lucena RG, Wooldridge TA, England SK, Cowley AW, Jr. A Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> current is enhanced in arterial membranes of hypertensive rats. *Hypertension*. 1992;19(4):301-7.
31. Liu Y, Pleyte K, Knaus HG, Rusch NJ. Increased expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels in aorta of hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30(6):1403-9.



# TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatri Polikliniği'ne başvuran akut üst solunum yolu enfeksiyonu tanılı çocuklarda influenza virüs tip A/B ve A grubu beta hemolitik streptokok birlikteliğinin araştırılması

Investigation of the coexistence of influenza type virus A/B and group A beta haemolytic streptococcus in children diagnosed with acute upper respiratory infection presenting to the pediatric outpatient clinic of TOBB ETU Medical Faculty Hospital

Neşe İNAN<sup>1</sup>, Nazife Yasemin ARDIÇOĞLU-AKIŞIN<sup>2</sup>, Ayyüce UÇARSU<sup>3</sup>, Berk ATALAY<sup>3</sup>, Berrak SOPACI<sup>3</sup>, Gülce HÜRKAL<sup>3</sup>, Mustafa Ziya PAÇACI<sup>3</sup>, Taha TUNÇKAŞIK<sup>3</sup>, Jülide Sedef GÖÇMEN<sup>4</sup>

## ÖZET

**Amaç:** Solunum yolunun bakteri ve virüslerle olan koenfeksiyonları tüm dünyada yaygın bir sağlık problemidir. Akut üst solunum yolu enfeksiyonları (ÜSYE) çocuk yaş grubunda en sık görülen enfeksiyonlardandır. Bu çalışmada akut üst solunum yolu enfeksiyonu şikâyeti ile TOBB ETÜ Hastanesi Pediatri Polikliniği'ne başvuran çocuk hastalarda Influenza virüs tip A/B ve A grubu beta Hemolitik streptokok (AGBHS) enfeksiyonlarının yaş gruplarına ve yıllara göre görülme sıklıkları ve birlikte görülme oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** 1 Ocak 2015 - 31 Temmuz 2019 tarihleri arasında TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatri Polikliniği'ne başvuran akut ÜSYE tanısı almış ve eş zamanlı boğaz kültürü, hızlı Strep A antijen testi ve Influenza virüs tip A/B testi yapılmış, 0-18 yaş arası hastaların verileri hastane bilgi sisteminden taranarak çalışmaya dahil edilmiştir.

**Bulgular:** Akut üst solunum yolu enfeksiyonu tanısı ile aynı gün boğaz kültürü, hızlı Strep A antijen testi

## ABSTRACT

**Objective:** Coinfections of the respiratory tract due to bacteria and viruses are a common health problem worldwide. Acute upper respiratory tract infections (URTI) are among the most common infections in the pediatric age group. This study aimed to determine the incidence and co-occurrence rates of Influenza virus A/B and AGBHS infections according to age groups and years in children who applied to TOBB ETU Hospital Pediatric's Clinic with the complaint of acute URTI.

**Methods:** The data of patients between the ages of 0-18, who were admitted to TOBB ETU Medical Faculty Hospital Pediatric's Outpatient Clinic between 1 January 2015 and 31 July 2019 with the diagnosis of acute URTI tested for simultaneous throat culture, which rapid Strep A antigen test and influenza virus type A / B test, obtained from the hospital information system and analysed.

**Results:** The results of a total of 2515 (1203 F / 1312 M) patients between the ages of 0-18 years, who

<sup>1</sup>TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara

<sup>2</sup>TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, Ankara

<sup>3</sup>TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Dönem 1 Öğrencileri, Ankara

<sup>4</sup>TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Neşe İNAN

Yaşam Caddesi No: 5 Söğütözü 06510 Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : neseurdogan@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 13.05.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 12.08.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.81594

İnan N, Ardiçoğlu-Akışın NY, Uçarısı A, Atalay B, Sopacı B, Hürkal G, Paçacı MZ, Tunçkaşık T, Göçmen JS. TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatri Polikliniği'ne başvuran akut üst solunum yolu enfeksiyonu tanılı çocuklarda influenza virüs tip A/B ve A grubu beta hemolitik streptokok birlikteliğinin araştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 431-440

ve Influenza virüs tip A/B testleri yapılmış 0-18 yaş arası, toplam 2515 (1203 K/1312 E) hastanın sonuçları hastane kayıtlarından incelenmiştir. AGBHS %24, Influenza A virüsü %18, Influenza B virüsü %9 oranında pozitif saptanmıştır. AGBHS pozitifliği en yüksek %30 olarak 7-11 yaş grubunda, en düşük %15 ile 0-2 yaş grubunda belirlenmiştir. Influenza A virüs pozitifliği 3-6 yaş, 7-11 yaş, 12-18 yaş gruplarında sırası ile %18, %18, %17 olarak benzer yüzdelerde saptanırken, 0-2 yaş grubunda %12 ile en düşüktür. Influenza B virüs pozitifliği %13 ile en yüksek 7-11 yaş grubunda görülmüştür. Cinsiyete göre ise AGBHS, Influenza virüs tip A/ B pozitiflikleri benzerdir. Influenza A virüsü pozitif hastaların %19'unda, Influenza B virüsü pozitif hastaların ise %26'sında AGBHS birlikteliği saptanmıştır. Mevsimlere göre değerlendirme yapıldığında Influenza virüs tip A/B ve AGBHS birlikteliği en yüksek kış ve ilkbahar aylarında saptanmıştır.

**Sonuç:** Influenza virüslerinin bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlığı arttırdığı, sekonder bakteriyel enfeksiyonların morbidite ve mortalitede anlamlı oranda artışa neden olduğu bilinmektedir. ÜSYE endikasyonu ile başvuran hastaların %45-66'sına gereksiz antibiyotik reçetelenmektedir. Influenza salgınları sırasında eş zamanlı görülen bakteriyel enfeksiyonların tanısı bu nedenle önemlidir. Influenza virüs enfeksiyonları ile birlikte görülen bakteriyel enfeksiyonların varlığı kanıtlandığında, antiviral ajanın yanında tedaviye antibakteriyel ilaç eklenmesinin kararı gündeme gelmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** A grubu beta-hemolitik streptokok, boğaz kültürü, influenza virüs tip A/B, üst solunum yolu enfeksiyonu

were simultaneously diagnosed with acute URTI and who had simultaneous throat culture, rapid Strep A antigen test and influenza virus type A/B tests were examined. AGBHS, Influenza virus type A/ B were found 24%, 18%, 9% positive, respectively. While AGBHS positivity was found at the highest in the 7-11 age group (30%) and it was found at the lowest rate (%15) in the 0-2 year group. Influenza A virus positivity was found at similar rates as 18%, 18%, 17%, in the 3-6, 7-11 and 12-18 year group, respectively and in the 0-2 year group, the lowest rate was reported as 12%. Influenza B virus positivity was highest in the 7-11 age group with a rate of 13%. According to gender, AGBHS, influenza virus type A/ B positivity were similar. %19 of influenza A and 26% of influenza B virus positive patients coexistence of AGBHS were detected. When evaluated according to seasons, Influenza type A/B and AGBHS coexistence were high both in winter and spring months.

**Conclusion:** It is known that influenza viruses increase susceptibility to bacterial infections and secondary bacterial infections cause a significant increase in morbidity and mortality. Unnecessary antibiotics are prescribed to 45-66% of the patients who apply for URI. It is therefore important to diagnose bacterial coinfections during influenza virus outbreaks. The decision to add the antibacterial drug to the treatment along with antiviral agent should be considered when presence of bacterial infections with influenza viruses are proven.

**Key Words:** Group A beta haemolytic streptococcus, throat culture, influenza virus type A /B, upper respiratory tract infection

## GİRİŞ

Solunum yollarında görülen bakteriyel ve viral etkenlere bağlı koenfeksiyonlar tüm dünyada yaşamı tehdit eden küresel sağlık yüklerindedir (1). Viral enfeksiyonlar, eş zamanlı veya ardışık gelişen koenfeksiyon veya süperenfeksiyon olarak bilinen

bakteri enfeksiyonları ile komplike olurlar ve bu sinerjistik etki nedeni ile bu enfeksiyonların neden olduğu mortalite, virüs veya bakterinin tek başına yol açtığı mortaliteden çok daha yüksektir (2). Çocukluk döneminde, hastaneye başvuruların %60'ından ve

hastaneye yatışların dörtte birinden solunum yolu enfeksiyonları sorumludur (3). Akut üst solunum yolu enfeksiyonları (ÜSYE) çocuk yaş grubunda en sık görülen enfeksiyonlardan olup klinikte viral veya bakteriyel tonsillofarenjit gibi tablolarla karşımıza çıkabilirler (4). Akut tonsillofarenjitlerin %50'sinden Rhinovirus, Coronavirus, Adenovirus, Parainfluenza ve Influenza virüsleri gibi solunum virüsleri sorumludurlar (5, 6, 7). Enfeksiyonların çoğu yılın soğuk aylarında solunum hastalıkları sezonu süresince görülmekte, özellikle Influenza virüsleri Aralık-Nisan aylarında epidemiler yapmaktadır (6).

A grubu beta hemolitik streptokok (AGBHS), *Streptococcus pyogenes* akut tonsillofarenjitlerin en sık görülen bakteriyel etkenidir (7). AGBHS'nin doğru tanısı ve uygun antibiyotiklerle tedavisi; klinik bulgu ve semptomların şiddetinin ve süresinin azaltılması, akut romatizmal ateş, post-streptokokkal reaktif artrit gibi komplikasyonların önlenmesi ve bulaşıcılığın azatılması açısından oldukça önemlidir (5, 6). Sadece klinik tabloya bakılarak akut ÜSYE'nin viral ve bakteriyel etken ayrımının yapılması güçtür (7,8). Alt solunum yolu enfeksiyonlarında Influenza virüslerinin bakteri ile koenfeksiyonları yaygın olarak görülmekteyken, tonsillofarenjit etkenleri olarak Influenza virüsleri ve AGBHS'nin birlikteliği genellikle göz önünde bulundurulmamaktadır (8).

Günümüzde hızlı antijen testleri ile Influenza virüs tip A/B ve AGBHS tanısı yüksek duyarlılık ve özgüllükle konulabilmekte, pozitif test sonuçlarına göre antiviral veya antibiyotik tedavisi başlanarak hastalar tedavi edilebilmektedir. Nonspesifik klinik bulgularla seyreden vakalarda sadece Influenza virüsü veya sadece AGBHS hızlı testlerinin yapılması, Influenza virüs tip A/B ve AGBHS'nin birlikteliği hakkında fikir vermemektedir. Bu çalışmada akut üst solunum yolu enfeksiyonu şikâyeti ile TOBB ETÜ Hastanesi Pediatri Polikliniği'ne başvuran çocuk hastalarda Influenza virüs tip A/B ve AGBHS enfeksiyonlarının yaş gruplarına ve yıllara göre görülme sıklıkları ve birlikte görülme oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

1 Ocak 2015- 31 Temmuz 2019 tarihleri arasında TOBB ETÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Pediatri Polikliniği'ne başvuran akut üst solunum yolu enfeksiyonu tanısı almış ve aynı gün boğaz kültürü, hızlı Strep A testi ve Influenza virüs tip A/B testi yapılmış, 0-18 yaş arası 2515 hastanın verileri hastane bilgi sisteminden taranarak çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı dönemde sadece Influenza virüs tip A/B testi ya da sadece hızlı Strep A testi yapılmış hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Influenza virus tip A/B tanısında, nazofarenks sürüntü örnekleri Quidel® Sofia® Influenza virus tip A/B Fluorescent Immunoassay (FIA) testi (Quidel Corporation,USA) kullanılarak çalışılmıştır. AGBHS tanısında ise bir adet boğaz sürüntü örneği hızlı Strep A antijen testi olan QuickVue® Dipstick Strep A (Quidel Corporation,USA) ile çalışılmış, hastadan aynı zamanda alınan ikinci boğaz sürüntü örneği Columbia agar+%5 Koyun kanlı besiyerine (Biomérieux, Fransa) ekilmiştir. Ekilen besiyerleri 35-37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra beta hemoliz yapmış kolonilerin basitrasın duyarlılığına bakılarak AGBHS tanısı konmuştur. Hızlı Strep A testi pozitif ve/veya kültürde AGBHS üremesi olan hastalar AGBHS açısından pozitif olarak kabul edilmiştir. AGBHS kültür, hızlı Strep A testi ve Influenza virüs tip A/B oranları, hastalık etkenlerinin yaş grubu ve mevsimlere göre dağılımı, Influenza A ve B virüsü pozitif saptanan hastalarda AGBHS sıklığı ve birlikteliği, hastane kayıtlarından değerlendirilmiştir. Çalışma Etik kurul tarafından KAEK-118/036 protokol sayısı ile onaylanmıştır.

## BULGULAR

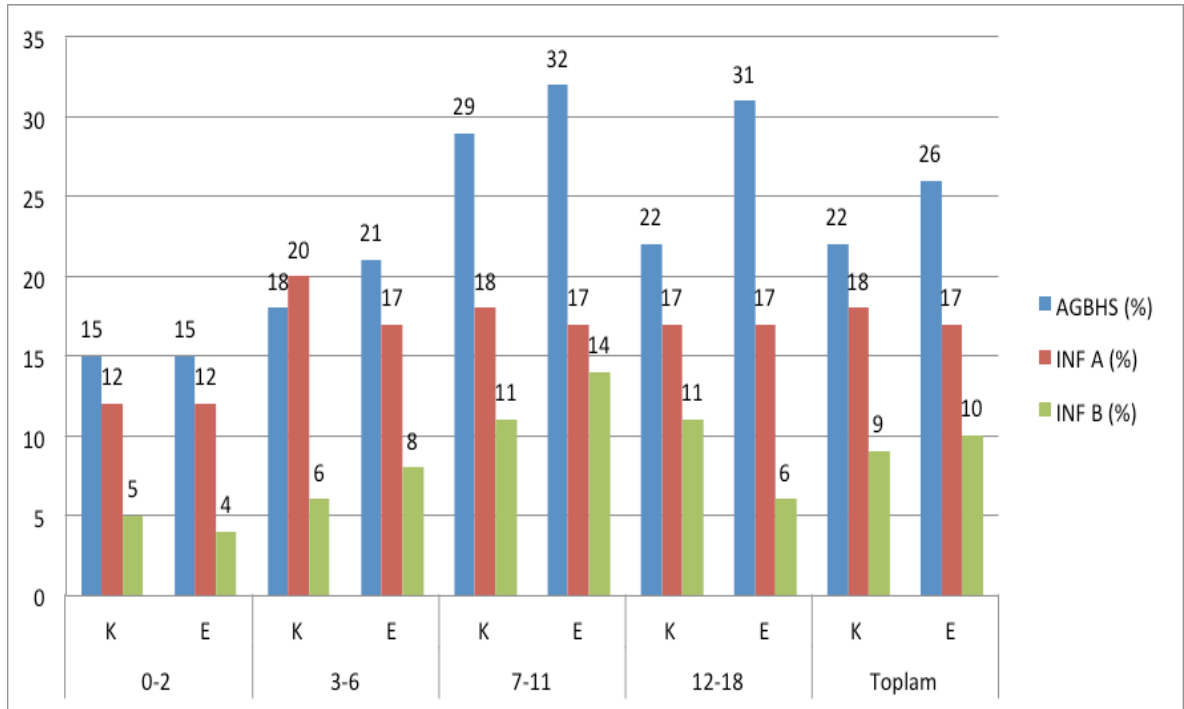
Akut üst solunum yolu enfeksiyonu tanısı ile eş zamanlı boğaz kültürü, hızlı Strep A antijen testi ve Influenza virüs tip A/B testleri yapılmış 0-18 yaş arası, toplam 2515 (1203K/1312 E) hastanın sonuçları hastane kayıtlarından incelenmiş olup yaş aralığı, mevsim ve yıllara göre değerlendirilmiştir. Eşzamanlı Influenza

virüs tip A/B, boğaz kültürü ve hızlı Strep A testi yapılan hastalarda; boğaz kültürlerinin %23 (586/2515)'ünde, hızlı Strep A testlerinin ise %12 (299/2515)'inde AGBHS saptanmıştır. AGBHS pozitifliği belirlenirken boğaz kültürü pozitifliği ve/veya hızlı Strep A testi sonucu gözönünde bulundurulmuş ve %24 (613/2515) olarak belirlenmiştir.

A grubu beta-hemolitik streptokok, Influenza A ve B virüs pozitifliklerinin yaşa ve cinsiyete göre dağılımı Şekil-1'de gösterilmiştir. AGBHS %24 (613/2515), Influenza A virüsü %18 (442/2515), Influenza B virüsü %9 (232/2515) oranında pozitif bulunmuştur. AGBHS pozitifliklerinin %30 (283/928) 7-11 yaş grubunda, %15 (18/118)'i 0-2 yaş grubunda bulunmuştur. Influenza virüs A pozitifliklerinin 3-6 yaş, 7-11 yaş, 12-18 yaş gruplarında dağılımı sırası ile %18 (204/1116), %18 (164/928), %17 (60/353) olarak benzer yüzdelerde iken, 0-2 yaş grubunda ise %12 (14/118) bulunmuştur.

Influenza virüs B pozitifliğinin %13 (116/928)'ü 7-11 yaş grubunda görülmüştür. Cinsiyetler göz önüne alındığında ise AGBHS, Influenza A ve Influenza B virüslerinin pozitifliğinin erkek ve kadınlarda sırasıyla %26 ile %22, %17 ile %18, %10 ile %9 gibi benzer yüzdelerde görüldüğü saptanmıştır. Ayrıca, yaşlara ve cinsiyetlere göre Influenza virüs tip A/B ve AGBHS birlikteliği de incelenmiştir (Tablo 1). Influenza A virüsü pozitif olan hastalarda yaşlara göre %7-24 (toplamda %19) arasında eş zamanlı AGBHS, Influenza B virüsü pozitif hastaların da %10-50 (toplamda %26) arasında eş zamanlı AGBHS pozitifliği saptanmıştır. Influenza A virüsü pozitif erkek ve kadın hastalarda eş zamanlı AGBHS görülme yüzdeleri %21 ile %16 iken Influenza B virüsü pozitif erkek ve kadın hastalarda eş zamanlı AGBHS görülme yüzdeleri %28 ile %24 olarak bulunmuştur.

A grubu beta hemolitik streptokok, Influenza



Şekil 1. 1 Ocak 2015-31 Temmuz 2019 tarihinde ÜSYE şikayeti ile başvuran çocuk hastalarda AGBHS ve Influenza A/B pozitifliğinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı

\*ÜSYE Üst solunum yolu enfeksiyonu AGBHS A grubu beta hemolitik streptokoklar, INF A Influenza A, INF B Influenza B

**Tablo 1.** 1 Ocak 2015-31 Temmuz 2019 tarihleri arasında ÜSVE şikayeti ile başvuran Influenza A ve Influenza B virüsü saptanan çocuk hastalarda yaşa ve cinsiyete göre AGBHS birlikteliğinin dağılımı.

YAŞ	cinsiyet	n	AGBHS		INF A		INF B		INF A (+)		INF B (+)	
			POZ	%	POZ	%	POZ	%	AGBHS	%	AGBHS	%
0-2	K	66	10	15	8	12	3	5	0	0	0	0
	E	52	8	15	6	12	2	4	1	17	1	50
	T	118	18	15	14	12	5	4	1	7	1	20
3-6	K	527	95	18	104	20	34	6	13	13	8	24
	E	589	124	21	100	17	47	8	18	18	12	26
	T	1116	219	20	204	18	81	7	31	15	20	25
7-11	K	431	125	29	79	18	48	11	19	24	14	29
	E	497	158	32	85	17	68	14	20	24	21	31
	T	928	283	30	164	18	116	13	39	24	35	30
12-18	K	179	39	22	30	17	20	11	4	13	3	15
	E	174	54	31	30	17	10	6	7	23	1	10
	T	353	93	26	60	17	30	8	11	18	4	13
Toplam	K	1203	269	22	221	18	105	9	36	16	25	24
	E	1312	344	26	221	17	127	10	46	21	35	28
	T	2515	613	24	442	18	232	9	82	19	60	26

\*AGBHS A grubu beta hemolitik streptokoklar, INF A Influenza A, INF B Influenza B

A ve B virüslerinin pozitifliklerinin yıllara ve mevsimlere göre dağılımı Tablo 2' de gösterilmiştir. AGBHS pozitiflikleri %24 ve %25 olmak üzere kış ve ilkbaharda yüksek yüzdelerde saptanırken, yaz aylarında %12 gibi düşük değerdedir. Influenza A virüsü pozitifliklerinin %25'i en yüksek kış aylarında gözlenirken, Influenza B virüsü pozitifliği %18 ile en yüksek ilkbaharda saptanmıştır. Her üç testin birlikte istendiği üst solunum yolu enfeksiyonu olan hasta sayıları 2015'te 163 iken, 2016'da 301, 2017'de 544,

2018'de 699 ve 2019'da 808 şeklinde düzenli olarak arttığı dikkat çekmektedir. Influenza A virüsü ve AGBHS birlikteliği en çok 2017 yılında %25 (25/100), Influenza B virüsü ve AGBHS birlikteliği ise en çok 2018 yılında %39 (12/31) görülmüştür. Mevsimlere göre değerlendirme yapıldığında hem Influenza A virüsü ve AGBHS birlikteliği hem de Influenza B virüsü ve AGBHS birlikteliği en yüksek kış %19 (77/414) ile %27 (25/93) ve ilkbahar %18 (4/22) ile %25 (35/139) aylarında saptanmıştır (Tablo 3).

**Tablo 2.** 1 Ocak 2015-31 Temmuz 2019 tarihleri arasında ÜSYE şikayeti ile başvuran çocuk hastaların yıllara ve mevsimlere göre AGBHS ve Influenza A/B virüs pozitifliklerinin değerlendirilmesi

YIL	MEVSİM	n	AGBHS (+) n (%)	INF A (+) n (%)	INF B (+) n (%)
2015	K	77	11 (%14)	18 (%23)	5 (%7)
	İ	86	17 (%20)	11 (%12)	13 (%15)
	T	163	28 (%17)	29 (%18)	18 (%11)
2016	K	206	41 (%20)	46 (%22)	21 (%10)
	İ	81	18 (%22)	1 (%1)	13 (%16)
	Y	3	1 (%33)	0	0
	S	11	2 (%18)	0	0
	T	301	62 (%21)	47 (%16)	34 (%11)
2017	K	431	138 (%32)	91 (%21)	37 (%9)
	İ	93	34 (%37)	4 (%4)	14 (%15)
	Y	2	0	0	0
	S	18	3 (%17)	5 (%28)	0
	T	544	175 (%32)	100 (%18)	51 (%10)
2018	K	571	138 (%24)	144 (%25)	26 (%5)
	İ	104	28 (%27)	2 (%2)	5
	Y	1	0	0	0
	S	23	5 (%22)	1 (%4)	0
	T	699	171 (%24)	147 (%21)	31 (%4)
2019	K	379	76 (%20)	115 (%30)	4 (%1)
	İ	410	99 (%24)	4 (%1)	94 (%23)
	Y	19	2 (%11)	0	0
	T	808	177 (%22)	119 (%15)	98 (%12)
Toplam	K	1664	404 (%24)	414 (%25)	93 (%5)
	İ	774	196 (%25)	22 (%3)	139 (%18)
	Y	25	3 (%12)	0	0
	S	52	10 (%19)	6 (%11)	0
	T	2515	613 (%24)	442 (%18)	232 (%9)

\*AGBHS A grubu beta hemolitik streptokoklar, INF A Influenza A, INF B Influenza B

**Tablo 3.** 1 Ocak 2015- 31 Temmuz 2019 tarihleri arasında ÜSYE şikayeti ile başvuran İnfluenza A ve İnfluenza B virüsü pozitif saptanan çocuk hastalarda yıllara ve mevsimlere göre AGBHS birlikteliğinin dağılımı.

YIL	Mevsim	INF A(+) n	INF (A) + AGBHS n (%)	INF B(+) n	INF B(+) +AGBHS n (%)
2015	K	18	3 (17)	5	0
	İ	11	1 (9)	13	4 (31)
	T	29	4 (14)	18	4 (22)
2016	K	46	8 (17)	21	1 (5)
	İ	1	0	13	2 (15)
	Y	0	0	0	0
	S	0	0	0	0
	T	47	8 (17)	34	3 (9)
2017	K	91	27 (30)	37	16 (43)
	İ	4	2 (50)	14	5 (36)
	Y	0	0	0	0
	S	5	0	0	0
	T	100	25 (25)	51	11 (22)
2018	K	144	26 (18)	26	11 (42)
	İ	2	0	5	1 (20)
	Y	0	0	0	0
	S	1	1 (100)	0	0
	T	147	27 (18)	31	12 (39)
2019	K	115	15 (13)	4	2 (50)
	İ	4	1(25)	94	23 (24)
	Y	0	0	0	0
	T	119	16 (13)	98	25 (26)
Toplam	K	414	77 (19)	93	25 (27)
	İ	22	4 (18)	139	35 (25)
	Y	0	0	0	0
	S	6	1 (17)	0	0
	T	442	82 (19)	232	60 (26)

\*AGBHS A Grubu Beta Hemolitik Streptokoklar, INF A İnfluenza A, INF B İnfluenza B

## TARTIŞMA

Influenza virüs enfeksiyonları, dünya çapında tüm yaş gruplarında geniş spektrumda semptomlara ve komplikasyonlara yol açan, anlamlı oranda morbidite ve mortaliteden sorumlu yaygın görülen solunum patojenlerindedir. Sadece klinik semptomlara bakarak tonsillofarenjitlerin en sık görülen bakteriyel etkeni AGBHS'den ayırt etmek güçtür. Hem Influenza virüs hem de AGBHS tanısı için geliştirilen hızlı testler sayesinde sağlanan hızlı ve doğru tanı; klinik hasta yönetimi, antiviral tedavinin zamanında başlanması, daha az sayıda ek tanısal testlerin uygulanması, enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması, gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi ve hastaneye yatış oranlarında azalma gibi medikal açıdan kritik öneme sahiptir (9, 10, 11).

A grubu beta-hemolitik streptokok, akut tonsillofarenjitlerin en sık görülen bakteriyel etkenidir ve özellikle okul çocuklarında yılın soğuk aylarında %15-30 oranında saptanmaktadır (6). Bu çalışmada boğaz kültürü sonucuna göre hastaların %23'ünde pozitiflik saptanırken, hızlı Strep A antijen testi %12 oranında bulunmuştur. AGBHS tanısı için boğaz kültürü hala altın standart olmakla birlikte sonuç için en az 1-2 gün gerekmesi dezavantajdır. Günümüzde duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksek hızlı antijen testleri sayesinde AGBHS farenjit tanısı 15 dakikadan daha kısa bir sürede konmakta, bu sayede; hastalığın yayılma riski, semptomların süresi, süperatif komplikasyonların görülme sıklığı, okul-iş için kaybolan zaman, uygunsuz antibiyotik kullanım oranı azalmaktadır. Hızlı Strep A antijen testi negatif çıkan hastalarda boğaz kültürü ile doğrulama gerekmektedir (12). Bu çalışmada hızlı Strep A testi pozitifliğinin %12 gibi düşük saptanma nedeni, sadece hızlı Strep A testi ile pozitiflik saptanan boğaz kültürü ve influenza virüs testi yapılmayan hastaların çalışmaya dahil edilmemesidir. ÜŞYE tanısı ile başvuran çocuk hastalarda AGBHS sıklığı %24 olarak saptanırken, pozitifliklerin dağılımı 7-11 yaş grubunda %30 ile en yüksek, 0-2 yaş grubunda ise %15

ile en düşük olarak bulunmuştur.

Dünya Sağlık Örgütüne göre, Influenza virüs enfeksiyonları dünyada tüm ülkeleri etkileyen, her yıl 1 milyar kişide enfeksiyona, 3-5 milyon kişide ciddi enfeksiyonlara neden olan ve 290.000-650.000 kişinin ölümüne yol açtığı tahmin edilen küresel ciddi bir sağlık tehdidir (13). İstanbul'da 669 Influenza virüsünün neden olduğu hastalık benzeri semptomlarla hastaneye başvuran çocuk hastanın dahil edildiği bir çalışmada hızlı antijen testi ile %40,1'nde Influenza virüs pozitifliği saptanırken, %29,9 oranında Influenza virüs A ve %10,2 oranında Influenza virüs B olduğu belirtilmiştir. Influenza virüs pozitif hastaların %42'si antiviral tedavi alırken, Influenza virüs negatif hastaların %65,6'sına antibiyotik tedavisi başlanmıştır (14). Bu çalışmada ÜŞYE şikayeti ile başvuran çocuk hastaların %18'inde Influenza virüs A saptanırken, sadece %9'unda Influenza virüs B pozitifliği saptanmıştır.

A Grubu Beta Hemolitik Streptokok ile enfeksiyon kış ve ilkbahar dönemlerinde, mevsimsel influenza virüs epidemilerinin ve diğer solunum enfeksiyonlarının görüldüğü Aralık-Mart ayları ile aynı döneme rastladığı bilinmektedir (15, 16). Bu çalışmada AGBHS pozitifliği daha önce bildirilen çalışmalarla uyumlu şekilde kış (%24) ve ilkbahar (%25) aylarında daha yüksek saptanırken, Influenza A virüsü en sık kış (%25) aylarında, Influenza B virüsü ise en sık ilkbaharda (%18) saptanmıştır.

İlk kez 1935 yılında Coburn ve Pauli, akut romatizmal ateşi olan bir grup çocukta Influenza virüs epidemisinin AGBHS salgınına takip ettiğini ve AGBHS yayılımını kolaylaştırdığını bildirilmiş ve bu konuya dikkat çekmiştir (17). Dünya çapında 700 milyon AGBHS enfeksiyonunun görüldüğü, 1.8 milyonun ciddi enfeksiyonlar olduğu ve mortalitenin %20'nin üstünde olabileceği bilinmektedir (2). Influenza virüslerinin salgınları süresince bakteriyel koenfeksiyonların hastalığın şiddetini arttırdığı anlaşılmıştır, sekonder enfeksiyon sıklığının %2-65'i bulduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (18).



Influenza virüsleri ile birlikte pnömoni gibi bakteriyel alt solunum yolu koenfeksiyonları yani bakteri-virüs mikst enfeksiyonları yaygın olarak bilinmesine karşın akut tonsillofarenjit tablosunda Influenza virüs ve AGBHS birlikteliği göz önünde bulundurulmamaktadır ve bu konu ile ilgili az sayıda çalışma bildirilmiştir (8, 10). Buna rağmen, mevsimsel Influenza virüsü ile invazif AGBHS enfeksiyonlarının birlikteliğinin klinik tabloyu ağırlaştırdığı ve mortalite oranlarını arttırdığı bildirilmiştir (19-21). Benzer şekilde, 2009 H1N1 Influenza virüsü pandemisinde Influenza A virüsü ve AGBHS ile koenfeksiyonlar geliştiği ve mortalitesi yüksek invazif AGBHS enfeksiyonlarının görüldüğü saptanmıştır (2,22). Gürol ve arkadaşları, mevsimsel Influenza virüs sezonunda 541 tonsillofarenjit tanısı almış hastanın sekizinde eş zamanlı Influenza A virüsü ve üçünde Influenza B virüsü birlikteliğinin olduğunu gösterirken, tüm vakaların antibiyotikle tedavi edildiği, Influenza virüs saptanan hastalardan altısında ek olarak antiviral tedavi olarak oseltamivir verildiğine dikkat çekmişlerdir (8). Bu çalışmada Influenza A virüsü ve AGBHS birlikteliği kış, ilkbahar ve sonbahar aylarında sırasıyla %19, %18 ve %17 ile benzer yüzdelerde bulunurken, Influenza B virüsü ve AGBHS birlikteliği kış aylarında %27, ilkbaharda ise %25 gibi daha yüksek saptanmıştır. İster pandemi, ister mevsimsel Influenza virüs salgın dönemlerinde olsun, Influenza virüslerinin bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlığı arttırdığı, sekonder bakteriyel enfeksiyonların morbidite ve mortalitede anlamlı oranda artışa neden olduğu bilinmektedir (23). Antibiyotiklerin aşırı ve gereksiz kullanımı sonucunda antibiyotik direncinin gelişimi dünya çapında artış gösteren bir problemdir ve antibiyotiklerin aşırı kullanıldığı en önemli endikasyon ÜSYE'dir. ÜSYE'ye

neden olan başlıca etkenler virüsler olmasına karşın ÜSYE endikasyonu ile başvuran hastaların %45-66'sına antibiyotik reçetelenmektedir (24). Influenza virüs salgınları sırasında bakteriyel enfeksiyonların saptanması, antiviral tedavi yanında profilaksi dahil antibakteriyel tedavi stratejilerinin göz önünde bulundurulması açısından önemlidir. Böylelikle Influenza virüs ile birlikte görülen bakteriyel enfeksiyonların ve gelişen komplikasyonların sayısında ve mortalitesinde anlamlı düşüş sağlanabilir (23). Bu çalışmadaki kısıtlılıklar; Influenza virüs tip A/B ve AGBHS birlikteliği saptanan hastaların klinik bulgularının çalışmaya dahil edilememesi, sadece hızlı strep A testi pozitif olan ve kültür yapılmamış AGBHS pozitif hastalardaki Influenza virüs tip A/B birlikteliğinin oranının bilinmemesi ve ayrıca hastane kayıtlarına bağlı kalındığı için AGBHS ile gerçek koenfeksiyon mu yoksa ne kadarı AGBHS taşıyıcı ya da invazif enfeksiyon olduğu konusunda bilgi vermemesidir.

Bu çalışmada, ÜSYE endikasyonu nedeni ile hastaneye başvuran ve mevsimsel Influenza virüs tip A/B enfeksiyonu tanısı alan çocuk hastalarda AGBHS birlikteliğinin saptanması ile etkili antiviral tedavinin yanında erken dönemde antibakteriyel tedavinin uygulanmasının sağlanması ve buna ek olarak, AGBHS'ların komplikasyonlarının azaltılması için dikkat çekmek amaçlanmıştır. Bu durum, hasta sağlığı, toplum sağlığı ve maliyet açısından dikkate alınmalıdır. Bu çalışma sonuçları bize Influenza virüs tip A/B virüsleri ve AGBHS pozitifliğini ve bir arada bulunma oranları ve bunların yaş gruplarına ve mevsimlere göre dağılımını da göstermesi açısından önemlidir.

## KAYNAKLAR

1. Siemens N, Oehmcke-Hecht S, Mettenleiter TC, Kreikemeyer B, Valentin-Weigand P, Hammerschmidt S. Port d'Entrée for Respiratory Infections - Does the Influenza A Virus Pave the Way for Bacteria? *Front Microbiol*, 2017;8:2602.
2. Herrera AL, Huber VC, Chaussee MS. The Association between Invasive Group A Streptococcal Diseases and Viral Respiratory Tract Infections. *Front Microbiol*, 2016; 7:342.
3. Troy NM, Bosco A. Respiratory viral infections and host responses: insights from genomics. *Respir Res*, 2016;17 (1):156.
4. Koturoglu G. Upper respiratory tract infections in children. *The J of Ped Research*, 2015;2 (2):62-5.
5. Günel Ö, Barut HŞ. Akut tonsillofarenjit. *Gaziosmanpaşa ÜTF Dergisi*, 2013;5 (1):1-7.
6. Alcaide ML, Bisno AL. Pharyngitis and epiglottitis. *Infect Dis Clin North Am*, 2007;21 (2):449-69.
7. Tünger Ö. Akut Tonsillofarenjitler. *Celal Bayar Üniv Sağlık Bilimleri Enstitüsü Derg*, 2015;2 (1):2-7.
8. Gurol Y, Romano E, Çoşkun FT, Biçer S, Çelik G. Group A streptococcal infection cases during influenza season 2016 coinfections in influenza season. *Egyptian Ped Assoc Gazette*, 2017;65:31-2.
9. Charlton CL, Babady E, Gincchio CC, Hatchette TF, Jerris RC, Li Y et al. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: Viruses causing acute respiratory tract infections. *Clin Microbiol Rev*, 2018;32.
10. Brook I, Gober AE. Concurrent Influenza A and group A beta-hemolytic streptococcal pharyngotonsillitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2008;117 (4):310-2.
11. Dunn J, Obuekwe J, Baun T, Rogers J, Patel T, Snow L. Prompt detection of influenza A ve B viruses using the BD Veritor System Flu A+B, Quidel®Sofia® Influenza A+B FIA, and Alere BinaxNOW®Influenza A+B compared to real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014;79 (1):10-3.
12. Leung AK, Newman R, Kumar A, Davies HD. Rapid antigen detection testing in diagnosing group A beta hemolytic streptococcal pharyngitis. *Expert Rev Mol Diagn*, 2006; 6:761.
13. World Health Organization (WHO) (2019) Global Influenza Strategy 2019-2030 [https://www.who.int/influenza/Global\\_Influenza\\_Strategy\\_2019\\_2030\\_Summary\\_English.pdf?ua=1](https://www.who.int/influenza/Global_Influenza_Strategy_2019_2030_Summary_English.pdf?ua=1).
14. Bayırlı Turan D, Gumus D, Kalaycı Yüksek F, Koroğlu T, Pamukcu A, Serefhanoglu K. A retrospective study of influenza rapid antigen test positivity with drug prescribing and clinical symptoms. *Turk J Clin Lab*, 2019;10:149-55.
15. Okamoto S, Nagase S. Pathogenic mechanisms of invasive group A Streptococcus infections by influenza virus-group A Streptococcus superinfection. *Microbiol Immunol*, 2018;62 (3):141-9.
16. De Gier B, Vlamincxx BJM, Woudt SHS, van Sorge NM, van Asten L. Associations between common respiratory viruses and invasive group A streptococcal infection: A time-series analysis. *Influenza Other Respir Viruses*, 2019;13(5):453-8.
17. Coburn AF, Pauli RH. Studies on the immune response of the rheumatic subject and its relationship to activity of the rheumatic process II. Observations on an epidemic of influenza followed by hemolytic streptococcus infections in a rheumatic colony. *J Exp Med* 1935;62 (2):137-58.
18. Azevedo M, Mullis L, Agnihotram S. Viral and bacterial co-infection and its implications. *Sci Fed Virol Res J*, 2017;28;1 (1).
19. Zakikhany K, Degail MA, Lamagni T, Waight P, Guy R, Zhao H et al. Increase in invasive *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* infections in England, December 2010 to January 2011. *Euro Surveill*, 2011;16 (5).
20. Scaber J, Saeed S, Ihekweazu C, Efstratiou A, McCarthy N, O'Moore E. Group A streptococcal infections during the seasonal influenza outbreak 2010/11 in South East England. *Euro Surveill*, 2011;16 (5).
21. Jean C, Louie JK, Glaser CA, Harriman K, Hacker JK, Aranki F et al. Invasive group A streptococcal infection concurrent with 2009 H1N1 influenza. *Clin Infect Dis*, 2010; 50 (10):e59-62.
22. Guerrero S G, Marín S F. Invasive disease due to *Streptococcus pyogenes* in a patient with A H1N1 influenza infection. Report of one case. *Rev Med Chil*, 2015;143 (8):1070-5.
23. Handel A, Longini IM Jr, Antia R. Intervention strategies for an influenza pandemic taking into account secondary bacterial infections. *Epidemics*, 2009;1 (3):185-95.
24. Higashi T, Fukura S. Antibiotic prescriptions for upper respiratory tract infection in Japan. *Intern Med*, 2009; 48:1369-75.

## Çorum ilinde sokak köpeklerini enfeste eden kene türlerinin belirlenmesi

### Ticks infesting stray dogs in Çorum Province of Turkey

Gönül ARSLAN-AKVERAN<sup>1</sup>, Djursun KARASARTOVA<sup>2</sup>, Arzu COMBA<sup>3</sup>, Bahat COMBA<sup>3</sup>, Adem KESKİN<sup>4</sup>, Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN<sup>2</sup>

#### ÖZET

**Amaç:** Çorum, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi gibi kene kaynaklı hastalıklar açısından endemik bir ilimizdir. Bu çalışmanın amacı insanların yerleşim alanları içerisinde yaşayan sokak köpeklerini enfeste eden kene türlerini belirlemektir.

**Yöntem:** Bu amaçla Nisan 2018-Mart 2019 döneminde Çorum Belediyesi'ne bağlı Veteriner İşleri Müdürlüğü bünyesindeki Geçici Hayvan Bakımevi'ne rehabilite edilmek üzere getirilen sokak köpekleri arasından rastgele seçilen 100 köpeğin vücutları kene varlığı açısından taramış, tespit edilen keneler bir pens yardımıyla çıkarılarak %96'lık etil alkol içeren tüplere alınmış ve tür tayinine kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

**Bulgular:** Kene taraması yapılan köpeklerin %20 (20/100)'si keneler ile enfesteydi ve keneler *Ixodes kaiseri*, *Hyalomma* spp., *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus* ve *Haemaphysalis parva* türlerine aitti. Enfeste bireylerdeki ortalama kene yoğunluğu 3.3 (1-7), bir köpekteki ortalama kene yoğunluğu ise 0.7 idi. En fazla kene Haziran ve Ağustos aylarında, en az kene ise Nisan ve Mayıs aylarında kaydedildi.

**Sonuç:** Bu çalışmada, köpekler üzerinden toplanan kene sayısı görece düşüktür. Buna göre Veteriner İşleri

#### ABSTRACT

**Objective:** The Province of Çorum is an endemic area for tick-borne diseases such as the Crimean Congo hemorrhagic fever. The aim of this study was to identify the tick species infesting stray dogs found in the surrounding of human habitations.

**Methods:** Hundred stray dogs kept in the Animal Nursing Home of the Veterinary Service of the province were randomly selected during the period of April 2018 and March 2019. Ticks were removed with the help of forceps and placed in 96% ethyl alcohol and stored at +4°C until they were taxonomically identified.

**Results:** The following tick species were found: *Ixodes kaiseri*, *Hyalomma* spp., *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus* and *Haemaphysalis parva*. The infestation prevalence was 20%, the infestation density 3.3 (1-7) and the abundance was 0.7. The highest numbers of tick were recorded in June and August, while the lowest in April and May.

**Conclusion:** The number of ticks collected from dogs in this study was relatively low, showing that the efforts of the Veterinary Services to control ticks

<sup>1</sup>Hitit Üniversitesi Alaca Avni Çelik Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Çorum

<sup>2</sup>Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Çorum

<sup>3</sup>Hitit Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojisi Bölümü, Çorum

<sup>4</sup>Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Tokat



İletişim / Corresponding Author : Gönül ARSLAN-AKVERAN

Hitit Üniversitesi Alaca Avni Çelik Meslek Yüksekokulu, 19400 Çorum - Türkiye

E-posta / E-mail : gonul.aarslan@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 03.07.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 17.08.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.43402

Arslan-Akveran G, Karasartova D, Comba A, Comba B, Keskin A, Taylan-Özkan A. Çorum ilinde sokak köpeklerini enfeste eden kene türlerinin belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 441-448

Müdürlüğü'nün sokak köpeklerini kenelerden korumaya yönelik mücadelesinin başarılı olduğu söylenebilir. Sonuç olarak İl Veteriner İşleri Müdürlükleri, kenelerin ve kene kaynaklı zoonotik hastalıkların döngüsüne aracılık etme potansiyeli olan sokak köpeklerine uyguladıkları tedavi ve koruyucu veteriner hekimlik hizmeti sayesinde, bu hastalıkların önemli bir halk sağlığı problemine dönüşmesini önleyebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Köpek, kene, Çorum, kene kaynaklı hastalık, Veteriner İşleri Müdürlüğü

infesting dogs, is successful. This should lower the possibilities of tick-borne diseases and zoonoses which could be transmitted by stray dogs in the region.

**Key Words:** Dog, tick, Çorum, tick borne diseases, The Directorate of Veterinary Service

## GİRİŞ

Köpek Vektör Kaynaklı Hastalıklar(KVKH)'a eklembacaklılardan bulaşan çok çeşitli patojenler neden olur. Tüm dünyadaki dağılımlarından ve hızlı yayılımlarından ötürü, KVKH dünyada büyük ilgi görmektedir. KVKH, köpeklerde neden oldukları mortalite ve morbiditenin yanı sıra zoonotik öneme sahiptirler (1, 2). Köpeklerin insanların hayatındaki sosyal rolü oldukça önemlidir. KVKH köpeklerin sağlığını tehdit edebileceği gibi zoonotik vektör kaynaklı hastalık ajanları aracılığıyla insan sağlığını etkilerler. Keneler en önemli vektör eklembacaklılardır. Kenelerin köpeklere birçok patojeni bulaştırmadan sorumlu olduğu bilinmektedir. Kene kaynaklı hastalıklar insan ve hayvan sağlığı açısından çok önemlidir ve gün geçtikçe anlam kazanan "Tek tıp-Tek sağlık" yaklaşımında önemli yer tutmaktadır (1, 3, 4).

Keneler, birçok protozoan, bakteriyel, helmint ve viral patojenin asıl rezervuarıdır ve bu patojenlerin dünyadaki yayılımından sorumludur. Kene kaynaklı hastalıklar büyük bir halk sağlığı problemi olarak değerlendirilebilir ve vektör kenelerinin dağılımı patojenlerin dağılımını da belirler (5, 6).

Bu çalışmada Çorum İl sınırları içerisindeki sokak köpeklerini enfeste eden kene türlerinin

belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Nisan 2018-Mart 2019 döneminde Çorum Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü'ne bağlı Sokak Hayvanları Geçici Bakımevi'ne rehabilite edilmek üzere getirilen köpekler üzerindeki keneler toplanmış ve tür tayinleri yapılmıştır.

Elde edilen veriler il sınırları içerisindeki kene varlığı, yoğunluğu ve çeşitliliği hakkında bilgi verecektir. Ayrıca kenelerin dağılımının anlaşılmasına ve Çorum İli'nde kene kaynaklı hastalıklar açısından risk faktörlerinin ortaya konmasına katkı sunacaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Araştırma Alanı

Çorum ili 34° 04' 28'' doğu boylamları ile 39° 54' 20'' kuzey enlemleri arasında Orta Karadeniz Bölgesi'nin iç kısmında yer alır; yüzölçümü 12.820 km<sup>2</sup>, deniz seviyesinden yüksekliği ortalama 818 m' dir. Köppen-Geiger sınıflandırmasına göre iklimi Csb kategorisindedir. Yıllık ortalama yağış 450 mm, ortalama sıcaklık 10-11 °C civarındadır. Yılın en sıcak ayı ortalama 20.2 °C ile Temmuz ve yılın en soğuk ayı 0.1 °C ile Ocak' tır.

## Çorum Belediyesi Hayvan Bakımevi

Çorum Belediyesi Geçici Hayvan Bakımevi, Veteriner İşleri Müdürlüğü tarafından 5199 sayılı Hayvanları Koruma Kanunu ve ilgili uygulama yönetmeliği doğrultusunda başıboş sokak hayvanlarını rehabilite etmek amacıyla 2007 yılında açılmıştır. Sahipsiz sokak hayvanlarının sağlıklarını korumak ve üremelerini kontrol altına almak maksadıyla yürürlükteki kanun ve yönetmelikler çerçevesinde; sokak hayvanlarını toplamak, kısırlaştırmak, aşılamak, işaretlemek, sahiplendirmek veya alındığı ortama bırakmak, sahipli hayvanları kayıt altına almak, gerekli durumlarda Kamu Birimleri ile işbirliği içerisinde hayvanları müşahede altına almak, müşahede süresince takip etmek görevleri arasındadır.

## Kenelerin Toplanması ve Saklanması, Kenelerde Tür Tayini

Nisan 2018-Mart 2019 döneminde Sokak Hayvanları Geçici Bakımevi haftanın belirli günleri ziyaret edilerek rehabilitasyon amacı ile getirilen köpekler arasından seçilen bireylerin tüm vücudu (kulak ve çevresi, göz ve çevresi, boyun, ön ve arka ekstremitelerin tüm yüzeyleri ve tırnak araları, ekstremitelerin vücuda bağlanma noktaları, anal bölge, genital bölge, karın ve sırt bölgeleri vb.) kene varlığı açısından taranmıştır. Her bir köpek tek bir muayenede tüm vücut bölgeleri kontrol edilerek kene taramasından geçirilmiştir. Köpeklerin bakımevine henüz getirilen ve diğer bireylerle temas etmemiş olanlardan seçilmesine özen gösterilmiştir. Buna göre haftada 2 ya da 3 köpek olacak şekilde çalışma süresi boyunca toplam 100 farklı köpek kene muayenesinden geçirilmiş, köpeklerin yaş aralıkları ve kenelerin tutunma bölgeleri kaydedilmiştir. Tespit edilen keneler kurumun bünyesindeki Veteriner Hekimler tarafından bir pens yardımıyla çıkarılmış, kenelerin çıkarıldığı bölgeler %70'lik etil alkol ile dezenfekte edilmiştir. Elde edilen keneler %96'lık etil alkol içeren 10 ml'lik santrifüj tüplerine alınmış ve tür tayinine kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Kenelerin tür tayini Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyoloji Bölümü Akaroloji Laboratuvarı'nda standart

taksonomik anahtarlar kullanılarak Leica MZ16 marka stereo mikroskop altında yapılmıştır (7, 8). Keneler için 3 farklı parazitolojik gösterge değerlendirilmiştir: Enfestasyon prevelansı (%)=100xEnfeste köpek sayısı/Toplam köpek sayısı, Enfestasyon yoğunluğu=Kene sayısı/Enfeste köpek sayısı, Bolluk=Kene sayısı/Toplam köpek sayısı (9). Enfeste köpek sayısı vücudunun herhangi bir noktasında en az bir kene tespit edilen köpek sayısını, kene sayısı ise çalışma boyunca farklı köpeklerin üzerinden toplanan tüm kenelerin toplam sayısını göstermektedir. Parazitolojik göstergeler bireyler için değil, çalışılan köpeklerin toplamı için hesaplanmıştır. Köpeklerin yaş, cins, cinsiyet gibi özellikleri parazitolojik göstergeler belirlenirken hesaba katılmamıştır.

Bu çalışma için Yerel Etik Kurul izni alınmıştır (Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Karar No: 18/087- 16.07.2018).

## BULGULAR

Bu çalışmada kene taraması yapılan köpeklerde (58 ♀ ve 42 ♂) enfestasyon prevelansının %20, enfestasyon yoğunluğunun 3.3 (1-7) ve bolluğun 0.7 olduğu kaydedilmiştir. Köpeklerin yaş dağılımları ve kene ile enfeste birey sayıları Tablo 1'de gösterilmektedir. Buna göre köpeklerin çoğunluğu 4-6 yaş aralığındadır. Ancak kene ile enfeste birey sayısının toplam birey sayısına oranı 6-8 yaş aralığındaki köpeklerde en fazladır.

Köpekleri enfeste eden kenelerin *Ixodes kaiseri*, *Hyalomma* spp., *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus* ve *Haemaphysalis parva* türlerine ait olduğu tespit edilmiştir. Köpekler üzerine tutunan kenelerin türlerine göre dağılımları, gelişim evreleri ve tutunma bölgeleri Tablo 2' de gösterilmektedir. *Hae. parva* ve *R. turanicus* çalışma boyunca köpekler üzerinde en sık kaydedilen kene türleridir.

Köpekler üzerinde en sık rastlanan kene türlerinin sırasıyla *Hae. parva*, *R. turanicus*, *Hyalomma* spp., *R. sanguineus* ve *I. kaiseri* olduğu kaydedilmiştir.

Köpeklerin üzerinden toplanan kenelerin cinsiyetleri ve aylara göre dağılımı Tablo 3' de gösterilmektedir. Buna göre en fazla kene 2018 yılının Haziran ve Ağustos aylarında ve 2019 yılının Mart ayında, en az kene ise 2018 yılının Mayıs ayında kaydedilmiştir. Çalışma takvimi

içerisinde 2018 yılı Nisan ayında ve 2019 yılı Ocak ve Şubat aylarında köpekler üzerinde kene gözlenmemiştir. Toplam erkek kene sayısının dişi kene sayısına oranı (E/D) 1.2 ve toplam yetişkin kene sayısının nimf sayısına oranı 8.4 olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 1.** Köpeklerin yaş dağılımı ve kene ile enfeste birey sayısı

Yaş aralığı	Kene ile enfeste birey sayısı	Toplam birey sayısı
1-3	6	35
4-6	9	54
6-8	5	11
Toplam	20	100

**Tablo 2.** Köpekler üzerine tutunan kenelerin tür dağılımları, gelişim evreleri ve tutunma bölgeleri

Türler	Larva	Nimf	Dişi (♀)	Erkek (♂)	Toplam	Tutunma bölgesi
<i>Ixodes kaiseri</i>	-	-	3	-	3	Kulak kepçesi
<i>Hyalomma</i> spp.	-	7	-	-	7	Kulak içi
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	-	-	7	14	21	Göz çevresi, Kulak içi, kulak kepçesi
<i>Haemaphysalis parva</i>	-	-	13	18	31	Ön ekstremitte tırnak araları, boyun bölgesi
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	-	-	4	-	4	Boyun bölgesi, göz çevresi
<b>Toplam</b>	-	<b>7</b>	<b>27</b>	<b>32</b>	<b>66</b>	

**Tablo 3.** Köpekler üzerine tutunan kenelerin cinsiyetleri ve aylara göre dağılımı

Kene Türleri	2018								2019
	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos	Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Mart
<b>Köpek sayısı</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>30</b>
<i>Ixodes kaiseri</i>	-	-	-	3♀	-	-	-	-	-
<i>Hyalomma</i> spp.	2 nimf	-	-	5 nimf	-	-	-	-	-
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	-	4♀	3♀	-	8♂	6♂	-	-	-
<i>Haemaphysalis parva</i>	-	7♀	3♂	3♂	-	3♂	3♂	-	6♂ 6♀
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	-	-	-	-	-	-	-	4♀	-
<b>Toplam</b>	<b>2 nimf</b>	<b>11♀</b>	<b>3♀, 3♂</b>	<b>3♀, 3♂, 5 nimf</b>	<b>8♂</b>	<b>9♂</b>	<b>3♂</b>	<b>4♀</b>	<b>6♂ 6♀</b>

## TARTIŞMA

Türkiye'deki kene faunası, 31'i insanları enfeste eden 47 tür içermektedir. Türkiye'de her yıl binlerce insan kene ısırmasına bağlı hastalıklardan etkilenir. Türkiye'de en yaygın kene kaynaklı hastalıklar arasında Kırım Kongo Kanamalı Ateşi, Lime boreliasis, Riketsiosis, Tularemi, Babesiosis ve Anaplasmosis sayılabilir (10, 11, 12, 13, 14).

Çorum İli'nde kene enfestasyonu vakaları yaygındır; daha önceki çalışmalarda bu bölgede insanların *Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma aegyptium*, *Hyalomma spp.*, *Hyalomma excavatum*, *Hae. parva*, *Haemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis sulcata*, *Haemaphysalis erinacei taurica*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes laguri*, *Rhipicephalus bursa* ve *R. turanicus* türü keneler tarafından enfeste edildiği kaydedilmiştir (15, 16, 17). *H. marginatum* bu bölgede insanları enfeste eden en yaygın kene türüdür (15, 16, 18) ve Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) hastalığının asıl vektörüdür (19, 20). İl genelinde insanlarda çok sayıda KKKA vakasına (16, 21) ek olarak riketsiosis gibi diğer kene kaynaklı hastalıklar da kaydedilmiştir (13, 15, 18, 22).

Bu bölgede insanlar üzerinden toplanan kenelerde *Rickettsiae*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Babesia*, *Borrelia*, *Hepatozoon*, *Theileria* enfeksiyonlarına rastlanılmıştır (15, 17). Ayrıca *Testudo graeca* türü kaplumbağalar üzerinden toplanan *H. aegyptium* türü kenelerde *Hemolivia mauritanica*, *Rickettsia aeschlimanii*, *Ehrlichia spp.*, ve *Bartonella bovis* enfeksiyonu kaydedilmiştir (23). Aynı bölgede insanlar üzerinden toplanan *H. aegyptium* türü kenelerde riketsiyal DNA varlığına rastlanılmamıştır (15).

Bu çalışmada köpeklerde *I. kaiseri*, *Hyalomma spp.*, *R. sanguineus*, *R. turanicus* ve *Hae. parva* türüne ait kene enfestasyonu kaydedilmiştir. Daha önceki çalışmalarda Çorum İli'nde *Hyalomma spp.*, *R. turanicus* ve *Hae. parva*'nın insanları da enfeste ettiği ortaya konmuştur (15, 16, 17). Buna göre köpekler üzerinden toplanan kenelerin taşıdığı olası

patojenlerin insanlar için de risk oluşturduğu açıktır.

*R. turanicus* Akdeniz Bölgesi, Afrika ve Asya'da dağılan, evcil ve yaban hayvanları ve hatta insanları enfeste eden bir kene türüdür (24). *Rickettsia spp.* gibi kene kaynaklı patojenlerin vektörü olduğu bilinir (25). Ayrıca *R. turanicus*'un *Hepatozoon canis*'in vektörleri arasında bir yenisi olduğu kaydedilmiştir (26). Çorum İli'nde insanlar üzerinden toplanan *R. turanicus* türü kenelerin *R. aeschlimanni* ile enfekte olduğunu moleküler olarak ortaya konmuştur (17). Başka bir çalışmada bu bölgede insanlarda parazitlenen *R. turanicus* türü kenelerde riketsiyal DNA varlığına rastlanmamıştır (15).

*Hyalomma* türü keneler *R. aeschlimanni*'nin asıl vektörü olarak bilinir. *Hyalomma spp.* nimf evresinde insanlara özel afinite gösterir (10, 27, 28). Çorum İli'nde insanlar üzerinden toplanan *Hyalomma spp.* türü kenelerin *R. aeschlimanni*, *Rickettsia slovacca*, *Rickettsia raoultii* ve *Ehrlichia spp.* ile enfekte olduğu kaydedilmiştir (17). Daha önce bu bölgede insanlar üzerinden toplanan *Hae. parva* türüne ait kenelerde *Rickettsiae spp.*, *R. aeschlimanni*, *R. slovacca*, *Rickettsiae hoogstraalii*, *Rickettsiae sibirica* subsp. *mongolitimonae*, *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.* tespit edilmiştir (17).

*Hae. parva* ve *R. sanguineus* daha önce Yunanistan'da köpekler üzerinde kaydedilmiştir (29). *Hepatozoon canis* ve *Hepatozoon felis*'in kedi ve köpeklerde hepatozoonosise neden olduğu ve bu patojenlerin *R. sanguineus* türü kenelerle geçtiği bilinmektedir ve Türkiye'de daha önce köpekler üzerinden toplanan *R. sanguineus* türü kenelerde bu patojenlerin varlığı tespit edilmiştir (30). Ankara'daki sokak köpeklerin kanlarında moleküler yöntemlerle yüksek oranda kene kaynaklı *Hepatozoon* enfeksiyonu tespit edilmiştir (31).

Erzurum İli'nde hayvan bakımına getirilen sokak köpeklerinin kanlarında moleküler yöntemlerle babesiosis, hepatozoonosis, leishmaniasis, filariosis (*Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* ve *Acanthocheilonema reconditum*), ehrlichiosis

(*Ehrlichia canis*) ve anaplasmosis (*Anaplasma platys*) gibi KVKH tespit edilmiştir (32).

*I. kaiseri* türü keneler, şimdiye kadar Türkiye’de Ankara’da bir kızıl tilki (33) ve Tekirdağ’da köpekler üzerinde kaydedilmiştir (34). Bizim kayıtlarımızdaki *I. kaiseri* Çorum için yeni kayıt, Türkiye için ise üçüncü kayıttır. Yine Tekirdağ’da köpeklerde *R. sanguineus*, *Rhipicephalus* spp., *I. ricinus*, *Ixodes accuminatus* ve *Hae. parva* türü kene enfestasyonu kaydedilmiştir. *Hae. parva*’nın Türkiye’de ve dünyada, köpekleri enfeste ettiğine dair ilk kayıt bu bölgedendir (34). Bildiğimiz kadarıyla bizim sonuçlarımızdaki köpeklerdeki *Hae. parva* enfestasyonu Türkiye’de ve dünyada ikinci kayıttır. Üstelik bizim sonuçlarımıza göre *Hae. parva* köpeklerde en sık rastlanılan kene türüdür.

Türkiye’de köpekleri enfeste eden kene türlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yetersiz olsa da, bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Trakya bölgesinde köpeklerin *R. sanguineus*, *R. turanicus* (35), Diyarbakır bölgesinde ise *R. sanguineus* türü kenelerle enfeste olduğu kaydedilmiştir (36).

Tekirdağ’da sahipli ve sahipsiz köpeklerin %8.5’inin (n:1605) 1-131 kene ile enfeste olduğu kaydedilirken (34), bizim sonuçlarımıza göre köpeklerin %20’si 1-7 kene ile enfesteydi. Çorum Belediyesi Veteriner İşleri Müdürlüğü sokak köpeklerinin ektoparazit mücadelesi kapsamında, köpeklerin beslenme odaklarında

besinlerine rutin olarak geniş spektrumlu endektosit ve sestosid kombinasyonu ilaçlar eklemektedir. Bu koruyucu veterinerlik hizmeti sayesinde bu bölgedeki köpekler görece düşük sayıda kene ile enfeste olmuş olabilir.

Sonuç olarak keneler, insan ve hayvanları etkileyen zoonotik hastalıkların önemli bir vektörüdür ve bu patojenlerin dünyadaki yayılımından sorumludur. Çorum’un kene kaynaklı hastalıklar açısından önemli bir bölge olduğu söylenebilir. Daha önceki çalışmalar, bu çalışmada elde edilen kenelerin bazı zoonotik patojen mikroorganizmanın rezervuarı ve vektörü olduğunu ortaya koymuştur. Köpekleri enfeste eden keneler, gelişimlerinin farklı evrelerinde insanları da enfeste edebileceğinden, kene kaynaklı hastalıkların epidemiyolojisinin anlaşılmasında sokak köpeklerinden elde edilecek veriler değerlidir. Geçici hayvan bakım evine şehrin farklı noktalarından çok sayıda sokak köpeği getirilmektedir. Elde edilen veriler il sınırları içerisindeki kene varlığı, yoğunluğu ve çeşitliliği hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca kenelerin dağılımının anlaşılmasına ve Çorum İli’nde kene kaynaklı hastalıklar açısından risk faktörlerinin ortaya konmasına katkı sunacaktır. Keneler ve kene kaynaklı zoonotik hastalıklarla mücadelede, sokak hayvanlarının refahından sorumlu belediyelere önemli bir görev düşmektedir.

## ACKNOWLEDGEMENT

Bu çalışma Çorum için bir Proje var konulu Çorum Belediye Başkanlığı ve Çorum Hitit Üniversitesi arasında ortak hizmet projesi kapsamında 2018 döneminde Çorum Belediye Başkanlığı Strateji Geliştirme Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir.

Köpeklerin zapturaptı ve kenelerin toplanması sırasındaki yardımlarından ötürü Veteriner İşleri Genel Müdürü Vet. Hek. Mustafa KALIN’a, Vet. Hek. Mert GÜNHAN’a ve Vet. Hek. Mehmet GÜLTEKİN’e teşekkür ederiz.



## KAYNAKLAR

1. Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt EB. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: Part one. Trends Parasitol, 2009; 25 (4): 157-63.
2. Maia C, Almeida B, Coimbra M, Fernandes MC, Cristóvão JM, Ramos C et al. Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. Parasit Vectors, 2015; 8:138.
3. Chomel B: Tick-borne infections in dogs - An emerging infectious threat. Vet Parasitol, 2011; 179: 294-301.
4. Dantas-Torres F, Chomel BB, Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: A one health perspective. Trends Parasitol, 2012; 28(10): 437-445.
5. Estrada-Peña A, Jongejan F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. Exp Appl Acarol, 1999; 23:685-715.
6. Sparagano O, Allsopp M, Mank R, Rijpkema S, Figueroa J, Jongejan F. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): a review. Exp Appl Acarol, 1999; 23: 929-960.
7. Apanaskevich D. Towards a diagnostic view of Hyalomma (Hyalomma) aegyptium (Acari, Ixodidae). Parazitologija, 2003; 37(1): 47-59.
8. Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney TN. Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification, first ed. Springer, Heidelberg, Germany, 2017.
9. Gharbi M, Rjeibi MR, Rouatbi M, Mabrouk M, Mhadhbi, M., Amairia S et al. Infestation of the spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*) by *Hyalomma aegyptium* in Tunisia. Ticks Tick Borne Dis, 2015; 6: 352-355.
10. Vatansever Z, Gargili A, Aysul N, Sengoz G, Estrada-Peña A. Ticks biting humans in the urban area of Istanbul. Parasitol Res, 2008; 102: 551-3.
11. Kar S, Yilmazer N, Midilli K, Ergin S, Alp H, Gargili A. Presence of the zoonotic *Borrelia burgdorferi* sl. and *Rickettsia* spp. in the ticks from wild tortoises and hedgehogs. Clin Exp Health Sci, 2011; 1(3): 166-70.
12. Karaer Z, Guven E, Nalbantoglu S, Kar S, Orkun O, Ekdal K et al. Ticks on humans in Ankara, Turkey. Exp Appl Acarol, 2011; 54(1): 85-91.
13. Gargılı A, Palomar AM, Midilli K, Portillo A, Kar S, Oteo JA. *Rickettsia* species in ticks removed from humans in Istanbul, Turkey. Vector Borne Zoonotic Dis, 2012;12 (11) : 938-41.
14. Orkun Ö., Karaer Z, Çakmak A, Nalbantoğlu S. Spotted fever group rickettsiae in ticks in Turkey. Ticks Tick Borne Dis, 2014; 5(2): 213-8.
15. Bursalı A, Keskin A, Keskin A, Kul Köprülü T, Tekin Ş. Investigation of the Presence of *Rickettsia* in Ticks Parasitizing Humans in Corum Region. Turk Bulletin of Hyg Exp Bio, 2017; 74(4): 293-8.
16. Keskin A, Keskin A, Bursalı A, Tekin Ş. Ticks (Acari: Ixodida) parasitizing humans in Corum and Yozgat provinces, Turkey. Exp Appl Acarol, 2015; 67: 607-16.
17. Karasartova D, Gureser AS, Gokce T, Celebi B, Yapar D, Keskin A et al. Bacterial and protozoal pathogens found in ticks collected from humans in Corum province of Turkey. PLoS Negl Trop Dis, 2018; 12(4): e0006395.
18. Bursalı A, Keskin A, Tekin Ş. A review of the ticks (Acari: Ixodida) of Turkey: species diversity, hosts and geographical distribution. Exp Appl Acarol, 2012; 57(1): 91-104.

19. Vatansver Z, Uzun R, Estrada-Peña A, Ergonul O. Crimean-Congo haemorrhagic fever in Turkey. In: Ergonul O, Whitehouse CA (eds) Crimean-Congo hemorrhagic fever: a global perspective. Springer, Dordrecht, pp 59-74, 2007
20. Tekin S, Bursalı A, Mutluay N, Keskin A, Dundar E. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in various ixodid tick species from a highly endemic area. *Vet Parasitol*, 2012; 186:546-52.
21. Erenler AK, Kulaksiz F, Ülger H, Erdem M, Koçak C, Söylemez, et al. Characteristics of patients admitted to the emergency department due to tick bite. *Trop Doct*, 2014; 44: 86-8.
22. Orkun Ö, Karaer Z, Çakmak A, Nalbantoğlu S. Identification of tick-borne pathogens in ticks feeding on humans in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014; 8(8): e3067.
23. Akveran GA, Karasartova D, Keskin A, Comba A, Celebi B, Mumcuoğlu KY, Taylan-Ozkan A. Bacterial and protozoan agents found in *Hyalomma aegyptium*(L., 1758) (Ixodida: Ixodidae) collected from *Testudo graeca* L., 1758 (Reptilia:Testudines) in Corum Province of Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*, 2020; 11(5): 101458.
24. Li HY, Zhao SS, Hornok S, Farkas R, Guo LP, Chen CF et al. Morphological and molecular divergence of *Rhipicephalus turanicus* tick from Albania and China. *Exp Appl Acarol*, 2017; 73(3-4): 493-9.
25. Germanakis A, Chochlakis D, Angelakis E, Tselentis Y, Psaroulaki A. *Rickettsia aeschlimanii* infection in a man, Greece. *Emerg Infect Dis*, 2013; 19(7): 1176-7.
26. Giannelli A, Lia RP, Annoscia G, Buonavoglia C, Lorusso E, Dantas-Torres F et al. *Rhipicephalus turanicus*, a new vector of *Hepatozoon canis*. *Parasitology*, 2017; 144: 730-7.
27. Apanaskevich D. Host-parasite relationships of the genus *Hyalomma* Koch, 1844 (Acari, Ixodidae) and their connection with microevolutionary process. *Parazitologiya*, 2004; 38(6): 515-23
28. Bursalı A, Tekin Ş, Orhan M, Keskin A, Ozkan M. Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) infesting humans in Tokat Province of Turkey: species diversity and seasonal activity. *J Vector Ecol*, 2010; 35: 180-6.
29. Latrofa MS, Angelou A, Giannelli A, Annoscia G, Ravagnan S, Dantas-Torres F et al. Ticks and associated pathogens in dogs from Greece. *Parasit Vectors*, 2017; 10: 301.
30. Aktaş M, Ozubek S, İpek DN. Molecular investigation of *Hepatozoon* species in dogs and developmental stages in *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasitol Res*, 2013; 112(6): 2381-5.
31. Orkun Ö, Koç N, Sürsal N, Çakmak A, Nalbantoğlu S, Karaer Z. Molecular characterization of tick-borne blood protozoa in stray dogs from Central Anatolia Region of Turkey with a High-Rate *Hepatozoon* infection. *Kafkas Üniv Vet Fak*, 2018; 24(2):227-32.
32. Güven E, Avcıoğlu H, Cengiz S, Hayırlı A. Vector-borne pathogens in stray dogs in Northeastern Turkey, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2017; 17 (8): 610-7.
33. Orkun Ö, Karaer Z. First record of the tick *Ixodes* (*Pholeoixodes*) *kaiseri* in Turkey. *Exp Appl Acarol*, 2018; 74(3): 201-5.
34. Uluç B. Tekirdağ'da köpeklerde kene enfestasyonu karakteristiğinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2018.
35. Çetinkaya H, Matur E, Akyazı I, Ekiz EE, Aydın L, Toparlak M. Serological and molecular investigation of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in ticks and blood of dogs, in the Thrace Region of Turkey. *Ticks Tick-borne Dis*, 2016; 7: 706-14.
36. Özübek S, İpek DNS, Aktaş M. A molecular survey of rickettsias in shelter dogs and distribution of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) sensu lato in Southeast Turkey. *J Med Entomol*, 2018; 55(2): 459-63.

# Yaşlanma ve yüzme egzersizinin, torasik aorta ve gastrocnemius iletim arterlerinde karbon monoksit gevşeme yanıtına etkisi

## The effect of aging and exercise training on carbon monoxide relaxation response in thoracic aorta and gastrocnemius feed artery

Günnur KOÇER<sup>1</sup>, Seher NASIRCILAR-ÜLKER<sup>2</sup>, Yusuf OLGAR<sup>3</sup>, Nihal ÖZTÜRK<sup>4</sup>, Semir ÖZDEMİR<sup>4</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı yaşlanma ve yüzme egzersizine bağlı olarak sıçanların torasik aortasında ve gastrocnemius iletim arterinde karbon monoksit (CO)'e verilen damar yanıtlarının değişip değişmediğini test etmektir.

**Yöntem:** Çalışmamızda 4 aylık genç ve 24 aylık yaşlı Wistar dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar rastgele genç-sedanter (GS), genç-egzersiz (GE), yaşlı-sedanter (YS) ve yaşlı-egzersiz (YE) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Egzersiz gruplarına 8 hafta süresince haftada 5 gün, günde 1 saat yüzme egzersizi yaptırıldı. Sıçanlardan izole edilen torasik aorta halkaları organ banyosu düzeneğinde, gastrocnemius iletim arteri ise telli miyograf düzeneğinde çalışıldı. Aort ve gastrocnemius iletim arteri halkalarının fenilefrin (PE) kasılma yanıtları hemoksijenaz inhibitörü chromium mesoporphyrin inkübasyonu öncesi ve sonrasında kaydedilerek endojen olarak üretilen CO'in vasküler tonusa katkısı değerlendirildi. CO donörü (CORM; carbon - monoxide - releasing - molecule) kullanılarak ekzojen gevşeme yanıtları değerlendirildi.

**Bulgular:** CrMP inkübasyonu öncesinde ve sonrasında PE doz yanıt eğrilerinde hem aortada hem de gastrocnemius iletim arterinde gruplar arasında fark

### ABSTRACT

**Objective:** The purpose of this study is to observe any aging and swimming exercise associated changes in the rat thoracic aorta and gastrocnemius feed artery.

**Methods:** 4-month and 24-month old female rats were used and divided into four following groups: sedentary young, trained young, sedentary old, and trained old. Swimming exercise was performed for 8 weeks (60 min/day, 5 days/week). Thoracic Aorta and gastrocnemius feed artery isolated from the rats. Thoracic Aorta rings were mounted on organ bath and gastrocnemius feed arteries were mounted on wire myograph. Contraction responses of all vessel rings in presence and absence of HO inhibitor (CrMP) were recorded as an endogenous CO contribution to vascular tonus. The effect of exogenous CO relaxation response were assessed by CO releasing molecule (CORM).

**Results:** Phenylephrine dose- response curves with or without CrMP were similar in all groups both aortic rings and gastrocnemius feed artery. The maximum PE contraction responses obtained after CrMP incubation were significantly higher in the GE, YS and YE groups

<sup>1</sup>Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Lefkoşa, KKTC

<sup>2</sup>Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Antalya

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Ankara

<sup>4</sup>Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, Antalya



**İletişim / Corresponding Author :** Günnur KOÇER  
YDÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D. 99138 Lefkoşa - K.K.T.C.  
E-posta / E-mail : gunnur.kocer@neu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 21.07.2020  
Kabul Tarihi / Accepted : 30.09.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.54289

Koçer G, Nasircılar-Ülker S, Olgar Y, Öztürk N, Özdemir S. Yaşlanma ve yüzme egzersizinin, torasik aorta ve gastrocnemius iletim arterlerinde karbon monoksit gevşeme yanıtına etkisi. Turk Hij Den Biol Derg, 2020; 77(4): 449-458

yoktu. CrMP inkübasyonu sonrasında alınan maksimum PE kasılma yanıtları aort halkalarında GE, YS ve YE gruplarında anlamlı olarak daha yüksekti ( $p<0,05$ ), gastrocnemius iletim arterlerinde ise sadece GS ve GE gruplarında anlamlı olarak yüksekti ( $p<0,01$ ). CORM'a verilen maksimum gevşeme yanıtlarında gastrocnemius iletim arterinde gruplar arasında fark yoktu. Aorta halkalarında ise maksimum CORM gevşeme yanıtları yaşlı gruplarda anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0,05$ ).

**Sonuç:** Çalışmanın sonuçları; gastrocnemius iletim arterinde CO yanıtlarına egzersiz ve yaşlanmanın etkisi olmadığını, Aorta halkalarında ise CO gevşeme yanıtının yaşlanmayla birlikte azaldığını ve egzersizin CO gevşeme yanıtını hem yaşlı hem de genç sıçanlarda artırıcı bir katkısının olmadığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Karbon monoksit, hemoksijenaz, vasküler tonus, aorta, gastrocnemius iletim arteri

( $p < 0.05$ ) in the aortic rings, and only significantly higher in the GS and GE groups in the gastrocnemius feed arteries ( $p < 0,01$ ). There was no differences in the maximum vasodilatation response of CORM reported for all groups in gastrocnemius feed artery. However, in the old groups CORM Emax values were established significantly lower than that the young groups in the aortic rings ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion:** As a results of this study; exercise and aging have no effect on CO responses in the gastrocnemius feed artery. But the CO relaxation response is decreased by aging in the thoracic aorta of elderly rats and exercise does not have an enhancing contribution for CO relaxation response in both old and young rats.

**Key Words:** Carbon monoxide, hemo oxygenase, vascular tonus, aorta, gastrocnemius feed artery

## GİRİŞ

Endotel disfonksiyonu, sadece esansiyel hipertansiyon veya sekonder hipertansiyon (1, 2), hiperkolesterolemi (3, 4) ve ateroskleroz (4) gibi hastalıkların karakteristik özelliği olmayıp günümüzde yaşlılıkla da ilişkilendirilmektedir (5, 6). Bu patolojik durumlardan bağımsız olarak da yaşlılığın, torasik aorta ve direnç arterlerinde endotel disfonksiyonuna yol açtığı rapor edilmiştir (5, 7, 8). Endotel fonksiyonunda yaşlanmayla birlikte görülen değişikliklerin kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde klinik açıdan önemli etkileri olabilir. Yaşa bağlı olarak görülen endotel fonksiyonlarındaki bozulma / azalma öncelikle endotel hücrelerinin vasküler tonusu düzenlemek için salgıladıkları gevşetici mediatörlerin azalması ile kendini gösterir. Bu durum endotelden salgılanan çeşitli vazodilatör maddelerin ve özellikle nitrik oksidin (NO) hem üretiminin hem de biyoyararlanımının azalması ile açıklanmaktadır (9). Bunun yanında yaşlanma

sürecinde NO dışında prostasiklin ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör (EDHF) gibi endotel bağımlı gevşeticilerin katkısının azaldığı bilinmektedir (10, 11).

Son yıllarda karbonmonoksit, vasküler tonusa katkısı ve fonksiyonları açısından NO ile benzerliklere sahip olması nedeniyle üzerinde durulan gevşetici mediyatörlerden biridir (12). Aynı zamanda CO, birçok araştırmada NO için yedekleme molekülü olarak gösterilmektedir (13). CO, hemoksijenaz (HO) enziminin hem molekülünü CO, biliverdin ve demire yıkması sonucu oluşmaktadır. HO enzimi HO-1, HO-2 ve HO-3 olmak üzere üç izoforma sahiptir. HO-3 izoformu hakkında az bilgiye sahip olunmakla birlikte HO-1 uyarılabilir izoform, HO-2 ise yapısal izoformdur. HO-1 ve HO-2 izoformları vücutta yaygın bir dağılım gösterirler ve hem endotelde hem de vasküler düz kasta yer almaktadırlar (12). CO'in ekzojen olarak uygulanması pek çok dokudan izole

edilen damarlarda gevşemeye neden olduğu bizim çalışmamızda ve başka çalışmalarda gösterilmiştir (13, 14). Yaşlanmayla birlikte azalan diğer endotel bağımlı vazodilatörler gibi CO düzeyi de azalıyor mu? Yoksa yaşlanmayla birlikte NO biyoyararlanımının azalmasına paralel olarak CO biyoyararlanımı artıyor mu? Yaşlı bireylerde, CO'in vasküler tonusa katkısında ne yönde değişiklik olduğu bilinmemektedir.

Sağlıklı aktif bir yaşlanma için düzenli egzersiz çok önemlidir. Epidemiyolojik veriler kardiovasküler hastalıklar açısından yaşlanmanın en büyük risk faktörü olduğunu ortaya koymaktadır (15) ve düzenli egzersiz yapıldığında sistolik kan basıncında azalma, endotel fonksiyonunda iyileşme, koroner arter hastalıklarında düzelme gibi pekçok kardiyosküler hastalık riskini azalttığı aralarında önceki çalışmalarımızın da olduğu pekçok araştırmada gösterilmiştir (16-19). Düzenli egzersizler sonucu oluşan vasküler düzenlemelerde HO/CO sistemi de etkilenmektedir. Koşu bandı egzersizi sonucu normotansif sıçanlarda aort HO-1 ve HO-2 proteinlerinin ekspresyonu ve HO'nun aracılık ettiği gevşemenin arttığı gösterilmiştir (20).

Bu verilerin ışığı altında; Bu çalışmamızın amacı yaşlanma ve yüzme egzersizine bağlı olarak sıçanların torasik aortasında ve gastrokinemius iletim arterinde karbon monoksit (CO)'e verilen damar yanıtlarının değişip değişmediğini test etmektir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hayvanlar

Çalışmamızda toplam 44 adet; 4 aylık genç ve 24 aylık yaşlı Wistar dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar rastgele, genç - sedanter (GS, n=12), genç-egzersiz (GE, n=12), yaşlı-sedanter (YS, n=10) ve yaşlı-egzersiz (YE n=10) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile XXX Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesinden temin edilen sıçanlar, sıcaklığı  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  olan ve 12 saat saat gün ışığı - 12 saat karanlık periyodu uygulanan bir odada tutuldu ve kısıtlamaksızın (ad libitum) ticari

sıçan yemi ile su tüketimine bırakıldılar.

### Egzersiz Protokolü

Egzersiz grubunda yer alan hayvanlara, sıcaklığı  $33 \pm 2^\circ\text{C}$  olan su ile doldurulmuş cam havuzlarda 8 hafta süresince, günde 1 saat haftada 5 gün olacak şekilde yüzme egzersizi yaptırıldı. Bir haftalık adaptasyon süresince sıçanlar önce 10 dk yüzdürüldüler sonra yüzme süreleri hergün 10'ar dk arttırıldı. Bir haftalık alıştırmaya periyodundan sonra hayvanlarımız çalışma boyunca hergün 1 saat yüzdürüldüler.

### Organ Banyosu ve Miyograf Çalışması

Eter anezisi altında feda edilen hayvanların torasik aortaları ve gastroknemius kası izole edilerek soğuk krebs solüsyonunun ( $110\text{ mM NaCl}$ ,  $5\text{ mM KCl}$ ,  $24\text{ mM NaHCO}_3$ ,  $1\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1\text{ mM MgSO}_4$ ,  $2,5\text{ mM CaCl}_2$ ,  $10\text{ mM glikoz}$ , and  $0,02\text{ mM EDTA}$ ) içerisine alındı Torasik aortaya ait damar halkaları diseke edilip, 2 mm uzunluğunda kesildikten sonra % 95  $\text{O}_2$ , % 5  $\text{CO}_2$  içeren gaz karışımı ile gazlandırılmış  $37^\circ\text{C}$ 'de pH'sı 7,4 olan 20 ml Krebs solüsyonu içeren organ banyosuna alındı. Damar halkaları çelik tellere asılarak gergin bir ip aracılığıyla izometrik transdusere (FDT 1 A-10 MAY, Ankara, Türkiye) bağlandı ve daha önceden belirlenen 1 gr istirahat gerilimi altında, her 15 dk'da bir yıkanarak 60 dk boyunca dinlendirildi. Daha sonra deney protokollerinin uygulanmasına geçildi. Gastroknemius iletim arteri de 2 mm uzunluğunda kesildikten sonra organ banyosu ile aynı koşullara sahip miyograf (Model 620M, Danish Myo Technology, Aarhus N, Danimarka) düzeneğine asıldı. Bazal gerimleri hesaplandıktan sonra bu gerimde 1 saat dinlendirildikten sonra deney protokollerinin uygulanmasına geçildi.

**Ortak Deney Protokolü:** Bir saatlik dinlenme periyodu ardından damarlar için bir ön-uyarıma sayılan vitalizasyon aşamasına geçildi. Bu işlem için  $20\text{ mM KCl}$  içeren Krebs solüsyonuna, ayrıca  $10^{-7}\text{ M}$  konsantrasyon da fenilefrin (PE) ilave edildi. Bu işlem üç sefer tekrarlandı ve damarlar her uygulamadan sonra normal Krebs solüsyonuyla yıkandı. Vitalizasyon aşamasından sonra 30 dk dinlenmeleri sağlandı.

Dinlenme periyodunu takiben damar lümeninin iç yüzünü döşeyen endotel tabakasının sağlıklı olup olmadığı araştırıldı. 10-6 M PE ile kastırılan damara aynı konsantrasyonda asetilkolin (Sigma A6625, St. Louis, USA) uygulanarak, gevşeme cevabının yüzde olarak büyüklüğü saptandı. %60 ve üzerinde gevşeme cevabı veren damarlar endotel pozitif olarak değerlendirildi. % 60'ın altında gevşeme yanıtı veren damarlar ise deney protokolüne alınmadı (çalışmamızda kullandığımız damarların hepsi % 70 ile %90 arasında gevşeme gösterdiler).

Deney protokolünün bundan sonraki her aşaması banyo solüsyonuna eklenen spesifik olmayan NOS inhibitörü L-NAME (1 mM, Sigma N5751, St. Louis, USA) varlığında değerlendirildi. Bu CO çalışmalarında ortamdan NO uzaklaştırılarak, yalnızca CO'in etkisini gözlemlemek için yapılan rutin bir uygulamadır. Bu aşamaya kadar aynı işlemlere maruz kalan damarlar için bundan sonra aşağıda tarif edilen protokoller uygulandı. Birbirini takip eden uygulamaların aralarında 30 dk dinlenme periyodu bırakıldı.

**Endojen CO yanıtları:** Damarların kümülatif olarak 10-9 - 3x10-5 M dozda PE'e (Sigma P6126) karşı kasılma yanıtları kaydedildi. Daha sonra damarlar 30 dk boyunca HO inhibitörü chromium mesoporphyrin (CrMP; 30 µM, Frontier CrMP459, Utah, USA) ile inkübe edildikten sonra PE doz yanıtları tekrar alındı. CrMP inkübasyonu sonrası kasıcı ajanlara verilen kasılma yanıtının artışı, CO'in damar tonusuna endojen olarak katkısı olarak değerlendirildi.

**Ekzojen CO yanıtları:** Öncelikle banyoya 3x10-6 M PE verilerek submaksimal kasılma yanıtı elde edildi. Ardından damarların kümülatif tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer (CORM, carbon monoxide-releasing molecule, [Ru(CO)3Cl2]2) (Aldrich 288144, St. Louis, USA) dozlarına (10-9 - 3x10-4 M) verdikleri gevşeme yanıtları kaydedildi.

### İstatistiksel Analiz

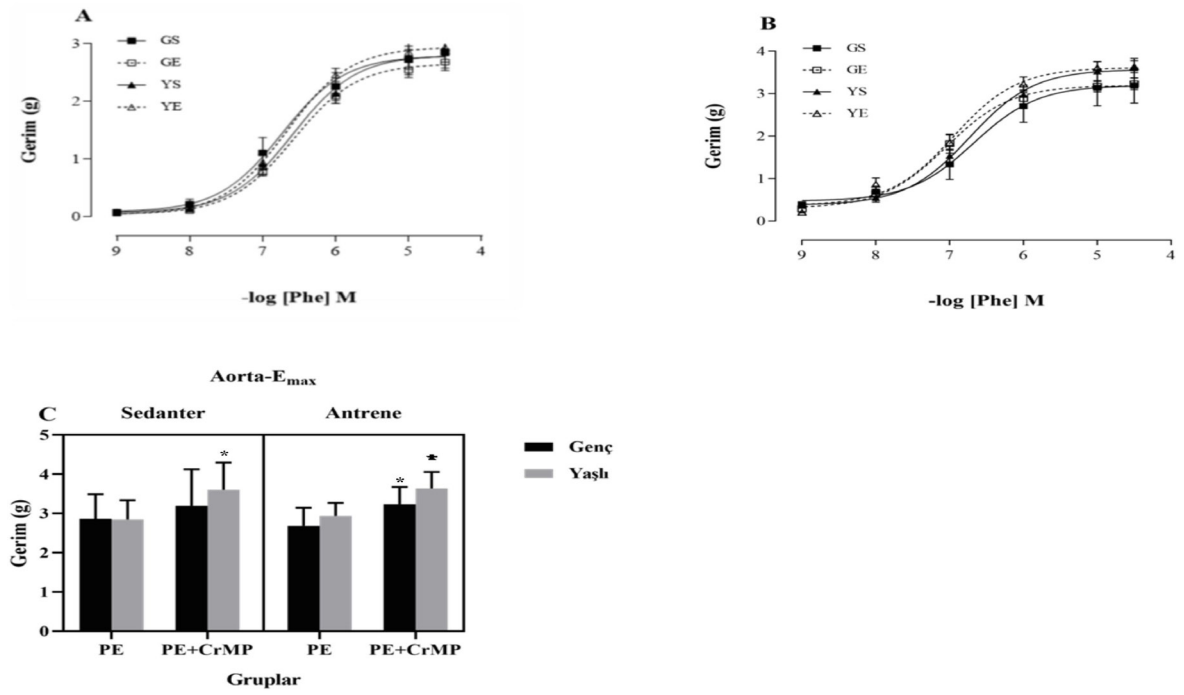
Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. PE ve CORM'un artan dozlarında alınan kasılma/gevşeme cevaplarının

değerlendirilmesinde üç yönlü tekrarlayan ölçümlerin varyans analizi ve posthoc test olarak ta Sidak testi kullanıldı. CO'nun endojen katkısını göstermek için PE ve CrMP varlığında PE yanıtlarını değerlendirilmesinde eşleştirilmiş t testi kullanıldı. Maksimum kasılma/gevşeme (Emax) yanıtlarının değerlendirilmesinde değerlendirilmesinde iki yönlü varyans analizi posthoc test olarak Sidak testi kullanıldı. İstatistiksel önemlilik derecesi p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

### BULGULAR

**Toraksik Aorta Yanıtları.** PE ve CrMP varlığında alınan PE doz yanıt eğrileri, endojen katkı yüzdesi ve maksimum kasılma yanıtına ait grafikler Şekil 1'de gösterilmiştir. PE, CrMP varlığında PE doz yanıt eğrileri ve maksimum kasılma yanıtları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi (Şekil 1A, Şekil 1B). CrMP inkübasyonu sonrasında alınan maksimum PE kasılma yanıtları GE, YS ve YE gruplarında anlamlı olarak daha yüksekti (Şekil 1C, p<0,05). CO donörü CORM verilen gevşeme doz yanıt eğrileri ve maksimal gevşeme değerleri Şekil 2'de gösterilmiştir. CORM'a ait gevşeme doz yanıt eğrileri kıyaslandığında gruplar arasında fark yoktu (Şekil 2A). CORM'a ait maksimum gevşeme yanıtlarına egzersiz anamlı bir katkısı yokken yaşın anamlı katkısı vardı. Yani maksimum gevşeme yanıtları YS grubunda GS'den, YE grubunda GE' den anlamlı olarak daha düşüktü (Şekil 2B, p<0,05).

**Gastroknemius İletim Arteri Yanıtları.** Gastroknemius iletim arterine ait tüm kasılma ve gevşeme yanıtları Şekil 3 ve Şekil 4'te verilmiştir. Tüm gruplarda endojen CO üretiminin vasküler tonusa katkısı açısından doz-yanıt eğrilerinde herhangi bir fark bulunamazken (Şekil 3A ve Şekil 3B), maksimum PE kasılma yanıtları göz önüne alındığında CrMP inkübasyonu sonrasında sadece GS ve GE gruplarında anlamlı olarak yüksekti (Şekil 3C, p<0,01). Ekzojen CO uygulaması sonucu gevşeme yanıtlarında deney grupları arasında doz-yanıt eğrilerinde ve CORM'a verilen maksimum gevşeme yanıtlarında istatistiksel olarak fark tespit edilemedi (Şekil 4A ve Şekil 4B).



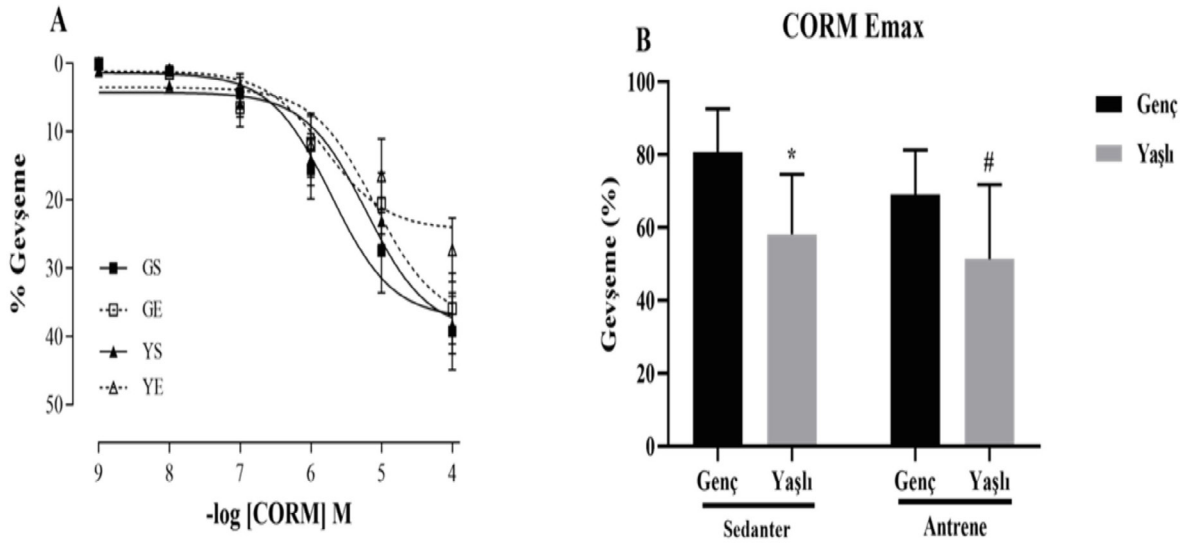
**Şekil 1.** Torasik aort halkalarına ait kasılma yanıtları

A: PE (10-9-3x10-5 M) doz-cevap eğrisi,

B: HO inhibitörü CrMP varlığında PE (10-9-3x10-5 M) doz-yanıt eğrileri,

C: CrMP inkübasyonu öncesi ve sonrasında varlığında PE'e verilen maksimum kasılma yanıtları (Emax).

\* p<0,05, maksimum PE kasılma yanıtlarından fark

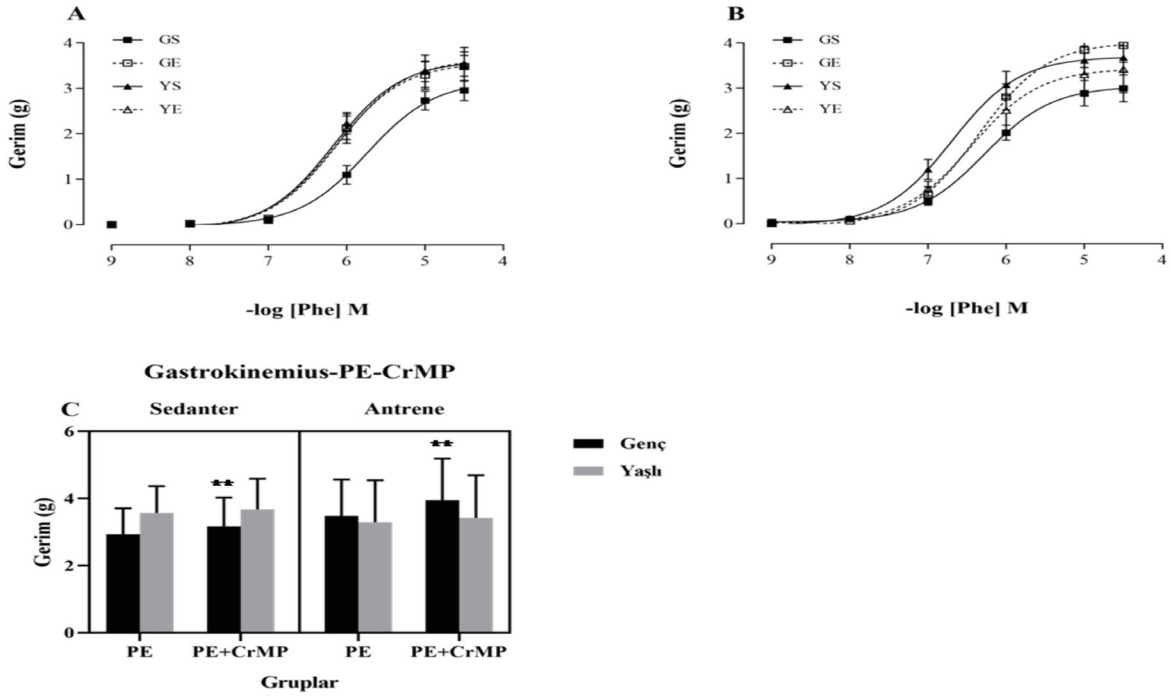


**Şekil 2.** Torasik aort halkalarına ait gevşeme yanıtları

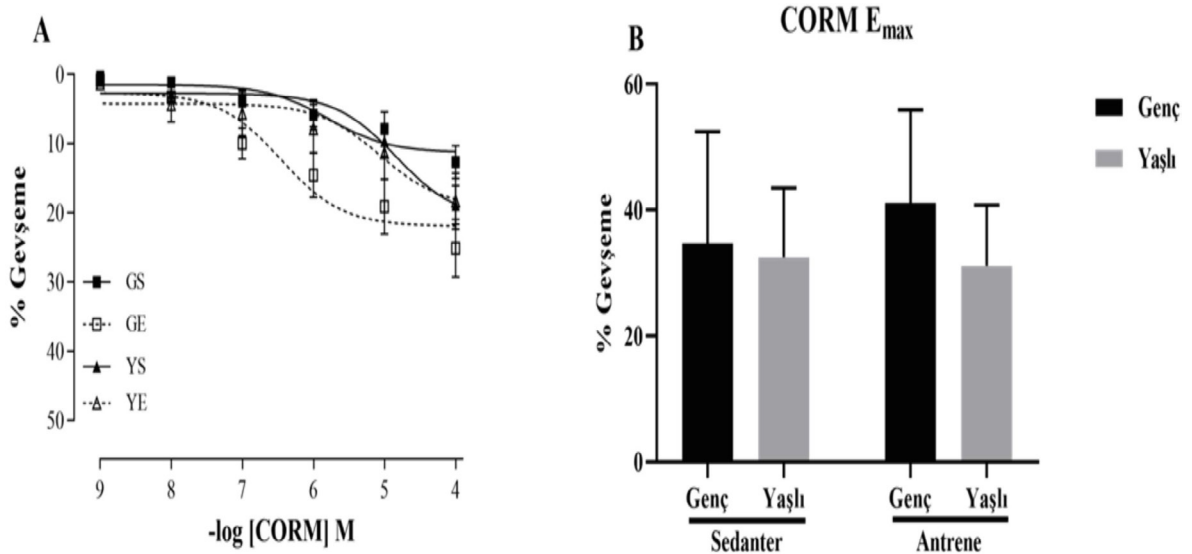
A: CORM doz-cevap eğrileri (10-9-3x10-4 M),

B: Torasik aort halkalarının maksimal gevşeme yanıtları (Emax).

\* p<0,05, GS grubundan fark, # p<0,05, GE grubundan fark



**Şekil 3.** Gastroknemius iletim arteri halkalarına ait kasılma yanıtları  
A: PE ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) doz-cevap eğrisi,  
B: HO inhibitörü CrMP varlığında PE ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) doz-yanıt eğrisi,  
C: PE ve CrMP varlığında PE'ye verilen maksimum kasılma yanıtları (Emax).  
\*\*  $p < 0,01$ , maksimum PE kasılma yanıtlarından fark



**Şekil 4.** Gastroknemius iletim arteri halkalarına ait gevşeme yanıtları  
A: CORM doz-cevap eğrileri ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-4}$  M),  
B: Gastroknemius iletim arteri halkalarının maksimal gevşeme yanıtları (Emax).



## TARTIŞMA

Endotel çevresel uyarılara yanıt olarak vazokonstriktör ve vazodilatör nitelikte maddeler sentezleyip, salgılayabilen dinamik bir organdır. Endotelyal disfonksiyonu geniş kapsamlı bir terimdir ve NO üretiminde bozulma ve / veya endotel-kaynaklı Endotelin1 (ET-1), anjiyotensin ve oksidanlar gibi gevşeme ve kasılma faktörlerinde dengesizliği ifade eder (21, 22). Yaşlılığa bağlı gelişen endotel disfonksiyonunun olası mekanizmaları arasında NO ve diğer endotel kaynaklı damar gevşetici faktörlerin sentezinde azalma sayılabilir. CO, NO ile benzer fizyolojik özelliklere sahiptir ve aynı zamanda NO için yedekleme molekülü olarak gösterilmektedir (13, 23, 24). Fakat yaşlılıkta, CO'in damar yanıtlarına etkisi bilinmemektedir.

Çalışmamızda; torasik aortada genç-sedanter grup ile kıyasladığımızda CrMP varlığında maksimum PE kasılma yanıtları genç-egzersiz, yaşlı-sedanter ve yaşlı-egzersiz gruplarında anlamlı olarak arttı. Yaşlanmayla birlikte CO'in vazodilatör etkisinin torasik aortada azaldığını, gastroknemius iletim arterinde ise değişmediğini tespit ettik. Egzersizin, her iki damar segmentinde gevşeme yanıtını arttırıcı bir katkısının olmadığını saptadık.

Endojen CO yanıtlarını incelemek için NO yanıtlarını incelemede kullanılan asetil kolin gibi belli bir uyarı yoktur. Damarın çeşitli kasıcı veya gevşetici agonistlere verdiği yanıt sonrası ortama eklenen HO inhibitörü sonrası yine aynı agoniste alınan yanıt ile aradaki fark endojen CO oluşumunu göstermektedir. Biz çalışmamızda önce damarların PE'e verdiği kümülatif kasılma yanıtlarını sonra HO enzim inhibitörü olan CrMP ile inkübasyon sonrası tekrar PE'e verdiği kasılma yanıtlarını kaydettik. İki uygulama arasındaki kasılma yanıtı artışını CO'in o damar segmentindeki endojen vazodilatör katkısı olarak kabul ettik. Torasik aorta'da endojen CO üretimi incelendiğinde gruplara arasında anlamlı bir fark yoktu fakat grupları kendi içinde değerlendirdiğimizde

GE, YS ve YE gruplarında anlamlı endojen artış tespit ettik. Bu damar segmentinde; CO'in, GS grubunda % 3,03, GE grubunda % 30,25, YS grupta % 26,88 ve YE grubunda ise % 32,69'luk endojen bir katkısı olduğunu tespit ettik.

Çalışmamızda, Torasik aorta ve gastroknemius iletim arteri halkalarında genç egzersiz gruplarında CrMP inkübasyonu sonrasında PE kasılma yanıtlarında anlamlı artış saptadık. Bu artışı, Meng-Wei Sun ve arkadaşları'nın (20) egzersiz sonucu damar halkalarında tespit ettikleri HO-1 ve HO-2 proteinlerindeki artış ile açıklayabiliriz. HO'in uyarılabilir formu olan HO-1'in torasik aortada protein ekspresyonunun önceki çalışmamızda egzersiz ile birlikte arttığı gösterildi (19). Bu durum HO-2'ye göre daha güçlü bir enzim olan HO-1'in artışı sonucu (25) torasik aortada endojen CO üretimi artışını açıklayabilir. Yaşlı gruplarda da CO'in endojen katkısı anlamlı olarak yüksekti fakat egzersizin ekstra bir katkısı olmadı. HO-1 enziminin uyarımları arasında egzersiz dışında oksidan stres, hipoksi, shear stres, ısı şoku, hidrojen peroksit sayılabilir (26). Yaşlanmayla birlikte oksidan stresin artması HO-1 ekspresyonunu tetikleyerek endojen katkının artışına neden olmuş olabilir.

CO son yıllarda önem kazanan vazodilatör ajanlardan biridir. Damarlar da vazodilatör etkisini sıklık guanozin mono fosfat (cGMP) ve kalsiyum bağımlı potasyum kanalları (BKCa ) üzerinden göstermektedir (27). Çalışmamızda, CO'in ekzojen katkısını ortaya koymak için CORM'a verilen gevşeme yanıtları kaydedildi. Torasik aortada yaşlanmayla birlikte CO gevşeme yanıtı anlamlı olarak azaldı. Yapılan çalışmalar torasik aortada yaşlanma ile soluble guanilat siklaz'ın down regüle olduğunu (28, 29), Marijic ve arkadaşları da BKCa'nın yaşlanmayla birlikte ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir, aynı zamanda Zhou ve arkadaşları da yaşlılıkta BKCa kanallarının fonksiyonlarının bozulduğunu saptamışlardır (30, 31). CO'in etki mekanizmalarında yaşlanma ile meydana gelen azalış CO'in vazodilatör

etkisini maskeleyiş olabilir. Bu da bizim torasik aortada maksimum CO gevşeme yanıtlarının azalmasını açıklayabilir.

Çok fazla sayıda damar yatağında iletim arterinden direnç arterine kadar CO yanıtını incelediğimiz çalışmada gastroknemius kasına ait damar yatağında sadece iletim arterinde endojen katkı tespit ettik (14). L-NAME hipertansif sıçanlarla yapmış olduğumuz çalışmamızda ise kontrol grubunda gastroknemius direnç arterinde CO yanıtında bir farklılık tespit edemediğimiz için şimdiki çalışmamızda egzersizin damar yanıtlarında ki adaptasyonel etkisini

gastroknemius iletim arterinde test ettik (19). Yaşlanmaya bağlı olarak ne endojen yanıtlarda ne de ekzojen yanıtta anlamlı bir farklılık tespit edemedik

Çalışmamızın sonuçları, yaşlanmayla birlikte torasik aortada yaşlı gruplarda CO'nun endojen katkısı artmasına rağmen CO gevşeme yanıtının azaldığını, gastroknemius iletim arterinde ise değişmediğini göstermektedir. Bulgularımız her iki damar segmentinde de egzersizin CO gevşeme yanıtını hem yaşlı hem de genç sıçanlarda arttırıcı bir katkısının olmadığını göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990;323(1):22-7.
2. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension.* 1993;21(62):929-33.
3. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, et al. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest.* 1990;86(1):228-34.
4. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest.* 1993;92(2):652-62.
5. Maeda S, Tanabe T, Miyauchi T, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, et al. Aerobic exercise training reduces plasma endothelin-1 concentration in older women. *J Appl Physiol.* 2003 ;95(1):336-41.
6. Maeda S, Tanabe T, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, Miyauchi T, et al. Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. *Hypertens Res.* 2004;27(12):947-53.
7. Dohi Y, Thiel MA, Buhler FR, Luscher TF. Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. Effect of age and hypertension. *Hypertension.* 1990;16(2):170-9.
8. Mayhan WG, Faraci FM, Baumbach GL, Heistad DD. Effects of aging on responses of cerebral arterioles. *Am J Physiol.* 1990;258:H1138-43.

9. Hayashi T, Yano K, Matsui-Hirai H, Yokoo H, Hattori Y, Iguchi A. Nitric oxide and endothelial cellular senescence. *Pharmacol Ther.* 2008;120(3):333-9.
10. Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension.* 2005;46(3):454-62.
11. Yildiz O. Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. *Ann NY Acad Sci.* 2007;1100:353-60.
12. Stec DE, Drummond HA, Vera T. Role of carbon monoxide in blood pressure regulation. *Hypertension.* 2008;51(3):597-604.
13. Ndisang JF, Tabien HE, Wang R. Carbon monoxide and hypertension. *J Hypertens.* 2004;22(6):1057-74.
14. Kocer G, Nasircilar Ulker S, Senturk UK. The contribution of carbon monoxide to vascular tonus. *Microcirculation.* 2018;25(7):e12495.
15. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. *Circulation.* 2003;107(1):139-46.
16. Nied RJ, Franklin B. Promoting and prescribing exercise for the elderly. *Am Fam Physician.* 2002;65(3):419-26.
17. Peterson JA. Get moving! Physical activity counseling in primary care. *J Am Acad Nurse Pract.* 2007;19(7):349-57.
18. Kuru O, Senturk UK, Kocer G, Ozdem S, Baskurt OK, Cetin A, et al. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol.* 2009;107(3):896-902
19. Ulker SN, Kocer G, Senturk UK. Carbon monoxide does not contribute to vascular tonus improvement in exercise-trained rats with chronic nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide.* 2017 1;65:60-7
20. Sun MW, Zhong MF, Gu J, Qian FL, Gu JZ, Chen H. Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase. *Hypertens Res.* 2008 ;31(4):805-16
21. Cohn JN. Arterial compliance to stratify cardiovascular risk: more precision in therapeutic decision making. *Am J Hypertens.* 2001;14:258S-63S
22. Incalza MA, D’Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018;100:1-19
23. Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):585-630
24. Thorup C, Jones CL, Gross SS, Moore LC, Goligorsky MS. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol.* 1999;277(6):F882-9
25. Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem.* 1986;261(1):411-9
26. Maines MD, Panahian N. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Adv Exp Med Biol.* 2001;502:249-72
27. Kim HH, Choi S. Therapeutic Aspects of Carbon Monoxide in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8)

28. Suades R, Cosentino F. Sirtuin 1/soluble guanylyl cyclase: a nitric oxide-independent pathway to rescue ageing-induced vascular dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2019;115(3):485-7
29. Kloss S, Bouloumie A, Mulsch A. Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. *Hypertension.* 2000;35(1):43-7

30. Marjic J, Li Q, Song M, Nishimaru K, Stefani E, Toro L. Decreased expression of voltage- and Ca(2+)-activated K(+) channels in coronary smooth muscle during aging. *Circ Res.* 2001 2;88(2):210-6
31. Zhou E, Qing D, Li J. Age-associated endothelial dysfunction in rat mesenteric arteries: roles of calcium-activated K(+) channels (K(ca)). *Physiol Res.* 2010;59(4):499-508

# Klorokuin endoplazmik retikulum stresini ve enflamasyonu inhibe ederek sıçanlarda adriamisin uyarılı kardiyotoksisteyi engeller

## Chloroquine inhibits adriamycin-induced cardiotoxicity in rats by inhibiting endoplasmic reticulum stress and inflammation

Emin KAYMAK<sup>1</sup>, Ali Tuğrul AKIN<sup>2</sup>, Emel ÖZTÜRK<sup>3</sup>, Tayfun CEYLAN<sup>4</sup>, Nurhan KULOĞLU<sup>4</sup>, Derya KARABULUT<sup>4</sup>, Birkan YAKAN<sup>4</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Adriamisin (ADR) kanser türlerinde kullanılan kemoterapötik bir ilaç olarak bilinmektedir. ADR uyarılı kardiyomiyopati toksik özelliğinden dolayı ilacın kullanımını zorlaştırmaktadır. ADR uyarılı kardiyotoksistede enflamasyon ve endoplazmik retikulum stresi (ERs) artmaktadır. Pek çok kanser türünde kullanılan kemoterapötik ilaç olan ADR'nin yol açtığı kardiyotoksisteye karşı sıtma ilacı olan klorokuin (CLQ) kullanımının ERs ve enflamasyon üzerinden koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

**Yöntem:** Sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı: Kontrol grubu (n = 8) dışındakilere, CLQ (n = 8) günde 50 mg/kg intraperitoneal (i.p.), ADR (n = 8) 2 mg/kg i.p. olarak her 3 günde bir, ADR + CLQ grubuna da (n = 8) 2mg/kg i.p. ADR + 50 mg/kg i.p. CLQ uygulandı. Deney toplam 30 gün sürdü. Deneyin sonunda, sıçanlar sakrifiye edildi ve kalp dokuları inceleme için hayvanlardan çıkarıldı. Kalp dokularındaki histopatolojik değişiklikler değerlendirildi ve ERs'yi belirlemek için (Glukoz düzenleyici protein) GRP78 antikor ve enflamasyon için tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) antikor ile immün boyama yapıldı. Fotoğraflar Olympus BX53 mikroskobu ile çekildi analiz edildi.

### ABSTRACT

**Objective:** Adriamycin (ADR) is known as a chemotherapeutic drug used in cancer types. ADR-induced cardiomyopathy makes it difficult to use the drug due to its toxic properties. Inflammation and ER stress increase in ADR-induced cardiotoxicity. The aim of this study was to investigate the protective effects of chloroquine (CLQ), a malaria medication used in many types of cancer, against the cardiotoxicity caused by ADR on endoplasmic reticulum stress and inflammation.

**Methods:** Rats were randomly divided into 4 groups: Control (n = 8), CLQ (n = 8) 50 mg/kg intraperitoneal (i.p.) daily, ADR (n = 8) 2 mg/kg i.p. every 3 days, ADR + CLQ (n = 8) 2mg/kg i.p. ADR + 50 mg/kg i.p. CLQ. The experiment lasted a total of 30 days. At the end of the experiment, the rats were sacrificed and the heart tissues were removed from the animals for examination. Histopathological changes in the heart tissues were evaluated and immune staining was performed with Glucose-regulated protein 78 (GRP78) antibody and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) antibody for inflammation to determine endoplasmic reticulum stress. Photos were taken with Olympus BX53 microscope and analyzed.

<sup>1</sup>Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-embriyoloji Anabilim Dalı, Yozgat

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri

<sup>3</sup>Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-embriyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa

<sup>4</sup>Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri



İletişim / Corresponding Author : Emin KAYMAK

Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-embriyoloji Anabilim Dalı, Yozgat - Türkiye

E-posta / E-mail : e\_kaymak@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 07.09.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 01.10.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.04378

Kaymak E, Akın AT, Öztürk E, Ceylan T, Kuloğlu N, Karabulut D, Yakan B. Klorokuin endoplazmik retikulum stresini ve enflamasyonu inhibe ederek sıçanlarda adriamisin uyarılı kardiyotoksisteyi engeller. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 459-466

**Bulgular:** ADR grubunun kontrol grubuna kıyasla histopatolojik bozulma gösterdiğini ve CLQ tedavisinin ADR tarafından indüklenen bu hasarı iyileştirdiği gözlemlendi. ADR grubunda GRP78 ve TNF- $\alpha$  immünoaktivitesinde kontrol grubuna göre artış vardı ( $p < 0.0001$ ). ADR + CLQ grubunda GRP78 ve TNF- $\alpha$  immünoaktivitesinde ADR grubuna göre azalma vardı ( $p < 0.0001$ ).

**Sonuç:** Kronik olarak ADR uygulanan sıçanların kalp dokusunda enflamasyonun ve ERs'nin önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Fakat ADR verilen sıçanlarda CLQ uygulamasıyla, ERs ve enflamasyon baskılanmıştır. Bu da tedavi uygulanan gruplarda kalp hasarını önemli ölçüde azaltmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Adriamisin, klorokuin, kalp, endoplasmik retikulum stresi, enflamasyon

**Results:** We observed that the ADR group showed histopathological impairment compared to the Control group and that CLQ treatment improved this ADR-induced damage. In the ADR group, there was an increase in GRP78 and TNF- $\alpha$  immunoreactivity compared to the control group ( $p < 0.0001$ ). In the ADR + CLQ group, GRP78 and TNF- $\alpha$  immunoreactivity decreased compared to the ADR group ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusion:** As a result, it was observed that the inflammation and endoplasmic reticulum stress significantly increased in the heart tissue of rats administered chronically ADR. However, endoplasmic reticulum stress and inflammation were suppressed by CLQ application in rats given ADR. This significantly reduced heart damage in the treated groups.

**Key Words:** Adriamycin, chloroquine, heart, endoplasmic reticulum stress, inflammation

## GİRİŞ

Adriamisin (ADR) pek çok kanser tedavisinde kullanılan kuvvetli bir terapötik maddedir (1). ADR solid ve hemotopoetik tümörlerin tedavisinde kullanılan antrasiklin bir ilaçtır (2). İlaç kanser hücrelerinde bu özelliğini topoizomeraz II ile DNA hasarının başlatılması ve apoptozisi gibi süreçlerle yapmaktadır (3). İlaç klinikte kullanılmasına rağmen yan etkieri de bulunmaktadır. Kanser hastalarında ADR kullanımı arasında böbrek, karaciğer, testis ve kalp gibi önemli organlarda hasara yol açmaktadır (4-7). ADR uyarılı kardiyomiyopati toksik özelliğinden dolayı ilacın kullanımını sınırlandırmaktadır (8). ADR uyarılı kardiyotoksositeye birçok mekanizma karışmaktadır. ADR kardiyomiyositlerde geri dönüşümsüz hasar oluşturabilmektedir. Sistolik ve diastolik fonksiyon kaybına yol açabilmektedir. Kalp yetmezliğine götürmektedir (8, 9). ADR vücuda girdiğine

mitokondride birikir ve oksidatif stresi oluşturarak apoptozise yol açmaktadır (10). Son yıllarda kaydedilen çalışmalarda ADR uyarılı kardiyotoksitede endoplasmik retikulum stresinin (ERs) de önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Endoplasmik retikulum (ER) yüksek oranda kalsiyum homeostazındaki değişikliklere ve serbest radikallere maruz kalmaya açıktır (11). ADR uyarılı kardiyotoksitede ER lümeninde yanlış katlanan proteinler ve katlanma seviyesindeki artışa bağlı olarak ERs'nin arttığı görülmüştür (11). Şaperon glikoz ayarlı protein 78 (GRP78) ER'da Ca<sup>2+</sup> homeostazı için önemlidir. ERs sırasında katlanmamış protein cevabının merkezi aracısı olan (GRP78), ADR kardiyotoksitesinde gen terapisi için potansiyel bir adaydır (12).

ADR uyarılı kardiyotoksitede mekanizmalarından bir diğeri de aşırı inflamasyon oluşumdur. İnflamatuar

hücrelerin aktivasyonu ve pro-inflamatuarların salınımı ile birlikte kardiyak fonksiyon bozukluğu meydana gelir (13). Proenflamatuar sitokinlerden olan tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ADR uyarılı kardiyotoksistide önemli role sahiptir. Kardiyotoksistide TNF- $\alpha$  seviyesinin arttığı görülmüştür (14).

Klorokuin (CLQ) antimalarial bir ilaç olarak kullanılmaktadır. Son dönemde ise yeni koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19)' da kullanılmaktadır (15, 16). CLQ'nun oksidatif stres ve enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (15, 17).

ADR uyarılı kardiyotoksistenin hala aydınlatılmış olmamakla birlikte kullanımında da sınırlamalar bulunmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, CLQ'nun ADR kaynaklı kardiyotoksisteye karşı koruyucu etkilerini ve olası mekanizmalarını araştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Deneysel Araştırma Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) üretilen 8 haftalık 150-200 g erişkin 32 Wistar albino tipi erkek sıçan kullanıldı. Kafeslerde tutulan sıçanlar günün normal düzeninde 21 °C'de ve 12 saat aydınlık / karanlık ortamda tutuldu ve su ve besin ihtiyacı karşılandı. Deneysel grupları deneklerin tartılması ve ağırlıklarının birbirine yakın olacak şekilde bir araya getirilmesiyle oluşturulmuştur.

## Deneysel prosedür

Deneyin başlangıcında, ratlar rastgele aşağıdaki gibi dört gruba ayrıldı; Kontrol grubu (n=8) tedavi edilmeyen sıçanlar, literatürle benzer şekilde 30 gün boyunca üç günde bir olmak üzere 2 mg/kg ADR intraperitoneal olarak (i.p.) ADR (n=8) grubuna uygulandı (18), CLQ grubu (n = 8) grubu 30 gün boyunca i.p. 50 mg/kg CLQ (19) ve ADR artı CLQ grubu (n=8) üç günde bir i.p. 2 mg/kg ADR ve 30 gün boyunca i.p. 50 mg/kg CLQ verildi. Deneyin sonunda hayvanlara ketamin ve ksilazin kombinasyonu ile anestezi uygulandı. Kalp dokuları deneklerden alındıktan sonra

histopatolojik ve immünohistokimyasal inceleme için formaldehite kondu.

## Histopatolojik değerlendirme

Kalp dokusunun yapısının histopatolojik değerlendirmesi rutin histolojik metodlar kullanılarak yapıldı. Kalp dokuları, %10 formalin çözeltisi içinde 24-48 saat süreyle sabitlendi, alkol ile dehidre edildi, ksilen ile temizlendi ve parafin içine gömüldü ve 5 um kalınlığında bölümler halinde kesildi. Doku örneklerindeki histopatolojik değişikliklerin değerlendirilmesi için hematoksilin-eozin (H&E) boyaması yapıldı (20). Fotoğraflar ışık mikroskopuyla (Olympus BX53; Olympus, Tokyo, Japan) çekildi ve çalışma grubu tarafından analiz edildi.

## İmmünohistokimya

Kalp dokularında GRP78 ve TNF-a antikorlarını araştırmak için immünohistokimya yöntemi kullanıldı. Avidin biyotin peroksidaz yöntemi, GRP78 (bs-1219R, Bioss) ve TNF- $\alpha$  (bs-2081R, Bioss) ekspresyonundaki farkı belirlemek için kullanıldı. Parafin kesitlerin ksilen ile parafini giderildi. Antijen geri kazanımı için, mikrodalgada 7 dakika süreyle 600 w'de 0.01 M% 10 sitrat tamponu uygulandı ve daha sonra oda sıcaklığında 10 dakika soğumaya bırakıldı. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kısımlar, endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için 12 dakika boyunca %3 hidrojen peroksit (H2O2) ile muamele edildi. 5 dakika boyunca tekrar PBS ile 3 kez yıkandı. Boyama kiti (TA-125-HDX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) sonraki adımlar için kullanıldı. PBS içinde 3 kez tekrar yıkandıktan sonra, dokulara ultra v blok çözeltisi ilave edildi ve tankta 10 dakika tutuldu. Daha sonra GRP78 ve TNF-a antikorları, dokulara ilave edildi ve gece boyunca 4 °C'de inkübe edildi. Yeniden yıkandıktan sonra, kitle bulunan ve iminobenzidin (DAB) (TA-060-HDX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) sergileyen peroksidaz, immünoaktivitesini görünür hale getirmek için peroksidaz substratı ile 1.5 dakika muamele edildi (6, 21, 22). Fotoğraflar ışık mikroskopuyla (Olympus BX53; Olympus, Tokyo, Japan) çekildi ve çalışma grubu tarafından analiz

edildi. Antikor ekspresyonlarını değerlendirmek için boyama yoğunluğuna göre 3 histolog tarafından her gruba 30 farklı alanda skor verildi. Bu skorlar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir;

0: boyanma yok, 1: az boyanma var, 2: orta şiddette boyanma var, 3: yoğun boyanma var.

### İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılımını belirlemek için Kolmogorov - Smirnov testi kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için One-way varyans analizi ve posthoc Tukey testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. İstatistiksel analiz için SPSS/PC programı (Sürüm 20.0; SPSS, Chicago, IL) ve Graph pad Prism 8.0 yazılımı kullanıldı.  $P < 0.05$ .

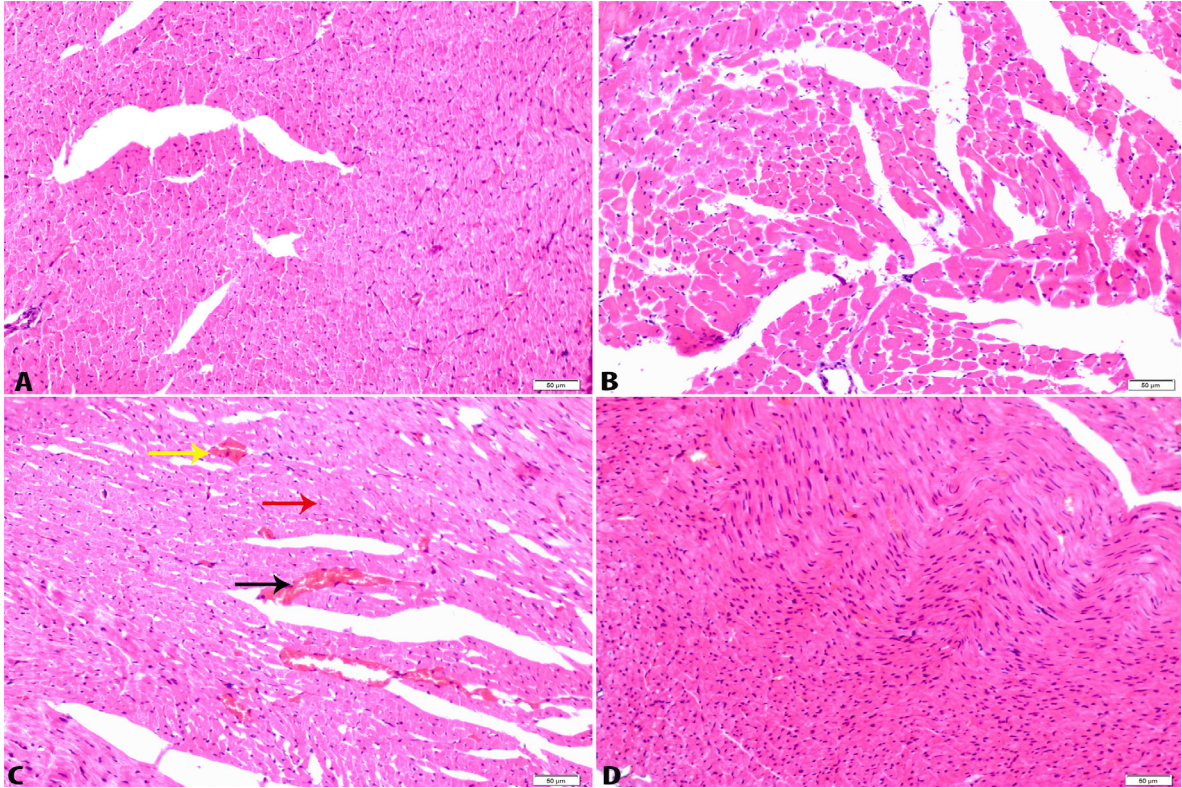
İstatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

### Histopatolojik bulgular

Hematoksilen ve eozin boyama görüntüsü Şekil 1'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda ve CLQ grubunda normal sağlıklı kalp görüntüsü mevcuttur. ADR uygulanan gruba bakıldığında, kalp hücrelerinde piknotik çekirdek, nekrotik hücreler ve hemorajinin olduğu alanlar görülmektedir. ADR+CLQ grubuna bakıldığında ise bu hasarlı bölgelerin azaldığı ve kontrole yakın bir kalp dokusu görülmektedir.

### İmmünohistokimyasal sonuçlar



**Şekil 1.** Grupların Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyama görüntüsü.

A. Kontrol grubu, B. CLQ grubu, C. ADR grubu, D. ADR+CLQ grubunu göstermektedir.

Sarı ok: nekrotik hücre, kırmızı ok: piknotik çekirdek ve siyah ok: hemoraji, Görüntü büyütmesi x200.

Kısaltmalar: ADR: Adriamisin, CLQ: Klorokuin



Kalp dokusunun immünohistokimyasal sonuçları ve boyama görüntüsü Tablo 1 ve Şekil 2' de gösterilmiştir. GRP78 ve TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi ADR grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

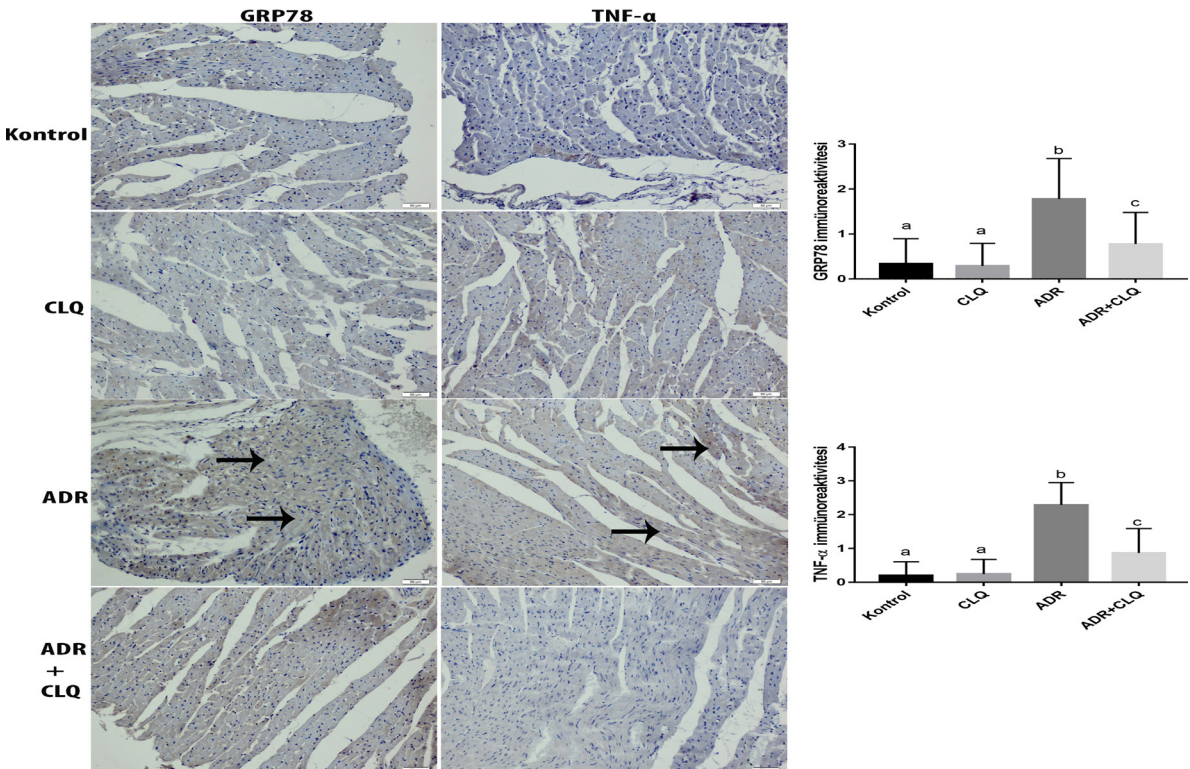
bir şekilde artış göstermiştir ( $p<0.0001$ ). ADR+CLQ grubunda GRP78 ve TNF- $\alpha$  immünreaktivitesi ADR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma göstermiştir ( $p<0.0001$ ).

**Tablo 1.** Gruplar arasında GRP78 ve TNF- $\alpha$  immünohistokimya sonuçları

Gruplar	Kontrol	CLQ	ADR	ADR+CLQ	<i>p</i>
GRP78 immünreaktivitesi	0.33 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	0.28 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	1.77 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.70 <sup>c</sup>	0.0001
TNF- $\alpha$ immünreaktivitesi	0.20 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	2.28 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>	0.86 $\pm$ 0.72 <sup>c</sup>	0.0001

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı harfi içeren gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır.  $p<0.05$  anlamlı kabul edilmiştir.

Kısaltmalar: ADR: Adriamisin, CLQ: Klorokuin, GRP78: Glukoz düzenleyici protein 78, TNF- $\alpha$ : Tümör nekrozis faktör- $\alpha$



**Şekil 2.** Kalp dokusunda gruplardaki GRP78 ve TNF- $\alpha$  immünohistokimya boyama görüntüleri.

Siyah oklar ile boyalı alanlar gösterilmektedir.

Görüntü büyütmesi X200.

Kısaltmalar: ADR: Adriamisin, CLQ: Klorokuin, GRP78: Glukoz düzenleyici protein 78, TNF- $\alpha$ : Tümör nekrozis faktör- $\alpha$

## TARTIŞMA

Biz bu çalışmada ADR uyarılı kardiyotoksisite üzerine CLQ'nun etkisini hayvan model üzerinde değerlendirdik. Bir antrasiklin kemoterapötik olan ADR'nin kardiyotoksisiteye yol açmakta ve ölümcül kalp hasarı oluşturmaktadır. ADR uygulanması reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla hasarı başlatmaktadır ve bunu da antrasiklin demir serbest radikal oluşumu ile yapmaktadır (23, 24). ADR ile yapılan çalışmalarda kalp dokusunda en önemli patojenik olaylardan birisi nekrozis, piknotik çekirdek, hemoraji ve vakuolizasyon gibi hasarlar görülmesidir (23, 25). Bizim çalışmamızda da nekrozis, piknotik çekirdek ve hemoraji gibi hasarlar ADR uygulanan grupta gözlenmektedir. Bu hasarlar ADR'nin kardiyotoksisitesini yansıtmaktadır. CLQ ile tedavi edilen grupta bu kardiyotoksisitenin verdiği hasarı önemli ölçüde azaldığını görmekteyiz.

ER, protein katlanmasında kilit rol oynayan bir organeldir. Çeşitli yıkıcı uyarılar ve hipoglisemi, enflamasyon, oksidatif stres ve hipoksi gibi patolojik durumlar ER fonksiyonunu bozabilir. Yapılan çalışmalarda ADR uyarılı kardiyotoksisitede ERs'nin arttığı ve bu süreçte rol oynayan GRP78 ifadesinde belirgin düzeyde yükseldiği görülmüştür (11, 12, 26-28). CLQ ile tedavi edilen grupta GRP78 ifadesinde önemli ölçüde azalma olduğu ve ERs'nin düştüğü görülmektedir. Bu da gösteriyor ki ADR tarafından oluşturulan kardiyotoksisiteye karşı ERs'nin azaltılmasında ve kalp hasarının azaltılmasında potansiyel olarak CLQ'nun önemini göstermektedir.

ADR, ERs yolunun bir kısmını spesifik olarak aktive eder, böylece enflamasyona yol açar (26, 27). ADR'ye maruz kalan dokuda daha sonra proenflamatuar sitokinlerden TNF- $\alpha$  artış göstermektedir (28-30). Yapılan çalışmalar CLQ'nun proenflamatuar sitokinlerden TNF- $\alpha$  seviyesini düşürerek enflamasyonu azalttığını göstermiştir (31-33). Bizim sonuçlarımızda benzer bir şekilde ADR ile birlikte inflamatuvar cevabı artırırken kalp fonksiyonunun bozulmasına yol açmaktadır. Çalışmamızda ADR grubunda artmış olan proenflamatuar sitokin TNF- $\alpha$  seviyesinin CLQ ile tedavi edildikten sonra önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. CLQ'nun yapılan çalışmalarda yüksek dozlarda uzun süre kullanımında kardiyotoksisiteye yol açtığı belirtilmiştir (34). Fakat bazı çalışmalarda bu ilacı kullanan ve kullanmayan kişilerde farklılık olmadığı da görülmüştür (35). Yüksek doz kullanımında kardiyotoksisiteye yol açmasına rağmen çalışmamızda kullanılan doz ile ADR uyarılı kardiyak enflamasyonun ve ERs'nin azalmasında rol oynadığı gösterilmiştir.

Bu sonuçlarla bizim çalışmamızda, ADR tarafından oluşturulan kardiyotoksisitede CLQ'nun, enflamasyonu ve ERs'yi azaltarak kalbin hasarına karşı korumada önemli rol oynayacağı yapılan yöntem ve analizlerle gösterilmiştir. Bu bulgular, CLQ'nun ADR kaynaklı kardiyotoksisitenin tedavisi için potansiyel bir terapötik olabileceğini düşündürmektedir. Yapılacak çalışmalar ile CLQ'nun antiinflamatuvar ve ERs üzerine etkileri aydınlatılacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Chung CK, Garcia-Couce J, Campos Y, Kralisch D, Bierau K, Chan A, et al. Doxorubicin loaded poloxamer thermosensitive hydrogels: chemical, pharmacological and biological evaluation. *Molecules*, 2020;25(9).
2. Jang YJ, Lee D, Hossain MA, Aravinthan A, Kang CW, Kim NS, et al. Korean Red Ginseng enhances cardiac hemodynamics on doxorubicin-induced toxicity in rats. *J Ginseng Res*, 2020;44(3):483-9.
3. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 2004;56(2):185-229.
4. Zhang Q, Wu G, Guo S, Liu Y, Liu Z. Effects of tristetraprolin on doxorubicin (adriamycin)-induced experimental kidney injury through inhibiting IL-13/STAT6 signal pathway. *Am J Trans Res*, 2020;12(4):1203-21.
5. Wali AF, Rashid S, Rashid SM, Ansari MA, Khan MR, Haq N, et al. Naringenin Regulates Doxorubicin-Induced Liver Dysfunction: Impact on Oxidative Stress and Inflammation. *Plants*, 2020;9(4).
6. Ozturk E, Kaymak E, Akin AT, Karabulut D, Unsal HM, Yakan B. Thymoquinone is a protective agent that reduces the negative effects of doxorubicin in rat testis. *Hum Exp Toxicol*, 2020;960327120924108.
7. Yang HL, Hsieh PL, Hung CH, Cheng HC, Chou WC, Chu PM, et al. Early moderate intensity aerobic exercise intervention prevents doxorubicin-caused cardiac dysfunction through inhibition of cardiac fibrosis and inflammation. *Cancers*, 2020;12(5).
8. Tadokoro T, Ikeda M, Ide T, Deguchi H, Ikeda S, Okabe K, et al. Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity. *JCI Insight*, 2020;5(9).
9. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, 2010;115(2):155-62.
10. Hu J, Wu Q, Wang Z, Hong J, Chen R, Li B, et al. Inhibition of CACNA1H attenuates doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by affecting endoplasmic reticulum stress. *Biomed Pharmacother*, 2019;120:109475.
11. Sishi BJ, Loos B, van Rooyen J, Engelbrecht AM. Doxorubicin induces protein ubiquitination and inhibits proteasome activity during cardiotoxicity. *Toxicol*, 2013;309:23-9.
12. Tscheschner H, Meinhardt E, Schlegel P, Jungmann A, Lehmann LH, Muller OJ, et al. CaMKII activation participates in doxorubicin cardiotoxicity and is attenuated by moderate GRP78 overexpression. *PLoS One*, 2019;14(4):e0215992.
13. Lan Y, Wang Y, Huang K, Zeng Q. Heat shock protein 22 attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating inflammation and apoptosis. *Front pharmacol*, 2020;11:257.
14. Bin Jardan YA, Ansari MA, Raish M, Alkharfy KM, Ahad A, Al-Jenoobi FI, et al. Sinapic acid ameliorates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity via the NF-kappaB-mediated pathway. *BioMed Res Int*, 2020;2020:3921796.
15. Hu TY, Frieman M, Wolfram J. Insights from nanomedicine into chloroquine efficacy against COVID-19. *Nat Nanotechnol*, 2020;15(4):247-9.
16. Askanase AD, Khalili L, Buyon JP. Thoughts on COVID-19 and autoimmune diseases. *Lupus Sci Med*, 2020;7(1):e000396.
17. Zhan F, Zhao G, Li X, Yang S, Yang W, Zhou S, et al. Inositol-requiring enzyme 1 alpha endoribonuclease specific inhibitor STF-083010 protects the liver from thioacetamide-induced oxidative stress, inflammation and injury by triggering hepatocyte autophagy. *Int Immunopharmacol*, 2019;73:261-9.
18. Shivakumar P, Rani MU, Reddy AG, Anjaneyulu Y. A study on the toxic effects of Doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicol Int*, 2012;19(3):241-4.
19. Long L, Yang X, Southwood M, Lu J, Marciniak SJ, Dunmore BJ, et al. Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation. *Circ Res*, 2013;112(8):1159-70.
20. Oztürk Küp F, Koçak B, Akin At, Doğanyığıt İ, Okan A, Kaymak E, et al. The effect of biosynthetic silver nanoparticles against intestinal toxicity caused by Lipopolysaccharide (LPS). *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2020;77(3):333-42.

21. Karabulut D, Ulusoy HB, Kaymak E, Sonmez MF. Therapeutic effects of pentoxifylline on diabetic heart tissue via NOS. *Anatol J Cardiol*, 2016;16(5):310-5.
22. Sönmez MF, Ozdemir Ş, Guzel M, Kaymak E. The ameliorative effects of vinpocetine on apoptosis and HSP-70 expression in testicular torsion in rats. *Biotech Histochem*, 2017;92(2):92-9.
23. Sharma A, Parikh M, Shah H, Gandhi T. Modulation of Nrf2 by quercetin in doxorubicin-treated rats. *Heliyon*, 2020;6(4):e03803.
24. Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcati S, Cairo G. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol*, 2014;5:25.
25. Sandamali JAN, Hewawasam RP, Jayatilaka K, Mudduwa LKB. Cardioprotective potential of *murraya koenigii* (L.) Spreng. leaf extract against Doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020;2020:6023737.
26. Liao D, Xiang D, Dang R, Xu P, Wang J, Han W, et al. Neuroprotective effects of dl-3-n-Butylphthalide against Doxorubicin-induced neuroinflammation, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and behavioral changes. *Oxid Med Cell Longev*, 2018;2018:9125601.
27. Chen RC, Sun GB, Ye JX, Wang J, Zhang MD, Sun XB. Salvianolic acid B attenuates doxorubicin-induced ER stress by inhibiting TRPC3 and TRPC6 mediated Ca(2+) overload in rat cardiomyocytes. *Toxicol Lett*, 2017;276:21-30.
28. Wang Z, Wang M, Liu J, Ye J, Jiang H, Xu Y, et al. Inhibition of TRPA1 attenuates Doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by suppressing oxidative stress, the inflammatory response, and endoplasmic reticulum stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2018;2018:5179468.
29. Rafiee Z, Moaiedi MZ, Gorji AV, Mansouri E. p-Coumaric acid mitigates Doxorubicin-induced nephrotoxicity through suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Arch Med Res*, 2020;51(1):32-40.
30. Xu Y, Lin H, Zheng W, Ye X, Yu L, Zhuang J, et al. Matrine ameliorates adriamycin-induced nephropathy in rats by enhancing renal function and modulating Th17/Treg balance. *Eur J Pharmacol*, 2016;791:491-501.
31. Yu T, Liu D, Gao M, Yang P, Zhang M, Song F, et al. Dexmedetomidine prevents septic myocardial dysfunction in rats via activation of alpha7nAChR and PI3K/Akt- mediated autophagy. *Biomed Pharmacother*, 2019;120:109231.
32. Yayi H, Yeda X, Huaxin W, Yang W, Qian S, Zhongyuan X. Toll-like receptor 7 involves the injury in acute kidney ischemia/reperfusion of STZ-induced diabetic rats. *Acta Cir Bras*, 2016;31(7):448-55.
33. Todorovic Z, Medic B, Basta-Jovanovic G, Radojevic Skodric S, Stojanovic R, Rovcanin B, et al. Acute pretreatment with chloroquine attenuates renal I/R injury in rats. *PLoS One*, 2014;9(3):e92673-e.
34. Mubagwa K. Cardiac effects and toxicity of chloroquine: a short update. *Int J Antimicrob Agents*, 2020;56(2):106057.
35. Costedoat-Chalumeau N, Hulot J-S, Amoura Z, Leroux G, Lechat P, Funck-Brentano C, et al. Heart conduction disorders related to antimalarials toxicity: an analysis of electrocardiograms in 85 patients treated with hydroxychloroquine for connective tissue diseases. *Rheumatology*, 2007;46(5):808-10.

## Nrf2 inhibitor brusatol ameliorates cecal ligation and puncture-induced lung injury in rats via anti-inflammation and anti-oxidative stress

Nrf2 inhibitörü brusatol, sıçanlarda anti-inflamasyon ve anti-oksidatif stres yoluyla çekal ligasyonu ve delinmeye bağlı akciğer hasarını iyileştirir

Ersen ERASLAN<sup>1</sup>, Ayhan TANYELİ<sup>2</sup>, Mustafa Can GÜLER<sup>2</sup>, Fazile Nur EKİNCİ-AKDEMİR<sup>3</sup>,  
Tuncer NACAR<sup>2</sup>, Ömer TOPDAĞI<sup>4</sup>, Elif POLAT<sup>5</sup>

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study is to investigate the possible beneficial effects of brusatol on lung injury caused by cecal ligation and puncture (CLP) model in rats.

**Methods:** In this study, 32 Sprague Dawley male rats were divided into 4 random groups. The groups were programmed as group 1 (sham), group 2 (CLP), group 3 (DMSO), and group 4 (0.5 mg/ml brusatol). In group 1, a midline vertical incision was applied to the abdominal region and closed again without forming a CLP model. Group 2 performed CLP for 18 hours. In group 3, 1% DMSO was administered intraperitoneally 0.3 ml once every two days for 10 days. The last application was made 30 minutes before CLP. In group 4, brusatol was administered intraperitoneally at 0.5 mg/ml once every two days for 10 days. The last application was made 30 minutes before CLP. After CLP was over, the rats were sacrificed and lung tissues were removed.

**Results:** MDA, MPO, OSI, TOS, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  values increased significantly in groups 2 and 3 compared to group 1, while SOD and TAS values decreased. Unlike the

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, brusatolün sıçanlarda çekal ligasyonu ve delinme (CLD) modelinin neden olduğu akciğer hasarı üzerine olası yararlı etkilerinin incelenmesidir.

**Yöntem:** Bu çalışmada 32 adet Sprague Dawley erkek sıçan 4 rastgele gruba ayrıldı. Gruplar; grup 1 (sham), grup 2 (CLD), grup 3 (DMSO) ve grup 4 (0.5 mg/ml brusatol) olarak programlandı. Grup 1'de karın bölgesine orta hatta dikey insizyon uygulandı ve CLD modeli oluşturmadan tekrar kapatıldı. Grup 2'de 18 saat CLD yapıldı. Grup 3'e, %1 DMSO 10 gün boyunca iki günde bir periton içine 0.3 ml uygulandı. Son uygulama CLD'den 30 dakika önce yapıldı. Grup 4'e brusatol 10 gün boyunca iki günde bir periton içine 0.5 mg/ml olarak uygulandı. Son uygulama CLD'den 30 dakika önce yapıldı. CLD bittikten sonra sıçanlar sakrifiye edildi ve akciğer dokuları çıkarıldı.

**Bulgular:** MDA, MPO, OSI, TOS, TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  değerleri grup 2 ve 3'te, grup 1'e kıyasla anlamlı derecede yükselirken, SOD ve TAS değerleri azaldı. Antioksidan enzim aktivitesindeki artışın aksine; MDA

<sup>1</sup>Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Yozgat

<sup>2</sup>Atatürk University, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Erzurum

<sup>3</sup>Ağrı İbrahim Çeçen University, High School of Health, Department of Nutrition and Dietetics, Ağrı

<sup>4</sup>Atatürk University, Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Erzurum

<sup>5</sup>Atatürk University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Erzurum



İletişim / Corresponding Author : Ersen ERASLAN

Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD. Kat: 3 66200 Yozgat - Türkiye

E-posta / E-mail : ersen.eraslan@bozok.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 07.04.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 21.10.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.75232

Ersan E, Tanyeli A, Güler MC, Ekinci-Akdemir FN, Nacar T, Topdağı Ö, Polat E. Nrf2 inhibitor brusatol ameliorates cecal ligation and puncture-induced lung injury in rats via anti-inflammation and anti-oxidative stress. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 467-476

increase in antioxidant enzyme activity; MDA level, MPO activity, TOS, OSI, TNF- $\alpha$  and IL-18 values decreased significantly in group 4 compared to groups 2 and 3.

**Conclusion:** As a result, brusatol may play an effective role against CLD-induced lung injury in rats.

**Key Words:** Brusatol, oxidative stress, cytokine, cecal ligation and puncture, lung

seviyesi, MPO aktivitesi, TOS, OSI, TNF- $\alpha$  ve IL-18 değerleri grup 4'te grup 2 ve 3'e göre önemli ölçüde azaldı.

**Sonuç:** Sıçanlarda CLD kaynaklı akciğer hasarına karşı brusatol etkin rol oynayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Brusatol, oksidatif stres, sitokin, çekal ligasyon ve delinme, akciğer

## INTRODUCTION

Sepsis is a complex and multifactorial disease which often causes morbidity and mortality after surgery, trauma, and burns. If it is not controlled, it threatens life by leading to multiple organ failure and even shock (1, 2). Lungs are believed to be the first and mostly affected organ due to intraabdominal sepsis (3). Sepsis studies show that excessive proinflammatory cytokine production causes severe acute lung injury (ALI) (4, 5). Infiltration of inflammatory cells into the lung is a main characteristic property in the ALI pathogenesis (6, 7). Reactive oxygen species (ROS) cause peroxidation of proteins and lipids, activation of transcriptional factors and nucleic acid injury which may cause lung damage (8).

Brusatol (BRU) is a quassinoid obtained from *Brucea* species. Its effects were investigated in various in vivo and in vitro research models (9-11). BRU is an inhibitor of nuclear factor erythroid derivative 2 (Nrf2) (12) and its positive effects have been reported in various cancers such as pancreas and lung cancers (13, 14). It has also been found to be effective in various intracellular signaling pathways (11, 15).

In present study, we aimed to evaluate the effects of BRU on lung tissue by using a cecal ligation and puncture (CLP) model (9) similar to human septic patients with metabolic and hemodynamic properties.

## MATERIAL and METHOD

### Ethical Approval and Animals

Current study was admitted by Atatürk University Experimental Animal Ethics Committee (Protocol no: 28.03.2019-58). The experimental study was performed at Atatürk University Experimental Animals Research and Application Center using healthy Sprague Dawley male rats weighing 230-260 g, procured by Atatürk University Experimental Animal Research and Application Center. Rats were placed in cages in laboratory mediums such as 12 hours of light, 12 hours of darkness, humidity of 55 % and 25°C mean temperature. They were fed with standard rat feed, and provided drinking water. The rats were deprived of food 12 hours before the experiment, but were allowed to drink water.

### Experimental Animals and Experimental Design

In this study, 32 healthy Sprague Dawley male rats were used. The rats were randomly assigned to 4 groups. The formation of groups and the applications were as follows. Group 1 (Sham group, n=8): Abdominal area was opened with a 2 cm incision to attain peritoneum and then closed with a 3.0 silk suture without any procedure. Group 2 (CLP group,

n=8): Creation of the CLP model: The abdominal area was opened with a 2 cm incision, and the cecum was isolated by reaching the peritoneum. Before piercing the ileocecal valve with an 18-gauge needle (4 holes), it was tied up to 2 cm distally. After the cecum was stepped back, the abdomen was sutured with a 3.0 silk suture. Group 3 (DMSO group, n=8): 1 % DMSO was administered intraperitoneally 0.3 ml once every two days for 10 days and the last application was applied 30 minutes before the CLP model was performed. Group 4 (0.5 mg/ml BRU group, n=8): BRU was given intraperitoneally 0.5 mg/ml every second days for 10 days, as described previously (16) and the last application was administered 30 minutes before the CLP model was performed. In the all groups, the abdominal region was washed with povidone-iodine after being shaved. Analgesic lidocaine solution was applied to the suture areas to remove the error margin that might be caused by pain stress. The rats were fasted postoperatively but were allowed access to drinking water.

### Biochemical Analysis

The samples were weighed for 100 mg and homogenized with 2 mL of phosphate buffer. Homogenized samples were centrifuged at 5000 rpm for 20 minutes at +4 °C. Then, the supernatants were carefully placed to microcentrifuge tubes and maintained at -80 °C. The principle of measurement of MDA, as a result of lipid peroxidation, is based on measuring the absorbance at 532 nm of the pink color compound formed as a result of MDA reaction and thiobarbituric acid (17). TAS and TOS values were determined using ELISA kits (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turkey). TOS to TAS ratio was admitted as OSI. Measurement of OSI value was as follows:

$$\text{OSI} = (\text{TOS } (\mu\text{mol/L})) / (\text{TAS}(\text{mmol/L})) \times 10$$

OSI was preferred as another indicant for oxidative stress. It has been proposed that OSI may demonstrate oxidative status more correctly than TOS (18). The activity of MPO measurement depends

on kinetic measurement of absorbance which has a 460 nm wavelength of yellowish-orange colored complex as due to action of o-dianisidine with MPO (oxidation) in the presence of hydrogen peroxide (19). The xanthine oxidase enzyme catalyzes the formation of uric acid from xanthine. In the end, consisted superoxide generates hydrogen peroxide and molecular oxygen via superoxide dismutase (SOD) enzyme. And also superoxide and tetrazolium react together to create a formazan dye in cases where SOD effect is inadequate and the act ability of SOD is determined with reference to this reaction's inhibition degree (20).

TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels in the lung homogenate were measured through commercial ELISA kits (Elabscience, Wuhan, China) using an ELISA reader (BioTEK Powerwave XS Winooski, UK). The entire experimental procedure was performed according to the manufacturer's working protocol.

### Statistical analysis

Biochemical parameters results were analyzed using a statistical analysis program. One-way ANOVA test was preferred for this purpose. Then, Tukey test was performed for group comparisons. The results were demonstrated as mean $\pm$ standard deviation (SD). P values < 0.05 were considered significant.

## RESULTS

### Effect of Brusatol Pretreatment on The Lung Tissues Levels of Oxidative Stress

When TOS and OSI levels were evaluated, it was found that these levels increased significantly in CLP and DMSO groups compared to sham control group. Same values significantly decreased in BRU group compared to CLP and DMSO groups (Table 1, p<0.05). It was determined that TAS value was significantly decreased in CLP and DMSO groups compared to sham group. But it was significantly increased in BRU group compared to CLP and DMSO groups (Table 1, p<0.05).

**Table 1.** TAS, TOS and OSI levels of Brusatol in CLP-induced sepsis in rats

	TAS (mmol/L)	TOS ( $\mu$ mol/L)	OSI
Sham	0,79 $\pm$ 0,97	6,34 $\pm$ 0,62	0,80 $\pm$ 0,10
CLP	0,34 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	10,28 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup>	3,02 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>
DMSO	0,33 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	10,34 $\pm$ 1,11 <sup>b</sup>	3,15 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>
BRU	0,77 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	6,75 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>	0,87 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>

Results were expressed as mean  $\pm$  SD.

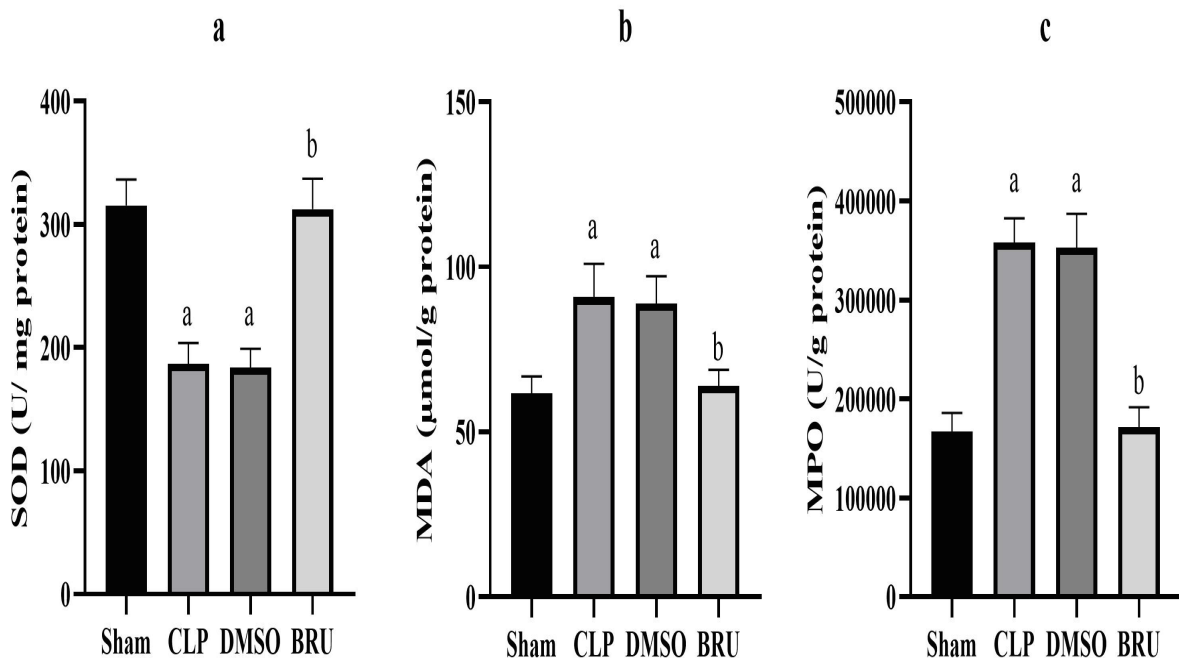
n = 8 for each group.

ap < 0.05 compared with sham group (C).

bp < 0.05 compared with CLP and CLP+DMSO groups.

SOD activity decreased significantly in CLP and DMSO groups compared to sham group. On the other side in BRU group there was a significant increase in SOD activity compared to CLP and DMSO groups (Fig. 1a, p<0.05). In addition, MPO activity and MDA levels

were significantly higher in CLP and DMSO groups compared to sham group. But decreased in BRU group compared to CLP and DMSO groups (Fig. 1b and 1c, p<0.05).

**Figure 1.** Effect of BRU (0.5 mg/ml every second days for 10 days i.p.) in sepsis models by CLP-induced in rats.

(a) SOD levels, (b) MDA levels and (c) MPO levels.

Results were expressed as mean $\pm$ SD.

n=8 for each group.

ap<0.05 compared with sham group.

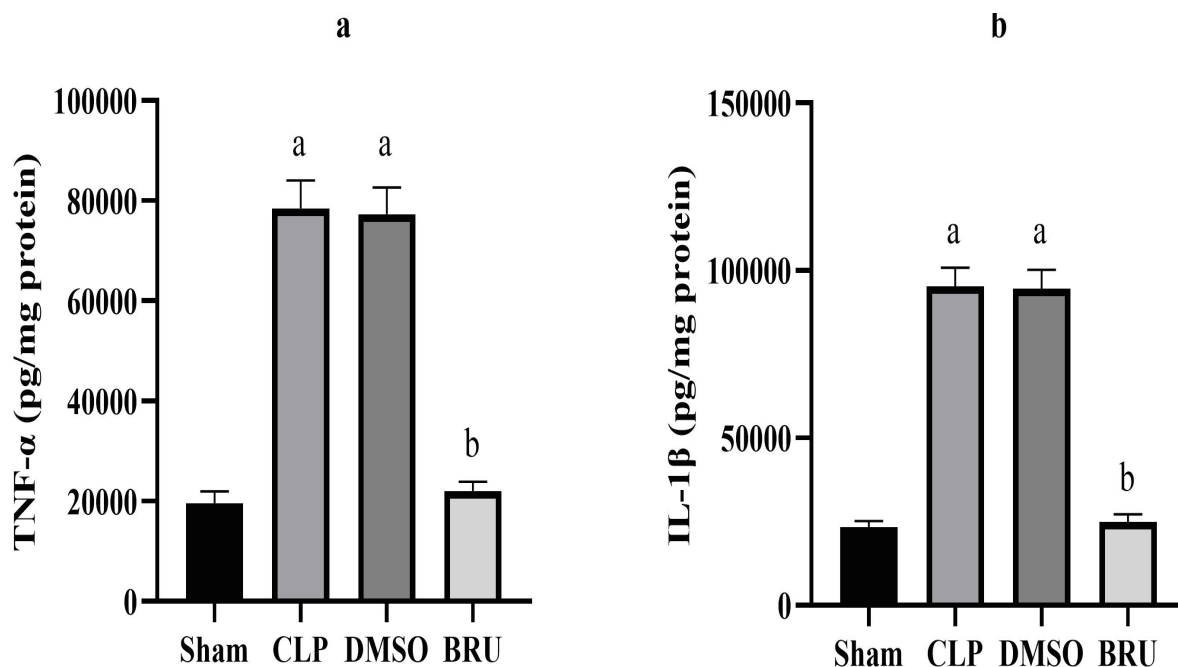
bp<0.05 compared with CLP and DMSO groups



### Effect of Brusatol on Pro-inflammatory Cytokines

When TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels were analyzed, CLP and DMSO groups were found to be significantly

elevated compared to sham group, whereas in BRU group these values were significantly decreased compared to CLP and DMSO groups (Fig. 2,  $p < 0.05$ ).



**Figure 2.** Effect of BRU (0.5 mg/ml every second days for 10 days i.p.) on different cytokines levels in CLP-induced sepsis rats.

(a) TNF- $\alpha$  levels and

(b) IL-1 $\beta$  levels.

Results were expressed as mean $\pm$ SD.

n=8 for each group.

ap<0.05 compared with sham group.

bp<0.05 compared with CLP and DMSO groups.

### DISCUSSION

Sepsis is the most common cause of death in hospitalized patients, resulting in millions of deaths each year (21). Organ failure is one of the most common sepsis complications, and the lung is the most easily damaged organ in the sepsis process (22).

In more or less 50% of severe sepsis cases, ALI and its more dangerous form, acute respiratory distress syndrome (ARDS) occurs (23, 24). Sepsis related morbidity/mortality takes place due to multiple organ injury and dysfunction (most commonly causes ALI/ARDS) (25-28). In the injury pathogenesis and repair process of ALI, inflammatory response has a main role

(29). It has been shown in numerous clinical studies that proinflammatory cytokines, especially TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 participate in early development of ALI (30). In experimental and clinical researchs it has been demonstrated that harmful tissue conditions such as sepsis is sensed by monocytes and macrophages which take role in cytokine secretion (IL-1, TNF- $\alpha$ , etc.) (31, 32). A certain part of CLP sepsis pathophysiology is composed of neutrophil accumulation and degranulation (33, 34). Neutrophil cytoplasmic granules include MPO as a main content and so, MPO activity is accepted as a pulmonary neutrophil accumulation index (35). MDA is an end product of lipid peroxidation which causes cell damage by membrane polymerization and cross linking induction (36). When polyunsaturated fatty acids are oxidized, MDA occurs and it is an indicator for ROS damage (37).

SOD performs as an antioxidant agent by catalyzing superoxide free radical conversion into oxygen molecule and hydrogen peroxide. SOD and so on antioxidant agents neutralize free radicals and prevent tissues (38). Reduction in antioxidant amounts and increase in ROS production result in favor of oxidative stress when the oxidative-antioxidative balance is evaluated (39). If the immune system is triggered to be activated, free radical releasing is observed and this leads to lipid, protein and DNA peroxidation. Furthermore, macrophage-induced ROS production causes injury in lung tissue endothelium and ARDS (40). Demirbilek et al. (41) indicated that levels of glutathione peroxidase (GSH-Px), SOD and catalase (CAT) reduced in lung tissue during CLP-induced sepsis.

When compared to other models, it has been observed that CLP model supports much more the nature and course of clinical sepsis (42, 43). The dominant animal model of intraabdominal sepsis is rodent CLP (44).

Many BRU-related studies are available in the literature supporting the results of present study.

In this study, reduction of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in septic rats by BRU suggests that BRU alleviated CLP-induced ALI. BRU has been shown to be a potent antitumor agent in the colorectal cancer model in mice (45). BRU has been shown to inhibit amyloid-induced neurotoxicity and decrease ROS in U-251 cells (46). BRU has been shown to normalize glucose intolerance due to high fat diet in C57BL/6 mice and to have anti-inflammatory properties (47). BRU has been reported to improve the experimental colitis model in rats by decreasing IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels and by increasing SOD, GSH and CAT levels (48). BRU has been shown to inhibit the response of cultured beta cells to proinflammatory cytokines in vitro (49). In another study, it was reported that BRU reduced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels against chronic obstructive pulmonary disease-like inflammation in the mouse model (9). In parallel with these studies, in this study, antioxidant and anti-inflammatory properties of BRU have been shown in CLP-induced sepsis model in rats. In the CLP group, TAS and SOD decreased while MDA, MPO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TOS, OSI levels were increased compared to sham control group and BRU treatment reversed these levels compared to CLP and DMSO groups.

We investigated oxidative stress in lung tissue to find the potential protective mechanisms BRU against CLP-induced lung injury. It was observed that oxidative stress related parameters decreased with BRU.

To perform effective changes in sepsis clinical management, septic organ damage pathogenesis should be understood to develop better therapeutic strategies. It is clearly observed in sepsis studies that inflammation, oxidative stress suppression can provide significant contributions to sepsis treatment. In current study inflammatory response and oxidative stress pathways were diminished by BRU and this may be an important step in the treatment of sepsis.

## CONCLUSION

BRU provides a protection against lung injury by CLP-induced sepsis with its antioxidant and anti-inflammatory effects. Treatment with BRU reduces lung damage in rats exposed to CLP-induced sepsis

model. Moreover, further researches are necessary to explain the other protective mechanisms in lung tissue damage induced by sepsis.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank all participants for contributing in the present survey and also thank to Kardelen Erdoğan and Yaylagülü Yaman, undergraduates of Atatürk University Nursing Faculty, for their effort, help and support during the experiment.

## REFERENCES

1. Russell JA. Management of sepsis. *N Engl J Med*. 2006;355(16):1699-713.
2. Nemzek JA, Hugunin KM, Opp MR. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comp Med*. 2008;58(2):120-8.
3. Babayigit H, Kucuk C, Sozuer E, Yazici C, Kose K, Akgun H. Protective effect of beta-glucan on lung injury after cecal ligation and puncture in rats. *Intensive Care Med*. 2005;31(6):865-70.
4. Yang L, Li D, Zhuo Y, Zhang S, Wang X, Gao H. Protective Role of Liriodendrin in Sepsis-Induced Acute Lung Injury. *Inflammation*. 2016;39(5):1805-13.
5. Zhai Y, Zhou X, Dai Q, Fan Y, Huang X. Hydrogen-rich saline ameliorates lung injury associated with cecal ligation and puncture-induced sepsis in rats. *Exp Mol Pathol*. 2015;98(2):268-76.
6. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Critical care medicine*. 2003;31(4 Suppl):S195-9.
7. Ayhan Tanyeli DGE. The Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Alliin on Cecal Ligation and Puncture (CLP)-Induced Lung Injury. *TJOS Science*. 2019;4(2):46-59.
8. Suliman HB, Carraway MS, Piantadosi CA. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):570-9.

9. Tang W, Xie J, Xu S, Lv H, Lin M, Yuan S, et al. Novel nitric oxide-releasing derivatives of brusatol as anti-inflammatory agents: design, synthesis, biological evaluation, and nitric oxide release studies. *J Med Chem.* 2014;57(18):7600-12.
10. Zhu S, Liu S, Wang L, Ding W, Sha J, Qian H, et al. Brusatol Protects HepG2 Cells against Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Injury via Inhibiting Mitochondrial Reactive Oxygen Species-Induced Oxidative Stress. *Pharmacology.* 2019:1-8.
11. Bu T, Wang C, Meng Q, Huo X, Sun H, Sun P, et al. Hepatoprotective effect of rhein against methotrexate-induced liver toxicity. *Eur J Pharmacol.* 2018;834:266-73.
12. Ren D, Villeneuve NF, Jiang T, Wu T, Lau A, Toppin HA, et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(4):1433-8.
13. Xiang Y, Ye W, Huang C, Yu D, Chen H, Deng T, et al. Brusatol Enhances the Chemotherapy Efficacy of Gemcitabine in Pancreatic Cancer via the Nrf2 Signalling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:2360427.
14. Park SH, Kim JH, Ko E, Kim JY, Park MJ, Kim MJ, et al. Resistance to gefitinib and cross-resistance to irreversible EGFR-TKIs mediated by disruption of the Keap1-Nrf2 pathway in human lung cancer cells. *Faseb J.* 2018:fj201800011R.
15. Xiang Y, Ye W, Huang C, Lou B, Zhang J, Yu D, et al. Brusatol inhibits growth and induces apoptosis in pancreatic cancer cells via JNK/p38 MAPK/NF-kappaB/Stat3/Bcl-2 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;487(4):820-6.
16. Meng QT, Chen R, Chen C, Su K, Li W, Tang LH, et al. Transcription factors Nrf2 and NF-kappaB contribute to inflammation and apoptosis induced by intestinal ischemia-reperfusion in mice. *Int J Mol Med.* 2017;40(6):1731-40.
17. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal-Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-8.
18. Harma M, Harma M, Kocyigit A, Erel O. Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *Mutat Res-Gen Tox En.* 2005;583(1):49-54.
19. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982;78(3):206-9.
20. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide-Dismutase. *Clin Chem.* 1988;34(3):497-500.
21. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-10.
22. Sadowitz B, Roy S, Gatto LA, Habashi N, Nieman G. Lung injury induced by sepsis: lessons learned from large animal models and future directions for treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(12):1169-78.
23. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1685-93.
24. Maybauer MO, Maybauer DM, Herndon DN. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med.* 2006;354(4):416-7.
25. Husak L, Marcuzzi A, Herring J, Wen E, Yin L, Capan DD, et al. National analysis of sepsis hospitalizations and factors contributing to sepsis in-hospital mortality in Canada. *Healthcare quarterly (Toronto, Ont).* 2010;13:35-41.
26. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine.* 2001;29(7):1303-10.

27. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348(2):138-50.
28. Sandrock CE, Albertson TE. Controversies in the treatment of sepsis. *Seminars in respiratory and critical care medicine.* 2010;31(1):66-78.
29. Curley G, Hayes M, Laffey JG. Can 'permissive' hypercapnia modulate the severity of sepsis-induced ALI/ARDS? *Critical care (London, England).* 2011;15(2):212.
30. Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol.* 2004;202(2):145-56.
31. Swantek JL, Tsen MF, Cobb MH, Thomas JA. IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol.* (Baltimore, Md : 1950). 2000;164(8):4301-6.
32. Lin HI, Chu SJ, Wang D, Feng NH. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi.* 2004;37(1):8-15.
33. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock (Augusta, Ga).* 2008;30 1:3-9.
34. Ayhan Tanyeli EE, Mustafa Can Guler, Saime Ozbek Sebin, Demet Celebi, Fatma Betul Ozgeris, Erdem Toktay. Investigation of biochemical and histopathological effects of tarantula cubensis D6 on lung tissue in cecal ligation and puncture-induced polymicrobial sepsis model in rats. *Medicine Science.* 2019;8:644-50.
35. Li S, Bao HG, Han L, Liu L, Wang X. Effects of adiponectin on mortality and its mechanism in a sepsis mouse model. *J Invest Surg.* 2012;25(4):214-9.
36. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 1998;39(8):1529-42.
37. Qian H, Liu D. The time course of malondialdehyde production following impact injury to rat spinal cord as measured by microdialysis and high pressure liquid chromatography. *Neurochemical research.* 1997;22(10):1231-6.
38. Arosio B, Gagliano N, Fusaro LM, Parmeggiani L, Tagliabue J, Galetti P, et al. Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacol Toxicol.* 2000;87(5):229-33.
39. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985;312(3):159-63.
40. Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, Evans TW. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J.* 1998;11(3):745-57.
41. Demirbilek S, Ersoy MO, Demirbilek S, Karaman A, Akin M, Bayraktar M, et al. Effects of polyenylphosphatidylcholine on cytokines, nitrite/nitrate levels, antioxidant activity and lipid peroxidation in rats with sepsis. *Intensive Care Med.* 2004;30(10):1974-8.
42. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser N, et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock (Augusta, Ga).* 2004;21(6):505-11.
43. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock (Augusta, Ga).* 2005;24:52-7.
44. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock (Augusta, Ga).* 2000;13(2):110-6.
45. Evans JP, Winiarski BK, Sutton PA, Jones RP, Ressel L, Duckworth CA, et al. Correction: The Nrf2 inhibitor brusatol is a potent antitumour agent in an orthotopic mouse model of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2019;10(6):685.

46. Evans JP, Winiarski BK, Sutton PA, Jones RP, Ressel L, Duckworth CA, et al. Correction: The Nrf2 inhibitor brusatol is a potent antitumour agent in an orthotopic mouse model of colorectal cancer. *Oncotarget*. 2019;10(6):685.
47. Turpaev K, Krizhanovskii C, Wang X, Sargsyan E, Bergsten P, Welsh N. The protein synthesis inhibitor brusatol normalizes high-fat diet-induced glucose intolerance in male C57BL/6 mice: role of translation factor eIF5A hypusination. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2019;33(3):3510-22.
48. Zhou J, Wang T, Dou Y, Huang Y, Qu C, Gao J, et al. Brusatol ameliorates 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced experimental colitis in rats: Involvement of NF-kappaB pathway and NLRP3 inflammasome. *Int Immunopharmacol*. 2018;64:264-74.
49. Turpaev K, Welsh N. Brusatol inhibits the response of cultured beta-cells to pro-inflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;460(3):868-72.

# Grup A Streptokok ve İnfluenza A/B'nin sebep olduğu üst solunum yolu enfeksiyonlarının karşılaştırılması

## A comparison of upper respiratory tract infections caused by Group A Streptococci and Influenza A/B

Hayrettin TEMEL<sup>1</sup>, Mehmet GÜNDÜZ<sup>1</sup>

### ÖZET

**Amaç:** İnfluenza koenfeksiyonu şeklinde olan bakteriyel enfeksiyonlar özellikle yaşlılar ve küçük çocuklar gibi yüksek riskli gruplar arasında ciddi bir morbidite ve mortalite nedenidir. Çalışmamızda olgularımızda saptanan grup A streptokok ile influenza virüs tip A ve tip B nedenli üst solunum yolu enfeksiyonlarının klinik ve laboratuvar bulgularının karşılaştırılması ile her iki etkenin koenfeksiyon sıklığının irdelenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmaya üçüncü basamak hastanemiz pediatri kliniğine üst solunum yolu enfeksiyonları şikayetiyle 2019 Ocak - 2020 Ocak tarihleri arasında başvuran ve streptokok hızlı antijen testi ile influenza A ve B hızlı testleri uygulanan toplam 1884 çocuk hasta dahil edildi. Eş zamanlı olarak çocukların tam kan sayımı ve C-reaktif protein testleri de çalışılmış olup sonuçlar influenza virüsü ve grup A streptokok enfeksiyonları için karşılaştırıldı. Sonuçların istatistiksel analizi yapıldı ve  $p < 0.005$  değerleri anlamlı kabul edildi.

**Bulgular:** Hastaların %54.6'sı erkek, %45.4'ü kız olup yaşları ortalaması yaşı  $5.0 \pm 3.1$  yıldır. Hastaların 1174'ünde (%62.3) grup A streptokok veya influenza virüsleri saptanmadı. Toplam 226 hastada (%12.0) grup

### ABSTRACT

**Objective:** Coinfections of influenza virus with bacterial infections are an important cause of morbidity and mortality, especially among high-risk groups like young children and the elderly. This study aimed at the comparison between clinical and laboratory findings of upper respiratory tract infections caused by group A streptococcus and influenza virus type A and B to determine the frequency of coinfection.

**Methods:** A total of 1884 patients who applied to the pediatrics clinic of our tertiary referral hospital with complaints of upper respiratory tract infections between January 2019 and January 2020 which were performed the antigen group a streptococcus and influenza A and B rapid tests were included to our study. Complete blood counts and C-reactive protein tests were compared in between the patients with influenza virus and group A streptococcus. Values of  $< 0.005$  p were considered statistically significant.

**Results:** Total of the patients of 54.6% were male and 45.4% were female. Mean age was  $5 \pm 3.1$  years (range, 2-26 years). 1174 (62.3) of patients were tested negative for the group A streptococcus and the influenza virus. Group A streptococcus was found in 226 patients (12.0%), the

<sup>1</sup>Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD., İstanbul



İletişim / Corresponding Author : Hayrettin TEMEL

İstanbul Medipol Üni., Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD., 34214 Bağcılar, İstanbul - Türkiye

E-posta / E-mail : hayrettintemel@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 04.04.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 26.11.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.34033

Temel H, Gündüz M. Grup A Streptokok ve İnfluenza A/B'nin sebep olduğu üst solunum yolu enfeksiyonlarının karşılaştırılması. Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 477-486

A streptokok, 319 hastada (%16.9) influenza virüs tip A, 118 hastada (%6.3) influenza virüs tip B, 47 hastada (%2.5) ise grup A streptokok ve influenza virüs tip A birlikte saptandı. Gruplar arasında cinsiyet açısından istatistiksel farklılık yoktu ( $p=0.6$ ). Ortalama lökosit ve nötrofil düzeyleri streptokok enfeksiyonu olan hasta grubunda diğer tüm gruplara göre anlamlı yüksek bulundu ( $p<0.001$ ). Ortalama nötrofil düzeyi negatif grupta grup A streptokok dışındaki gruplara göre; grup A streptokok grubunda ise influenza A ile grup A streptokok+influenza A gruplarına göre anlamlı yüksekti ( $p<0.001$ ). Ortalama monosit, trombosit ve C-reaktif protein düzeyleri hem negatif grupta hem de grup A streptokok grubunda diğer gruplara göre anlamlı yüksek bulundu ( $p<0.001$ ). Gruplar arasında ateş, boğaz ağrısı, yutkunma güçlüğü, burun akıntısı ve tıkanıklığı, hırıltılı solunum, bulantı, kusma, karın ağrısı, iştahsızlık ve halsizlik düzeyleri açısından anlamlı fark bulunamadı ( $p>0.005$ ). Ancak influenza A grubunda öksürük düzeyi (%61.8) diğer gruplardan anlamlı yüksek bulundu ( $p<0.001$ ).

**Sonuç:** Sonuç olarak üst solunum yolu enfeksiyonu geçiren çocuk hastalarda etkenin viral mi bakteriyel mi olduğu hızlı ve doğru olarak saptanmalıdır. Çalışmamızın, hem grup A streptokokların hem de influenza virüslerin hızlı antijen testleriyle çalışılmış olması ve klinik ve laboratuvar bulguların karşılaştırılması yönüyle klinisyenler ve araştırmacılar için yol gösterici olabilecek veriler sağladığı düşüncesine ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Grup A streptokok, influenza A, influenza B, koenfeksiyon

influenza virus type A was found in 319 patients (16.9%), the influenza virus type B was found in 118 patients (6.3%) and the coinfection of group A streptococcus and influenza virus type A were found positively in 47 patients (2.5%). There was no significant statistical difference between the groups regarding gender. Mean leukocyte and neutrophil levels were significantly higher in patients with the streptococcal infection than in all the other groups ( $p<0.001$ ). The mean neutrophil levels in the negative group were higher than other groups, except the group A streptococcus group. Also the neutrophil levels of group A Streptococcus were significantly higher than the influenza A and the influenza A + group A streptococcus ( $p<0.001$ ). Mean monocyte, platelet, and C-reactive protein levels in the negative group and the group A streptococcus group were determined significantly higher. ( $p<0.001$ ). There was no significant difference between the groups in terms of fever, sore throat, difficulty in swallowing, runny nose, nasal congestion, wheezing, nausea, vomiting, abdominal pain and loss of appetite and weakness ( $p>0.005$ ). The cough levels in the influenza A group (61.8%) were significantly higher compared to the other groups ( $p<0.001$ ).

**Conclusion:** Whether the agent of the cause of the upper respiratory tract infections is viral or bacterial should be determined rapidly and accurately in children. It was concluded that our study provided data that could be a guide for clinicians and researchers by rapid antigen tests of both group A streptococci and influenza viruses and by comparing clinical and laboratory findings.

**Key Words:** Group A streptococcus, influenza A, influenza B, co-infection

## GİRİŞ

Üst solunum yolu enfeksiyonları (ÜSYE) özellikle çocuk hastalarda kliniklere en sık başvuru nedenlerindedir. ÜSYE olguları çoğunlukla viral veya bakteriyel etkenlerden kaynaklanmaktadır.

Viral nedenli ÜSYE olgularında gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi açısından etkenin belirlenmesi önem taşımaktadır (1-3). İnfluenza A ve B virüsleri ise en sık ÜSYE nedeni olan virüsler arasındadır.



İnfluenza virüsü kaynaklı ÜSYE olguları yüksek ateş, burun akıntısı, iştahsızlık, halsizlik, bulantı, kusma, boğaz ağrısı ve öksürük gibi çok çeşitli belirtilerle kendini gösterebilir ve özellikle alt solunum yolu enfeksiyonlarının eşlik etmesiyle mortal seyredebilir. Çocuklarda solunum yolu enfeksiyonları ayaktan kliniğe başvuran hastalarda %30-60 sıklığında, hastaneye yatırılan hastalarda %20-30 sıklığında görülmektedir. Rutin mikrobiyolojik tanıda maliyeti uygun ve hızlı testler tercih edilmektedir (4-7).

ÜSYE olgularının bir kısmı bakteriyel nedenlidir. Bakteriyel etkenler arasında en sık etken grup A streptokoklardır (GAS). GAS kaynaklı üst solunum yolu enfeksiyonları olgularında süpüratif ve non-süpüratif komplikasyonlar gelişebilmektedir. Bu nedenle etkenin hızlı ve doğru olarak belirlenmesi doğru ve tedavinin hızlı şekilde başlanması açısından önemlidir. Uygun örnek alımı yapılmış ÜSYE olgularında GAS'ların saptanmasında boğaz kültürü altın standart yöntem olsa da bu yöntemle sonuç alınması zaman almaktadır. Bu nedenle bu olgularda hızlı strep A testi ile GAS'lara özgü antijenler saptanabilmektedir (8-12).

İnfluenza ve GAS'ların neden olduğu akut ÜSYE ayrıcı tanısı dikkatli yapılmazsa kolay karışabilen enfeksiyonlardır. Her iki etken kış ayları gibi aynı sezonda artışı olan enfeksiyona neden olmaktadır. İnfluenza virüslerinin neden olduğu bir ÜSYE'de gereksiz antibiyotik ve uygun olmayan tedavi verilebileceği gibi GAS'ların neden olduğu enfeksiyonun tedavisinde de zamanında verilmeyen doğru tedavi olası komplikasyonların gelişimine neden olabilir. Hal böyle iken bazı durumlarda hastalarda her iki mikroorganizmanın koenfeksiyonu da söz konusu olabilir. Bu iki etkenin koenfeksiyonu özellikle tonsillit, otit ve pnömoni gibi solunum yolu enfeksiyonlarıyla karışmaya çıkabilir (13,14). Bu hastalıkta her iki etkenin klinik bulguları da karışabilir, eksik tedavi verilmesine neden olabilir. Bunun sonucunda kliniğinin düzelmemesi, hastaneye yatış vs. gibi ortaya çıkabilecek komplikasyonların önlenmesi hızlı, doğru tanı ve tedavi ile engellenebilir. Çalışmamızda

olgularımızda saptanan GAS ile influenza virüs tip A ve tip B nedenli ÜSYE'nin klinik ve laboratuvar bulguları ile her iki etkenin koenfeksiyon sıklığı irdelenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma yerel etik kurul tarafından onaylanmış ve retrospektif olarak planlanmıştır.

### Hastalar ve Testler

Çalışmaya üçüncü basamak hastanemiz pediatri kliniğine 2019 Ocak ve 2020 Ocak tarihleri arasında ayaktan başvuran ve akut tonsillofarenjit veya ÜSYE şikayetleri olan ve eşzamanlı olarak strep A hızlı antijen testi ile influenza A ve B hızlı antijen testleri uygulanan 1884 hasta çalışmaya alındı. Hastaların tümünden boğaz sürüntüsü alınarak Strep A antijen testi (STANDARD F Strep A Ag FIA, SD Biosensor) ve influenza virüs A ve B antijen testi (STANDARD F Strep A Ag FIA, SD Biosensor) firmaların önerileri doğrultusunda çalışılmış. Strep A antijen testinin sensitivitesi%93.3, spesifitesi %95.7, influenza virüs A sensitivitesi% 97.0, spesifitesi % 97.6 ve B antijen testinin sensitivitesi ise 94.3% ve spesifitesi 97.6% idi. Test sonuçları ve hasta verileri retrospektif olarak incelendi. Hastalar test sonuçları negatif, GAS, influenza A influenza B ve influenza ile GAS koenfeksiyonu şeklinde Grup 0, Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4 olmak üzere beş gruba ayrıldı. Eş zamanlı olarak çocuklara tam kan sayımı ve C-reaktif protein (CRP) testleri de çalışılmış olup sonuçlar gruplar arasında karşılaştırıldı.

### İstatistiksel analiz

Çalışmadaki tüm istatistiksel analizler SPSS 25.0 yazılımı (IBM SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Tanımlayıcı veriler sayı ve yüzde olarak verildi. Kategorik değişkenler açısından gruplar arasındaki karşılaştırmalar Ki Kare testi ve Fisher's Exact Test ile yapıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Kolmogorov-Smirnov Testi ile doğrulandı. Sürekli değişkenler açısından gruplar

arasındaki farklılıklar Student's t Test ve çoklu gruplar arasındaki ortalama değerlerin karşılaştırmaları varyans analizi ile yapıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirildi ve  $p < 0.05$  değerleri anlamlı kabul edildi. Kan parametreleri açısından gruplar arasında anlamlılık değerlendirmesi için Bonferroni düzeltmesi yapıldı ve  $p < 0.005$  değerleri anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Hastaların 1024'ü (%54.6) erkek, 855'i (%45.4)

kız idi. Hastaların ortalama yaşı  $5.0 \pm 3.1$  yıl (yaş aralığı: 2-16 yıl) idi. Hastaların 1174'ünde (%62.3) GAS enfeksiyonu veya influenza virüsleri saptanmadı. Toplam 226 hastada (%12.0) GAS, 319 hastada (%16.9) influenza A virüsü, 118 hastada (%6.3) influenza B virüsü, 47 hastada (%2.5) ise GAS ve influenza A virüsü koenfeksiyonu saptandı. Pozitif vakaların Ekim-Nisan aylarında yüksek olduğu görüldü. Koenfeksiyon saptanan hastaların hiçbiri mortal seyretmemiştir. Klinikleri ile ilgili daha detaylı bilgi alınamamıştır (Tablo 1). Gruplar arasında cinsiyet açısından istatistiksel farklılık yoktu ( $p=0.6$ ) (Tablo 2).

Tablo 1. Hızlı test sonuçlarının dağılımı

Gruplar	n	%
Negatif	1174	62.3
GAS	226	12
İnflüA	319	16.9
İnflüB	118	6.3
GAS + İnflüA	47	2.5
Toplam	1884	100

GAS: Grup A Streptokok, İnflüA: İnfluenza virüs Tip A, İnflüB: İnfluenza virüs Tip B

Tablo 2. Gruplara göre cinsiyet dağılımı

Gruplar	Cinsiyet			
	Erkek		Kız	
	n	%	n	%
Negatif	630	53.7	544	46.3
GAS	134	59.3	92	40.7
İnflüA	175	54.9	144	45.1
İnflüB	66	55.9	52	44.1
GAS + İnflüA	24	51.1	23	48.9
Toplam	1029	54.6	855	45.4

GAS: Grup A Streptokok, İnflüA: İnfluenza virüs Tip A, İnflüB: İnfluenza virüs Tip B

İnfluenza A grubunda öksürük (%61.8) ve burun akıntısı/tıkanıklığı (%40.8) bulunma düzeyleri diğer gruplardan anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla  $p<0.001$  ve  $p=0.001$ ). İnfluenza A ve B gruplarında ateş bulunma düzeyleri diğer gruplardan anlamlı yüksekti ( $p=0.002$ ). Boğaz ağrısı bulunma düzeyi streptokok grubunda (%18.6) diğer gruplara göre anlamlı yüksek olarak saptandı. Gruplar arasında ateş, boğaz ağrısı, yutkunma güçlüğü, burun akıntısı ve tıkanıklığı, hırıltılı solunum, bulantı, kusma, karın ağrısı, iştahsızlık ve halsizlik yüzdeleri açısından anlamlı fark bulunamadı (her birisi için  $p>0.01$ ) (Tablo 3).

Ortalama lökosit ve nötrofil düzeyleri GAS grubunda diğer tüm gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek; hızlı testlerin negatif sonuçlandığı grup

ise GAS dışındaki gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0.001$ ). Ortalama nötrofil seviyesi, testleri negatif olan grupta GAS dışındaki gruplara göre; GAS grubunda ise influenza A ile GAS+influenza A gruplarına göre anlamlı yüksekti ( $p<0.001$ ). Ortalama monosit, trombosit ve CRP düzeyleri hem negatif grupta hem de GAS grubunda diğer gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p<0.001$ ). Ortalama eozinofil ve bazofil düzeyleri GAS grubunda diğer tüm gruplara göre; negatif grupta ise GAS dışındaki gruplara göre anlamlı yüksekti ( $p<0.001$ ). Diğer kan parametreleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu (Her birisi için  $p>0.005$ ) (Tablo 4).

**Tablo 3.** Gruplara arasında belirtileri bulunma oranlarının karşılaştırılması

Şikayet ve belirtiler	n	Negatif (%)	GAS (%)	İnflUA (%)	İnflUB (%)	GAS + İnflUA (%)	p
Ateş	1458	75.4	73.5	83.4	85.6	85.1	0.002
Boğaz ağrısı	202	9.8	18.6	7.8	12.7	10.6	0.001
Yutkunma güçlüğü	110	5.6	7.5	5.3	5.9	6.4	0.837
Burun akıntısı/tıkanıklığı	597	29.2	32.3	40.8	28.8	36.2	0.003
Öksürük	948	47.1	51.8	61.8	49.2	48.9	<0.001
Hırıltılı solunum	43	2.7	1.8	1.9	0	2.1	0.138
Bulantı	74	3.7	3.5	4.4	5.9	4.3	0.81
Kusma	167	8.4	9.7	10	8.5	8.5	0.902
Karın ağrısı	85	4	6.6	4.1	6.8	4.3	0.327
İştahsızlık	121	6.5	8.8	4.7	5.9	6.4	0.428
Halsizlik	64	3.4	3.1	2.8	4.2	6.4	0.797

GAS: Grup A Streptokok; , İnflUA: İnfluenza virüs Tip A, İnflUB: İnfluenza virüs Tip B

Bonferroni düzeltmesine göre anlamlılık  $p<0.005$  olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4. Gruplara arasında ortalama kan parametre değerlerinin karşılaştırılması

	Grup 0	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	
<b>Değişkenler</b>	<b>Negatif</b>	<b>GAS</b>	<b>İnflüA</b>	<b>İnflüB</b>	<b>GAS + İnflüA</b>	<b>p</b>
Yaş	5±3.2	5.2±2.8	4.9±2.9	5.2±2.9	5±2.5	0.777
Ateş	37±5.9	38.7±31.5	38±4.2	37.7±5	38.3±1	0.651
RBC	4.6±0.5	4.7±0.4	4.7±0.4	4.7±0.4	4.6±0.4	0.033
WBC	11.8±5.4	14±6.3	9.1±4	7.7±3.1	8.3±2.9	<0.001*
Nötrofil	7.5±4.6	9.8±5.8	5.9±3.5	4.5±2.6	5.5±2.4	<0.001*
% Nötrofil	60.1±16.6	66.3±16.4	62.3±16.4	56.7±15.6	65.2±14.8	<0.001*
Lenfosit	3±1.8	2.8±1.7	2.1±1.4	2.3±1.2	1.9±1.2	<0.001†
% Lenfosit	28±15	23.1±14.7	25.3±14.3	31±15	23.8±14.1	<0.001†
Monosit	1.2±0.6	1.2±0.6	1±0.5	0.9±0.4	0.8±0.4	<0.001‡
% Monosit	10.8±3.9	9.3±3.4	11.7±4.5	11.7±3.7	10.2±3.5	<0.001‡
Eozinofil	0.09±0.15	0.13±0.19	0.04±0.03	0.04±0.04	0.07±0.1	<0.001§
% Eozinofil	0.9±1.5	1±1.4	0.4±1.1	0.4±0.5	0.5±0.8	<0.001§
Bazofil	0.04±0.03	0.04±0.03	0.03±0.02	0.02±0.01	0.03±0.02	<0.001§
% Bazofil	0.3±0.2	0.3±0.2	0.3±0.2	0.3±0.2	0.3±0.2	0.015
PLT	293±92.8	301.7±88.9	262±84.6	241.1±67.4	246.8±56	<0.001‡
HCT	34.6±3.2	34.9±3.1	34.8±2.8	35.1±3	34.8±3.1	0.471
HGB	11.9±1.2	12±1.2	12±1	12.1±1.1	12.1±1	0.365
MCH	25.9±2.2	25.8±2.1	25.7±2	25.6±2.2	26.4±1.5	0.227
MCHC	34.4±1.3	34.6±1.2	34.5±1	34.4±1.1	34.8±1.1	0.218
MCV	75.1±5.3	74.6±4.9	74.6±4.7	74.4±5.3	75.9±4	0.207
MPV	9.4±0.8	9.3±0.8	9.4±0.8	9.5±0.7	9.5±0.8	0.132
PCT	0.3±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	<0.001‡
PDW	10±1.5	9.9±1.5	10±1.4	10.2±1.4	10.2±1.5	0.563
RDW-SD	36.7±3.6	36.3±2.7	36.4±2.3	36.3±3.1	37.4±2.6	0.274
RDW-CV	13.7±1.5	13.6±1.2	13.6±1.2	13.8±1.5	13.6±0.9	0.792
CRP	27.7±37.4	31.5±39.7	15.2±18.9	12.1±17.2	11.4±9.5	<0.001‡

HGB:Hemoglobin, HCT:Hematokrit, PLT:Trombosit. RBC: Eritrosit, WBC: Lökosit, GAS: Grup A Streptokok;

İnflüA: İnfluenza virüs Tip A, İnflüB: İnfluenza virüs Tip B

\*Grup 0 ve 1 birbirlerine ve Grup 2,3 ve 4'e göre farklıdır.

† Grup 0, Grup 2,3 ve 4'e göre; Grup 1 Grup 2 ve 4'e göre farklıdır.

‡Grup 0 ve 1, Grup 2,3 ve 4'e göre farklıdır.

§Grup 1 tüm gruplara göre; Grup 0 Grup 1,2 ve 3'e göre farklıdır.

## TARTIŞMA

İnfluenza koenfeksiyonu şeklinde olan bakteriyel enfeksiyonlar özellikle yaşlılar ve küçük çocuklar gibi yüksek riskli gruplar arasında ciddi bir morbidite ve mortalite nedenidir. İnfluenza ile birlikteliği ve patojenik sinerjizmi üzerinde en fazla çalışma yapılan bakteri *S. pneumoniae* dir. GAS'lar ve influenza birlikteliği ÜSYE'de nadir bir durumdur. Az sayıdaki çalışmada kış aylarında artışa geçen influenza virüs enfeksiyonlarının GAS'ların enfeksiyon sıklığını arttırdığı vurgulanmıştır (13,15-17). Literatürde İnfluenza ve GAS'ların koenfeksiyonunun ciddi sonuçları olabileceği üzerinde durulmuştur. Ancak bu konuda yapılan çalışmalarda vaka sayıları düşük düzeyde kalmıştır (18). 2009'da influenza A (H1N1) pandemisinde tanımlanan influenza ve GAS eşzamanlı enfeksiyonu bulunan on olgudan yedisinin kaybedildiği bildirilmiştir (19). Çalışmamızda influenza ve GAS koenfeksiyonunun irdeleyen her iki enfeksiyonun klinik ve laboratuvar bulgularını karşılaştıran çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler sunulmuştur.

İnfluenza ve GAS koenfeksiyonunun ayırıcı tanısının yapılması, gereksiz antibiyotik kullanımından kaçınılması; etkenin GAS olup olmadığının belirlenmesi ise olası komplikasyonların önlenmesi doğru ve hızlı antibiyotik tedavisinin başlanması açısından kritik öneme sahiptir (14). Bu nedenle geliştirilen hızlı testler doğru tedavi yönetimine önemli katkı sağlamaktadır. Bu hızlı antijen testleri dakikalar içinde sonuç verebilmektedir. Ancak ortak antijeni olan bazı mikroorganizmalar nedeniyle yanlış pozitif sonuç da verebilen bu testlerin duyarlılıklarının %50-90 aralığında, özgüllüklerinin ise %85-95 olduğu rapor edilmiştir (3,8,18-20). Özellikle bakteriyel etkenin belirlenmesi açısından hem kültür hem de hızlı test için örnek alımından örneğin işlenmesine ve sonuçlandırılmasına kadar geçen süreç içerisindeki subjektif değerlendirme kısımları testlerin duyarlılık ve özgüllüklerini etkileyebilmektedir. Yine de hızlı testlerden elde edilen veriler kabul edilebilir güvenilirlik düzeyindedirler (18,21,22). Cohen ve ark.

(23) 2013 yılında yaptıkları çalışmada hızlı antijen testi ile yanlış pozitif bulunan örneklerin polimerize zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle de pozitif saptandığını, bu örneklerin kültürlerinde *Staphylococcus aureus*'un grup A streptokokların üremesini inhibe etmiş olabileceğini ve hızlı antijen testi özgüllük oranının %100'e yakın bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle hızlı antijen testleri klinisyene tanı sırasında yol gösterici olmaktadır (19,24).

GAS kaynaklı tonsillofarenjitlerin en sık 5-15 yaş aralığında görüldüğü bildirilmiştir (21,25). Barış ve ark. (26) 5-15 yaş aralığında GAS pozitiflik düzeyini %18.4; Saygılı ve ark. (21) ise %14.4 olarak bildirmişlerdir. Gözüküçük ve ark. (27) 0-18 yaş aralığında GAS saptanma düzeyini %25.0; Altındağ ve ark. (28) ise %24.6 olarak rapor etmişlerdir. Çalışmamız 2-16 yaş aralığını kapsamış olup ve toplam %14.5 hastada GAS saptanmıştır. Çalışmamızdaki bu düzey diğer çalışmalarla benzer bulunmuştur. Ancak çalışmamızda GAS saptanan grubun ortalama yaşı 5.2±2.8 yıl olarak bulunmuş ama diğer gruplarla arasında ortalama yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu veriler çocuk hastalarda GAS'ların mutlaka test edilmesi gerektiğini göstermekte, ancak yaş faktörüyle tonsillofarenjit etkeni arasında bir ilişkinin olmadığını göstermektedir.

ÜSYE tablosuyla gelen çocuk hastada viral etkenler önemli yer tutmaktadır. Bu etkenler içinde influenza virüslerinin ayırt edilmesi kritik önem taşımaktadır. Çünkü influenza virüsü diğer viral etkenlere göre özellikle riskli grup hastalarda yüksek morbidite ve mortalite oranlarına neden olabilmektedir. Ayrıca influenza enfeksiyonu aşı ile önlenilmekte ve özgül olarak tedavi edilebilmektedir. İnfluenza virüsünün hızlı tanısı özellikle bağışıklık durumu kritik olan çocuk hastalarda uygun tedavinin başlanması açısından önem taşımaktadır (3,5-7). Önal ve ark. (29) yaptıkları çalışmada 0-14 yaş grubunda influenza virüs tip A saptanma oranını %34 olarak bildirmişlerdir. Küçük ve ark. (30) ise bu düzeyi %47.3 olarak rapor etmişlerdir. Çalışmamızda influenza virüs tip A saptanma oranı toplam %19.2 olarak bulunmuştur.

ÜSYE’de bakteriyel ve viral etkenlerin yol açtığı klinik tablolar farklılık gösterebilse de bu etkenleri ayırt etmek genellikle mümkün olmamaktadır (3,8). Çalışmamızda GAS saptanan hastaların %73.5’inde ateş saptanırken influenza gruplarında ateş düzeyi %80-85 civarında bulunmuştur. GAS ve influenza virüsü saptanmayan grupta bu düzey %75.4 olarak saptanmış ve influenza gruplarındaki ateş oranları anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p:0.002$ ). Her ne kadar hastaların ateşinin çıkması durumunda bir ateş düşürücü ilaç alıp almadıkları konusunda bilgiye ulaşılammış olsa da bu veriler ateş varlığının etkeni tahmin etmede ayırıcı bir etkisi olmayabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda GAS saptanan hastalardaki boğaz ağrısı bulunma düzeyi %18.6 olarak saptanmıştır ve diğer gruplara göre anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p:0.001$ ). Bu veri boğaz ağrısının üst solunum yolu enfeksiyonlarında etkeni tahmin etmede yardımcı olabileceğini göstermektedir.

Gültekingil ve ark. (26) influenza virüs tip A saptanan hastalarının %71.4’ünde öksürük bulunduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızda da influenza virüs tip A saptanan gruptaki öksürük şikayetinin bulunma yüzdesi (%61.8) diğer tüm gruplara göre anlamlı yüksek olarak saptanmıştır. Bu veriler influenza virüs tip A ile öksürük arasında anlamlı ilişki bulunduğunu ve öksürük şikayeti olan çocuk hastalarda influenza virüs tip A’nın taranması gerektiğini göstermektedir ( $p<0.001$ ). Çalışmamızda ayrıca burun akıntısı ve/veya tıkanıklığı da influenza virüs tip A grubunda diğer gruplara göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu veri de burun akıntısının üst solunum yolu enfeksiyonu olgularında etkenin viral olabileceği yönünde ipucu verebildiğini göstermektedir.

Çalışmamızda hırıltılı solunum, bulantı, kusma, karın ağrısı, iştahsızlık ve halsizlik gibi belirtiler

tüm gruplarda benzer oranlarda bulunmuştur. Bu veri bu belirtilerin üst solunum yolu enfeksiyonunun hastalarda farklı tablolara kendini gösterebileceğini ancak etkenin ayırımı konusunda yol gösterici olmayabileceğini göstermektedir.

Bakteriyel enfeksiyonlarda serumda lökosit, nötrofil ve CRP düzeylerinin viral enfeksiyonlara göre daha çok yükseldiği bilinmektedir (3,8,32,33). Çalışmamızda da ortalama lökosit, nötrofil ve CRP düzeyleri GAS tespit edilen hastalarda diğer gruplara göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu veri tam kan sayımının etkenin bakteriyel mi viral mi olduğu konusunda yol gösterici olduğu bilgisini desteklemektedir.

GAS’ların özellikle çocukluk döneminde %5-15 oranlarında nazofarenkse yerleştiği ve taşıyıcılığa neden oldukları belirtilmiştir. Taşıyıcılık durumunda enfeksiyon bulgularının görülmediği ve serolojik testlerin tanıya yardımcı olmadığı bildirilmiştir. Nazofarenksteki bu streptokokların tonsillofarenjite neden olabileceği rapor edilmiştir (34).

Çalışmamızda bazı kısıtlamalar bulunmaktaydı. Çalışmamızdaki tüm olgularda ÜSYE belirti ve bulguları olduğundan taşıyıcılık açısından bir değerlendirme yapılamamıştır. Koenfeksiyon şeklinde seyreden olgularda prognoza ilişkin bilgiye ulaşılammıştır.

Sonuç olarak ÜSYE geçiren çocuk hastalarda etkenin viral mi bakteriyel mi olduğu hızlı ve doğru olarak saptanmalıdır. Bunun için hem GAS’ların hem de influenza virüslerinin antijen testleriyle çalışılması ve klinik ve laboratuvar bulgularının birlikte değerlendirilmesi gerekliliği klinisyenler ve araştırmacılar için yol gösterici olabilecek veriler sağladığı düşüncesine ulaşılmıştır. Bunun yanında doğru, hızlı ve güvenilir tanı için uygulanan hızlı antijen testlerinin hasta tedavisini yönlendirmesinde önemli olduğu kanısındayız.

## KAYNAKLAR

1. Bisno AL. Primary care: Acute pharyngitis. *N Engl J Med*, 2001; 344: 205-11.
2. Brennan-Krohn T, Ozonoff A, Sandora TJ. Adherence to guidelines for testing and treatment of children with pharyngitis: a retrospective study. *BMC Pediatr*, 2018; 18: 43-50.
3. Tünger Ö. Akut tonsillofarenjitler. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2015; 2:2-7.
4. Peteranderl C, Herold S, Schmoldt C. Human Influenza Virus Infections. *Semin Respir Crit Care Med*, 2016; 37: 487-500.
5. Labella AM, Merel SE. Influenza. *Med Clin North Am*, 2013; 97: 621-45.
6. Kondrich J, Rosenthal M. Influenza in children. *Curr Opin Pediatr*, 2017; 29: 297-302.
7. Kumar V. Influenza in Children. *Indian J Pediatr*, 2017; 84: 139-43.
8. Öngen B. A Grubu Streptokok İnfeksiyonlarında Tanı. *ANKEM Derg*, 2004; 18: 45-50.
9. Ji MJ, Noh JS, Cho BK, Cho YS, Kim SJ, Yoon BS. Evaluation of SD BIOLINE Chagas Ab rapid kit. *Korean J Lab Med*, 2009; 29: 48-52.
10. Maltezou HC, Tsagrid V, Antoniadou A, Galani L, Douros C, Katsarolis I, et al. Evaluation of a rapid antigen detection test in the diagnosis of streptococcal pharyngitis in children and its impact on antibiotic prescription. *J Antimicrob Chemother*, 2008; 62: 1407-12.
11. Cohen JF, Bertille N, Cohen R, Chalumeau M. Rapid antigen detection test for group A streptococcus in children with pharyngitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2016; 7: CD010502.
12. Cohen J F, Chalumeau M, Levy C, Bidet P, Thollot F, Wollner A, et al. Spectrum and inoculum size effect of a rapid antigen detection test for group A streptococcus in children with pharyngitis. *PLoS One*, 2012; 7: e39085.
13. Gurol Y, Romano E, Coskun FT, Biçer S, Çelik G. Group A streptococcal infection cases during influenza season 2016 Coinfections in influenza season. *Egyptian Pediatric Association Gazette*, 2017; 65(2); 31-32.
14. Joseph C, Togawa Y, Shindo N. Bacterial and viral infections associated with influenza Influenza Other Respir Viruses, 2013; (2): 105-113.
15. Ruiz-Aragón J, Rodríguez López R, Molina Linde JM. Evaluation of rapid methods for detecting *Streptococcus pyogenes*. Systematic review and meta-analysis. *An Pediatr (Barc)*, 2010; 72: 391-402.
16. Cabbarpur C, Özlüoğlu LN, Çakmak Ö, Büyüklü F, Haşimoğlu R, Ergin F, et al. Akut Tonsillofarenjitte Rapid Strep A Testi Kullanımı. *Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi*, 2004; 3: 10-2.
17. Lamagni TL, Darenberg J, Luca-Harari B, Siljander T, Efstratiou A, Henriques-Normark B, et al. Epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. *J Clin Microbiol*, 2008; 46(7): 2359-67.
18. Scaber J, Saeed S, Ihekweazu C, A Efstratio, McCarth N, O'Moore E. Group A streptococcal infections during the seasonal influenza outbreak 2010/11 in South East England. *Euro Surveill*, 2011;16(5), 19780.
19. Jean C, Louie JK, Glaser CA, Harriman K, Hacker JK, Aranki F, et al. Invasive group A streptococcal infection concurrent with 2009 H1N1 influenza. *Clin Infect Dis*, 2010; 50(10): e59-62.
20. Ekşi Alp E, Dalgıç N, Kına N, Bayraktar B, Öncül A, Sepetci EA. Grup A streptokok tonsillofarenjitinde strep A hızlı antijen testinin önemi: Tek merkez deneyimi. *J Pediatr Inf*, 2018; 12: 93-8.

21. Saygılı N, Bulut E, Deniz R, Dalgıç N, Aktaş E, Boğaz Sürüntü Örneklerinde A Grubu Beta-Hemolitik Streptokokların Belirlenmesinde Bionexia Strep A Plus Hızlı Antijen Testinin Kullanımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2017; 47: 138-45.
22. Van Brusselen D, Vlieghe E, Schelstraete P, De Meulder F, Vandeputte C, Garmyn K, et al. Streptococcal pharyngitis in children: to treat or not to treat? *Eur J Pediatr*, 2014; 173: 1275-83.
23. Cohen JF, Cohen R, Bidet P, Levy C, Deberdt P, d'Humières C, et al. Rapid-antigen detection tests for group a streptococcal pharyngitis: revisiting false-positive results using polymerase chain reaction testing. *J Pediatr* 2013; 162: 1282-4.
24. Bulut ME, Aktaş E, Malkoçoğlu G, Yavuz Özer V, Ünal B, Bayraktar B. Strep A Hızlı Antijen Testiyle Grup A Streptokokların Belirlenmesinde İkili Sürüntü Çubuğu Kullanımı Bir Gereklilik mi? *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg* 2019; 49: 30-4.
25. Çoban B, Kaplan H, Topal B, Ülkü N. The sensitivity and the specificity of rapid antigen test in Group A streptococcal tonsillopharyngitis. *J Pediatr Inf* , 2013; 7: 143-6.
26. Barış A, Anlıaçık N, Bulut ME, Deniz R, Yücel E, Aktaş E. A Grubu Beta-hemolitik streptokok farenjitisi tanısında Mascia Brunelli hızlı antijen testinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 2017; 51: 73-8.
27. Gözüküçük R, Göçmen İ, Nas Y, Yılmaz F, Ünüvar E. Streptokoksik tonsillofarenjit tanısında strep-A hızlı testinin etkinliği. *Çocuk Dergisi*, 2011; 11: 157-9.
28. Altundağ Altun H, Meral T, Türk Arıbaş E. The specificity and sensitivity results of the rapid antigen test used in the diagnosis of group a beta hemolytic Streptococcal tonsillopharyngitis. *Acta Medica Mediterr*, 2015; 31: 287-90.
29. Önal A, Aslan S, Bozkaya E, Badur S. Türkiye'de 2003-2004 ve 2004-2005 yıllarında grip sürveyansı ve izole edilen influenza virus suşlarının tiplendirimi. *Klinik Dergisi*, 2006; 19: 3-9.
30. Küçük Ö, Biçer S, Giray T, Çöl D, Çiler Erdağ G, Uğraş M, et al. Evaluation of the Patients with Influenza Viruses. *J Pediatr Inf*, 2013; 7: 87-91.
31. Gültekingil A. 2017-2018 Mevsimsel İnfluenza Salgını Klinik Özellikleri: Tek Merkez Deneyimi. *J Pediatr Emerg Intensive Care Med* 2018; 5: 119-23.
32. Cohen JF, Cohen R, Levy C, Thollot F, Benani M, Bidet P, et al. Selective testing strategies for diagnosing group A streptococcal infection in children with pharyngitis: a systematic review and prospective multicentre external validation study. *CMAJ*, 2015; 187: 23-32.
33. Gonsu HK, Bomki CM, Djomou F, Toukam M, Ndze VN, Lyonga EE, et al. A comparative study of the diagnostic methods for Group A Streptococcal Sore Throat in Two Reference Hospitals In Yaounde, Cameroon. *Pan Afr Med J*, 2015; 20: 139.
34. Gerber AM, Baltimore RS, Eaton BC, Gewitz M, Rowley AH, Shulman ST, et al. Prevention of rheumatic fever and diagnosis and treatment of acute streptococcal pharyngitis: A scientific statement from the american heart association rheumatic fever, endocarditis, and kawasaki disease committee of the council on cardiovascular disease in the young, the interdisciplinary council on functional genomics and translational biology, and the interdisciplinary council on quality of care and outcomes research: Endorsed by the american academy of pediatrics. *Circ*, 2009; 119: 1541-51.



# Bir devlet hastanesinde 2013-2018 döneminde *Acinetobacter* enfeksiyonlarında antibiyotik duyarlılığı ve çoğul antibiyotik direnci

## Antibiotic sensitivity and multiple antibiotic resistance of *Acinetobacter* infections in a state hospital in the period 2013-2018

Ahmet ÇALIŞKAN<sup>1</sup>, Özlem KIRIŞCI<sup>2</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada *Acinetobacter baumannii* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılık değişiminin araştırılması ve çoğul antibiyotik direnç oranının belirlenerek antibiyotik kullanım politikasının geliştirilmesine yardımcı olunması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmaya; Necip Fazıl Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına, Ocak 2013 - Aralık 2018 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türleri dahil edilmiştir. İzolatların tanımlanmasında ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde Vitek 2 Compact (bioMérieux-SA, Fransa) otomatize sistemi kullanılmıştır.

**Bulgular:** En fazla *Acinetobacter* izolatu 73 (%35) trakeal aspirat örneğinden ve en çok Anestezi ve Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesinden gönderilen 160 (%68) örnekten izole edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık yüzde (%) oranlarının dağılımı yıllık olarak, 2013-2015 ve 2016-2018 olmak üzere, üçer yıllık ortalamalar şeklinde ve 2013-2018 toplam ortalaması şeklinde verildi. Çalışma döneminde en yüksek antibiyotik duyarlılığı %97 ile kolistine, en düşük duyarlılık ise %5 oranı ile seftriaksona karşı tespit edildi. *A. baumannii*'nin, antibiyotik duyarlılık oranlarına kabaca bakıldığında;

### ABSTRACT

**Objective:** In this study, it was aimed to investigate the change of antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii* strains over the years and to help develop antibiotic use policy by determining the multiple antibiotic resistance rate.

**Methods:** *Acinetobacter* species isolated from various clinical samples sent to Necip FazılCity Hospital Microbiology Laboratory between January 2013 and December 2018 were included. Vitek 2 Compact (bioMérieux-SE, France) automated systems were used for the identification and antibiotic susceptibility of the isolates.

**Results:** *Acinetobacter* isolates were isolated at the most from tracheal aspirate samples (n=73; 35%) and samples sent from Anesthesia and Reanimation intensive care unit(n=160; 68 %). The distribution of antibiotic sensitivity percentages (%) was given as yearly, three-year averages for 2013-2015, 2016-2018, and the total average for 2013-2018. In the study period, the highest sensitivity was determined to colistin at 97 % and the lowest to ceftriaxone at 5 %. When the antibiotic sensitivity rates of *A. baumannii* are evaluated roughly; In the period of 2016-2018, compared to 2013-2015, there was a

<sup>1</sup>Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Denizli

<sup>2</sup>Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Kahramanmaraş



İletişim / Corresponding Author : Özlem KIRIŞCI

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üni. Tıp Fak., Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Kahramanmaraş - Türkiye

E-posta / E-mail : dr\_ozlemgimtisoglu@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 30.07.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 04.12.2020

2016-2018 döneminde, 2013-2015 dönemine göre amikasin, ampisilin-sulbaktam, sefepim, seftriakson, kolistin ve tigesiklin duyarlılığında azalma eğilimi görülürken, diğer antibiyotiklere karşı duyarlılıkta artış görülmektedir. İzole edilen toplam 237 *A. baumannii*'de çoğul antibiyotik direncine bakıldı. MDR direnci %92, XDR direnci %84, PDR direnci %3 bulundu.

**Sonuç:** *A. baumannii*'de yıllar içinde bazı antibiyotiklere karşı direncin arttığı, bazı antibiyotiklere karşı da direncin azaldığı görülmektedir. XDR direnç oranımızın çok yüksek olduğu görülmektedir. PDR direnç oranımızın ise Amerika'dan yüksek olduğu, buna karşın birçok Avrupa ülkesinden düşük olduğu görülmektedir. Türkiye ortalamasından ise çok düşük olduğu gözle çarpılmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Acinetobacter* enfeksiyonları, bakteri duyarlılık testi, çoklu antibakteriyel ilaç direnci

decrease in sensitivity to amikacin, ampicillin-sulbactam, cefepime, ceftriaxone, colistin and tigecycline, while sensitivity to other antibiotics was observed. Multiple antibiotic resistance was examined in a total of 237 *A. baumannii* isolated. Multidrug resistant (MDR) resistance was 92 %, Extensively Drug Resistant (XDR) resistance was 84 % and Pan Drug Resistant (PDR) resistance was 3 %.

**Conclusion:** It is observed that resistance against some antibiotics has increased in *A. baumannii* over the years, and resistance to some antibiotics has decreased. It seems that our XDR resistance rate is very high. Our PDR resistance rate is higher than that of America, but lower than many European countries. In the other hand our result is lower than the average of Turkey.

**Key Words:** *Acinetobacter* infections, bacterial sensitivity test, multiple antibacterial drug resistance

## GİRİŞ

*Acinetobacter baumannii* kompleksi, idrar yolu enfeksiyonu, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir. Pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonlarında ölüm oranı yüksek olan önemli bir patojendir (1).

Hastanede yatan hastaların kolonizasyon ve enfeksiyonunda *A. baumannii* türlerinin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Travma, mekanik ventilasyon ve cerrahi işlemler bu mikroorganizma için nozokomiyal enfeksiyonlarla ilgili önemli risk faktörleridir (2,3). Fırsatçı patojen olarak çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarının sayısı küresel olarak son yıllarda artmıştır. Nozokomiyal gram negatif patojenler içerisinde kontrol ve tedavisi en güç olanlardan biri haline gelmiştir (4,5). *A. baumannii* salgınlarının pek çoğu hasta yatakları, klimalar ve mekanik ventilasyon ekipmanları gibi çevresel kaynaklıdır (6). *Acinetobacter* spp.kuru cansız yüzeylerde 3 gün-5 ay arasında canlı kalabilir

(7,8,9).

Bu çalışmada *A. baumannii* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılık değişimini ve çoğul antibiyotik direnç oranını belirleyerek antibiyotik kullanım politikasının geliştirilmesine yardımcı olunması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Hastanemiz servislerinden ve yoğun bakım ünitelerinden (YBÜ), Ocak 2013-Aralık 2018 tarihleri arasında izole edilen, 237 *A. baumannii* retrospektif olarak çalışmaya alındı. Aynı hastada birden fazla üreyen *A. baumannii* izolatlarından sadece bir tanesi çalışmaya dahil edildi. Kan kültürleri BacT/ALERT (bioMérieux, Fransa) kan kültürü otomatize sisteminde 7 gün inkube edildi. Bu süre zarfında pozitif sinyal veren şişelerden % 5 koyun kanlı, eosin metilen mavisi ve çikolata besiyerlerine ekimleri yapıldı.

İdrar örnekleri % 5 koyun kanlı ve eosin metilen mavisi besiyerlerine, diğer örnekler ise % 5 koyun kanlı, eosin metilen mavisi ve çikolata besiyerlerine ekildi ve 370C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra üreyen mikroorganizmalar koloni morfolojisi, boyanma özellikleri, oksidaz ve katalaz testleri yönünden değerlendirilmiştir. İzolatların kesin tür tanımlaması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için 0,5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlanarak Vitek 2 Compact (bioMerieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılmıştır. İzole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılık testleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) standartlarına uygun olarak çalışılmıştır(10).

Çalışmamızda, *A. baumannii* duyarlılığında kullanılan antibiyotik grupları; aminoglikozid (gentamisin, amikasin), antipsödomonal karbapenemler (imipenem, meropenem), antipsödomonal florokinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin), antipsödomonal penisilinler + betalaktam inhibitörler (piperasilin-tazobaktam), sefalosporin grubu antibiyotikler (seftriakson,

seftazidim, sefepim), sulfonamidler (trimetoprim/sulfametoksazol), penisilinler + beta laktam inhibitörleri (ampisilin-sülbaktam), kolistin ve tigesiklidir. *A. baumannii*'de çoğul antibiyotik direncini tanımlamak için "multi-drug resistance (MDR)", "extensive-drug resistance (XDR)" ve "pan-drug resistance (PDR)" gibi terimler kullanılmaktadır. Çalışmamızda, tüm gruplardan bir ile üç antibiyotik grubuna dirençli izolatlar MDR, bir ya da iki antibiyotik grubu dışında tüm antibiyotiklere dirençli izolatlar XDR, mevcut tüm antibiyotiklere dirençli izolat PDR şeklinde tanımlanmıştır (11,12).

## BULGULAR

Çalışmamızda; hastanemizin servis ve yoğun bakımlardan, Ocak 2013-Aralık 2018 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen toplam 237 *A. baumannii* elde edildi. *A. baumannii*'nin izole edildiği klinik örnekler ve izole edilen örneklerin servislere dağılımı Tablo 1'de sunulmuştur. Laboratuvarımıza gönderilen kültür

Tablo 1. *Acinetobacter baumannii*'nin izole edildiği klinik örnekler ve izole edilen örneklerin servislere dağılımı.

SERVİSLER/ ÖRNEKLER	Trekeal Kültürü	Yara Kültürü	Kan Kültürü	Balgam Kültürü	İdrar Kültürü	Katater Kültürü	Toplam örnek n(%)
Anestezi ve Reanimasyon YB	73	10	64	3	9	1	160 (68)
Dahiliye YB	0	3	1	0	2	0	6 (2)
İntaniye Servisi	0	4	0	0	1	0	5 (2)
Kardiyovasküler Cerrahi YB	1	1	4	0	1	1	8 (3)
Nöroloji YB	4	1	2	1	3	0	11 (5)
Plastik Cerrahi Servisi	3	2	0	1	1	0	7 (3)
Yanık Tedavi Servisi	0	4	0	0	1	0	5 (2)
Palyatif Bakım Servisi	2	5	2	0	11	0	20 (9)
Diğer Servisler	1	3	2	1	8	0	15 (6)
Total (%)	84 (35)	33 (14)	75 (32)	6 (2)	37 (16)	2 (1)	237 (100)

örnekleri arasında, en fazla *A. baumannii* trakeal aspirat örneklerinden (%35) izole edilmiştir. Yoğun bakımlar arasında, *A. baumannii*, en fazla Anestezi ve Reanimasyon yoğun bakımından gönderilen örneklerden (%68) izole edilmiştir. İzole edilen toplam 237 *A. baumannii*'nin antibiyotik duyarlılık yüzde (%) oranlarının dağılımı yıllık olarak, 2013-2015, 2016-2018 üçer yıllık ortalamalar şeklinde ve 2013-2018 toplam ortalama şeklinde tablo 2'de sunuldu. Çalışma döneminde en yüksek duyarlılık % 97 ile kolistine,

en düşük duyarlılık ise % 5 oranı ile seftriaksona karşı tespit edilmiştir. Duyarlılık seyirlerine kabaca bakıldığında; 2016-2018 yıllarında 2013-2015 yıllarına göre amikasin, ampisilin-sulbaktam, sefepim, seftriakson, sefoperazon-sulbaktam, imipenem ve kolistin azalma eğilimi izlenirken diğer antibiyotiklere karşı duyarlılıkta artış izlenmektedir.

İzole edilen toplam 237 *A. baumannii*' de çoğul antibiyotik direncine bakıldı. MDR direnci % 92, XDR direnci % 84, PDR direnci % 3 bulundu.

**Tablo 2.** *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik duyarlılık yüzde (%) oranları

	2013 (n) %	2014 (n) %	2015 (n) %	2016 (n) %	2017 (n) %	2018 (n) %	2013-2015 (n) %	2016-2018 (n) %	2013-2018 (n) %
Amikasin	(11) 27	(10) 80	(18) 22	(19) 37	(11) 9	(16) 0	(39)38	(46)17	(85) 27
Ampisilin- sulbaktam	(76) 20	(18) 44	(18) 6	(19) 16	(31) 0	(23) 0	(112) 21	(73)4	(185) 15
Sefepim	(77) 9	(21) 19	(32) 16	(36) 14	(31) 3	(28) 0	(130)12	(95)6	(225) 10
Seftriakson	(77) 7	(18) 6	(34) 9	(32) 3	(32) 0	(28) 0	(129)7	(92)2	(221) 5
Sefoperazon/ sulbaktam	(65) 30	(13) 69	(22) 18	(20) 30	(27) 11	(27) 11	(100)33	(74)16	(174) 26
Siprofloksasin	(58) 7	(22) 14	(31) 10	(36) 20	(32) 14	(26) 4	(111)9	(94)12	(205) 10
Levofloksasin	(35) 11	(3) 0	(7) 14	(2) 11	(7)29	(23) 29	(45)11	(32)25	(77) 13
Gentamisin	(55) 4	(19) 32	(32) 13	(36) 20	(32) 9	(18) 6	(106)11	(86)13	(192) 12
İmipenem	(78) 6	(22) 14	(25) 24	(24) 17	(28) 39	(28) 7	(135)11	(70)9	(205) 22
Meropenem	(5) 0	(10) 10	(19) 5	(19) 16	(11) 9	(28) 7	(34) 6	(58)10	(92) 10
Trimetoprim sulfametoksazol	(65) 5	(21) 14	(31) 13	(36) 14	(28) 16	(28) 14	(113)9	(96)15	(209) 12
Piperasilin- tazobaktam	(69) 6	(17) 18	(32) 13	(37) 22	(32) 9	(28) 7	(118)9	(97)13	(215) 11
Kolistin	(83) 99	(22) 100	(31) 97	(36) 97	(28) 94	(28) 93	(132)99	(96)95	(228) 97
Tigesiklin	(68) 76	(18) 100	(31) 94	(36) 94	(34) 76	(27) 96	(117)85	(97)89	(214) 87

n= Test edilen izolat sayısı

## TARTIŞMA

*Acinetobacter* suşları geçmişte nadir veya orta şiddette fırsatçı enfeksiyonlarla ilişkili iken, son 20 yılda enfeksiyonların şiddeti, görülme oranları artmış ve yoğun bakım ünitelerindeki hastalar *Acinetobacter* türlerinin ana hedefi haline gelmiştir (13). Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Bulaşıcı Hastalıklar Dairesi Başkanlığının hazırladığı “Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı Etken Dağılımı Ve Antibiyotik Direnç Raporu 2017” raporunda; Türkiye’de sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonların türüne göre etken dağılımı, tüm enfeksiyonlar içinde, *A. baumannii* enfeksiyonları % 21 ile yüksek bir orana sahiptir. Sebep olduğu enfeksiyonlar, pnömoni (% 35), ventilatör ilişkili pnömoni (% 44), kan dolaşımı enfeksiyonu (% 11) ile önemi artan bir bakteri haline gelmiştir. Aynı raporda *A. baumannii*’nin farklı antibiyotiklere direnç oranları değerlendirilmiştir; amikasin % 74, gentamisin % 75, imipenem % 94, kolistin % 3, levofloksasin % 93, meropenem % 94, netilmisin % 83, siprofloksasin % 91, tigesiklin % 31 olarak belirtilmiştir (14). Çalışmamızdaki antibiyotik duyarlılıkları bu rapor ile karşılaştırıldığında, gentamisinde direnç oranlarımızın daha yüksek olduğu görülürken, amikasin, levofloksasin, imipenem, meropenem ve tigesiklinde direnç oranlarımızın daha düşük olduğu görülmektedir. Kolistin ve siprofloksasinde ise duyarlılık oranlarımızın benzer olduğu görülmektedir.

İranda, Babaei ve arkadaşlarının çalışmalarında, 2012-2013, 2014-2016 yıllarında kan kültürü enfeksiyonlarında *A. baumannii*’nin antimikrobiyal duyarlılıklarının yüzde oranlarını sırasıyla amikasin 33-32, gentamisin 29-20, tobramisin 28-24, levofloksasin veri yok-14, ampisilin-sulbaktam veri yok-17, seftazidim 23-9, imipenem 19-16, meropenem 14-15 saptamışlardır (15). Dönemler karşılaştırıldığında meropenem dışındaki antibiyotiklerde duyarlılık oranlarının azaldığı görülüyor. Bizim çalışmamızda ise amikasin, ampisilin-sulbaktam, sefepim, seftriakson, sefoperazon-sulbaktam, imipenem ve kolistin duyarlılığında azalma eğilimi izlenirken, gentamisin, siprofloksasin, levofloksasin, piperasilin-tazobaktam, meropenem, trimetoprim - sulfametoksazol ve tigesiklinde duyarlılıkta artış izlenmektedir.

SENTRY (Antimicrobial Surveillance Program 1997-2016) raporunda; 13,762 *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* Complex izolatlarının yaptığı enfeksiyon tipi incelenmiş, yatan hastalarda, pnömoni (% 43), kan kültürü (% 37), yara kültürü (% 15) intraabdominal (% 0.6), üriner sistem (% 2) diğerleri (% 0.7) olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada antimikrobiyal ajanlara karşı, coğrafi bölgelere göre 4 yıllık aralıklarla duyarlılıkları incelenmiştir. 2005-2008, 2009-2012, 2013-2016 Avrupa ortalamalarına bakıldığında sırasıyla duyarlılıklar yüzde oranları olarak; amikasin 32-32-22, gentamisin 27-27-24, tobramisin 50-46-42, levofloksasin 20-15-13, ampisilin-sulbaktam 31-25-19, seftazidim 23-17- 15, imipenem 50-42-23, meropenem 47-28-22, minosiklin 82-71-64, kolistin 99-97-89 görülmektedir (16).

Aynı çalışmada XDR oranları; Asya-Pasifik % 56, Avrupa %66, Latin Amerika % 61, Kuzey Amerika % 39 ve totalde % 56 bulunmuştur. PDR oranları toplamda % 2,6 olup, Amerika Birleşik Devleti % 2,5, Türkiye % 6, Yunanistan % 19, İtalya % 9, Brezilya % 1,4 ve Güney Kore % 4 tespit edilmiştir. En yüksek prevalans gözlenen ülkeler sırasıyla: Yunanistan (% 19), İtalya (% 9), Slovenya (% 7), Türkiye (% 6), İsrail (% 4) ve Güney Kore (% 4)’dir (16).

Bizim çalışmamızda da *A. baumannii*’nin yaptığı enfeksiyon tipleri SENTRY programında yapılan çalışmayla karşılaştırıldığında trakeal aspirat % 35, kan kültürü % 32, yara kültürü % 14 oranları ile benzer iken, üriner sistem enfeksiyonları % 16 ile yüksek bulunmuştur. Üriner sistem enfeksiyonları en fazla Palyatif Bakım Servisinde uzun süre yatan hastalarda izole edildi. Üriner sistemdeki enfeksiyon oranımızın yüksek olmasını bundan kaynaklandığını düşünüyoruz. Antibiyotik duyarlılık yüzdelerimiz ilgili dönemlerle karşılaştırıldığında sadece kolistin duyarlılık yüzdelerimiz Avrupa’dan daha yüksek bir orana sahip iken çalışılan diğer antibiyotiklere karşı duyarlılık oranlarımız düşük bulunmuştur. Çoğul antibiyotik direnci incelendiğinde ise XDR direnci % 84 ile Avrupa ve diğer kıtalara göre çok yüksek bir orana sahip olduğumuz görülmektedir. XDR direncimizin yüksekliğini, yoğun bakımlarda kolinize olan dirençli *A. baumannii* ile hastaların enfekte olmasına bağlıyoruz. Bunun için daha ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz. PDR direncimiz ise % 3 (7/237) Amerika’dan yüksek olup, birçok Avrupa ülkesinden

düşük olduğu görülmektedir. Türkiye ortalamasından çok düşük olduğu göze çarpmaktadır.

Şahin ve arkadaşlarının aynı ilimizde bulunan üniversite hastanesinde, 2012-2017 yılları arasında *A. baumannii* izolatlarında antimikrobiyal duyarlılıklarını kolistinde % 97, amikasinde % 11, imipenemde %3, tigesiklinde %51, levofloksasinde %2,5 bulmuşlardır (17). Kolistin duyarlılık oranlarımız benzer olup, amikasin, levofloksasin, imipenem ve tigesiklin oranlarımız daha yüksektir.

Sonuç olarak: *A. baumannii*' de yıllar içinde bazı antibiyotiklere karşı direnç arttığı, bazı antibiyotiklere

karşı da direncin azaldığı görülmektedir. XDR direnç oranımızın çok yüksek olduğu görülmektedir. PDR direnç oranımızın ise Amerika'dan yüksek olduğu, buna karşın birçok Avrupa ülkesinden düşük oranda olduğu görülmektedir. Türkiye ortalamasından ise çok düşük olduğu göze çarpmaktadır. Ülkemizde ve dünyada *A. baumannii*' de kullanabileceğimiz antibiyotiklerin sayısı sınırlıdır. Her hastanenin antibiyotik duyarlılık oranlarını belirleyip, duyarlılık oranlarını dikkate alarak antibiyotik kullanım politikaları oluşturmaları gerektiğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. Peleg Anton Y, Harald Seifert, David L. Paterson. Acinetobacter baumannii: emergence of a successful pathogen. Clin Microbiol Rev, 2008;21(3):538-82.
2. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. Acinetobacter baumannii.asnosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin Microbiol Rev, 1996;9(2):148-65.
3. Parvez FM, Jarvis WR. Nosocomial infections in the nursery. Semin Pediatr Infect Dis, 1999; 10:119-29.
4. Jain R, Danziger LH. Multidrug-resistant Acinetobacter infections: an emerging challenge to clinicians. Ann Pharmacother, 2004;38(9):1449-59.
5. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents, 2005;25(1):11-25.
6. Villegas, Maria Virginia, and Alan I. Hartstein. Acinetobacter Outbreaks, 1977-2000. Infection Cont & Hosp Epidemiol, 2003;24(4):284-95.
7. Beck-Sague CM, Jarvis WR, Brook JH, Culver D. H, Potts A, Gay E et al. Epidemic bacteremia due to Acinetobacter baumannii in five intensive care unit. Am J Epidemiol, 1990;132(4):723-33.
8. Lortholary O, Fagon JY, Hoi AB, Slama M A, Pierre J, Giral Pet al. Nosocomial acquisition of multiresistant Acinetobacter baumannii: Risk factors and prognosis. Clin Infect Dis, 1995;20(4):790-6.
9. Siegman-Igra Y, Bar-Yosef S, Gorea A, Avram J. Nosocomial Acinetobacter meningitis secondary to invasive procedures: report of 25 cases and review. Clin Infect Dis, 1993;17(5):843-9.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S3 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 23rd Informational Supplement, 9th. CLSI, Wayne, PA (2013).
11. Tünay H, Demirdal T, Demirtürk N. Acinetobacter enfeksiyonlarında dirençte ilgili değişen tanımlamalar ve dirençte güncel durum. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2012;42(4):123-6.
12. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli, Y, Falagas ME, Giske CG et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect, 2012;18(3):268-81.
13. Gootz TD, Marra A. Acinetobacter baumannii: an emerging multidrug-resistant threat. Expert Rev Anti Infect Ther, 2008;6(3):309-25.
14. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/duyurular/997-ulusal-saglik-hizmeti-iliskili-enfeksiyonlar-surveyans-agı-etken-dagilimi-ve-antibiyotik-direnç-raporu-2017.html> (erişim tarihi 11.05.2019).
15. Babaei A.H, Pouladfar G, Pourabbas B, Jafarpour Z, Ektesabi S, Abbasi P. Seven-Year Trend of Antimicrobial Resistance of Acinetobacter and Pseudomonas spp. Causing Bloodstream Infections: A Retrospective Study from Shiraz, Southern Iran. Jundish J Microbiol, 2019;12(4): 1-8.
16. Gales AC, Seifert H, Gur D, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. (2019, March). Antimicrobial Susceptibility of Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii Complex and Stenotrophomonas maltophilia Clinical Isolates: Results From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). In Open forum infectious diseases (Vol. 6, No. Supplement\_1, pp. S34-S46). US: Oxford University Press.
17. Şahin AR, Doğruer D, Nazik S, Aktemur A, Öksüz H, Aral M ve ark. Hastane Kökenli Patojenlerde Artan Antimikrobiyal Direnç Sorunu: Acinetobacter baumannii. Online Türk Sağlık Bil Derg, 2019; 4(2): 156-169.

## Early switch therapy from ceftriaxone to ampicillin in an immunocompromised patient with *Listeria monocytogenes* septicemia and meningitis

İmmün sistemi baskılanmış hastada *Listeria monocytogenes*'e bağlı sepsis ve menenjitin tedavisinde seftriaksondan ampisiline erken geçiş

Gülşen HAZIROLAN<sup>1</sup>, Gülçin DİZMAN<sup>2</sup>

### ÖZET

*Listeria monocytogenes* is an important pathogen that may cause infection in the elderly and in immunocompromised patients with predisposing conditions. It can be an important cause of life-threatening bacteremia and meningoencephalitis in immunocompromised individuals. In this report, it was described a case of sepsis and meningitis caused by *L. monocytogenes* in a 39-year-old female with adenoid cystic carcinoma of the larynx. *L. monocytogenes* identification was performed at the species level using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics, Germany). The patient was treated with an early switch therapy from ceftriaxone to ampicillin. This report indicates that early detection and treatment of *Listeria* sepsis and meningitis are important to obtain a better prognosis.

**Anahtar Kelimeler:** *Listeria monocytogenes*, meningitis, septicemia, MALDI TOF MS

### ABSTRACT

*Listeria monocytogenes*, yaşlılarda ve predispozan koşulları olan bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyona neden olabilecek önemli bir patojendir. Bu bakteri, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde hayatı tehdit eden bakteriyemi ve meningoensefalitin önemli bir nedeni olabilir. Bu raporda, larenks adenoid kistik karsinomu olan 39 yaşındaki bir kadın hastada *L. monocytogenes*'in etken olduğu sepsis ve menenjit olgusu tanımlandı. *L. monocytogenes*'in tür düzeyinde tanımlanması matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Bruker, Almanya) ile yapıldı. Hasta tedavide seftriaksondan ampisiline erken geçiş ile tedavi edildi. Bu rapor, *Listeria* sepsis ve menenjitinin erken saptanmasının ve tedavisinin, daha iyi bir prognoz elde edilmesindeki önemini işaret etmektedir.

**Key Words:** *Listeria monocytogenes*, menenjit, sepsis, MALDI TOF MS

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

<sup>2</sup>Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Gülşen HAZIROLAN

Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye 06100 Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : drgulsencetin@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 23.12.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 02.07.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.04127

Hazirolan G, Dizman G. Early switch therapy from ceftriaxone to ampicillin in an immunocompromised patient with *Listeria monocytogenes* septicemia and meningitis. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 493-496

## INTRODUCTION

*Listeria monocytogenes* is a facultatively anaerobic non-spore-forming gram-positive bacterium. It is known to be responsible for severely invasive disease and it can cause sepsis, meningitis, and encephalitis (1). *L. monocytogenes* infection occurs predominantly in the following populations: elderly people, pregnant women, newborns, and immunodeficient patients; patients with chronic liver disease, malignant hemopathies, and diabetes; patients on chronic hemodialysis; and, less frequently, healthy individuals (2). The main route of transmission is confirmed to be through the consumption of contaminated food and via vertical transmission from mother to child (3). *L. monocytogenes* has the ability to cross three significant barriers in humans, such as the intestinal barrier, the blood-brain barrier and the fetoplacental barrier. It can invade normally nonphagocytic cells such as endothelial cells, enterocytes, and fibroblasts, utilizing certain surface invasion proteins, of which internalin A (InlA) and internalin B (InlB) are the best studied (4). Meningitis caused by this bacterium is associated with high mortality rates (5). Diagnosis of meningitis caused by *L. monocytogenes* is a challenge due to the absence of typical clinical symptoms (6). *L. monocytogenes* is considered susceptible to a wide range of antibiotics, such as ampicillin, tetracyclines, erythromycin, and gentamicin. However, most strains of *L. monocytogenes* exhibit intrinsic resistance to cefotaxime, cefepime, fosfomycin, oxacillin, and lincosamides (7). In this report, we describe a case of sepsis and meningitis caused by *L. monocytogenes* which developed after chemotherapy and radiotherapy for metastatic adenoid cystic carcinoma of the larynx. Patient was treated with an early switch therapy from ceftriaxone to ampicillin.

## CASE REPORT

A 39-year-old female with diffuse metastatic

adenoid cystic carcinoma presented to the Emergency Department of Hacettepe University Hospital because of fever and general weakness in June 2019. Patient was evaluated for infectious diseases because of high fever. Lumbar puncture (LP) was recommended as a preliminary diagnosis of central nervous system infection. Cranial magnetic resonance imaging (MRI) showed diffuse intracranial metastasis and edema. LP could not be performed due to widespread intracranial metastases. All diagnostic procedures and the treatment were performed after the informed consent had been obtained orally. Empiric acyclovir (3x10 mg/kg) and ceftriaxone (2x2 grams) were started. One set (one aerobic and one anaerobic bottles) of blood sample was taken for the culture. Bactec Plus Aerobic/F and Bactec Lytic (BD Diagnostic, USA) aerobic and anaerobic blood culture bottles were incubated in a Bactec FX instrument (BD Diagnostic, USA). Anaerobic blood culture bottle had a positive signal at the 19th hour of incubation. Microscopy of Gram-stained smears was performed for the positive blood culture bottle. Gram-positive rods were observed and clinicians were informed. Subcultures were performed in %5 sheep blood agar (BD, USA), schaedler agar (BD, USA), chocolate agar (BD, USA) and MacConkey agar (BD, USA), and incubated in aerobic (%5 sheep blood agar, chocolate agar and MacConkey agar) and anaerobic (schaedler agar) conditions. Semi-transparent colonies having beta-hemolysis were obtained from the aerobic culture at the end of 24 hours incubation, and Gram staining of the colonies showed gram-positive rods. The isolate was a catalase-positive, oxidase-negative, CAMP-positivite. Semi-solid motility test medium was used for detecting bacterial motility activity (BD, U.S.A) and the isolate was motile bacterium. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (Bruker, Germany) was used for the identification. The isolate was identified at the species level with a score of



$\geq 2.0$  as *L. monocytogenes*. Antibiotic susceptibility test was performed by gradient test according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines. Minimum inhibitory concentration of ampicillin, penicillin, meropenem, erythromycin, and trimethoprim/sulfamethoxazole were 0.38 µg/ml, 0.38 µg/ml, 0.19 µg/ml, 0.50 µg/ml, 0.032 µg/ml respectively. *L. monocytogenes* was susceptible to all tested antibiotics. Due to detection of *L. monocytogenes* from blood culture at the 48<sup>th</sup> hour of treatment, initial acyclovir and ceftriaxone therapy was changed to ampicillin (6x2 grams). Fever response was obtained at the 48th hour of the ampicillin treatment and CRP value decreased to 1.55 mg/dl. Control blood culture showed absolutely no growth. The patient was discharged after 21 days of ampicillin treatment with the diagnosis of Listeria bacteremia and a preliminary diagnosis of Listeria meningitis.

## DISCUSSION

An empirical therapy for bacterial meningitis, generally third-generation cephalosporins, is always applied at an early stage when bacterial meningitis is suspected. However, this treatment option does not cover *L. monocytogenes*. Cephalosporins, which are effective for some bacterial agents of meningitis, are ineffective against *L. monocytogenes*. This is important to remember in the empiric selection of drugs for pyogenic meningitis. Ampicillin is the preferred agent, resistance to this agent has not

been observed (8, 9). Listeria meningitis should be considered in cases that have immunosuppression and do not improve following first-line treatment with extended-spectrum cephalosporins. Unfortunately, adequate therapy might be delayed in our case, since initial empirical therapy was not adjusted to include ampicillin. Ampicillin should be added to initial empirical therapy especially for Listeria suspicion due to the risk factors. In this report, we described a case of meningitis and bacteremia caused by *L. monocytogenes* in a cancer patient. MALDI-TOF MS has become a standard tool for rapid and reliable microbial identification in clinical laboratories. Rapid and reliable identification of *L. monocytogenes* using MALDI-TOF MS allows a rapid detection of bacteria that cause a life-threatening infection and also provide accurate therapy. When *L. monocytogenes* was isolated from blood culture, antibiotic treatment was switched from ceftriaxone to ampicillin immediately, and the patient was cured. It is very important to adjust the appropriate antibiotic therapy as soon as possible once *Listeria* is highly suspected or confirmed by a culture. We encountered a case with sepsis and meningitis caused by *L. monocytogenes* which developed after chemotherapy and radiotherapy for metastatic adenoid cystic carcinoma of the larynx. Early management of sepsis and meningitis, by performing rapid diagnostic methods and by administration of adequate antimicrobial therapy, can be defined as life-saving circumstances in patients with listeriosis.

## KAYNAKLAR

1. Orsi RH1, Wiedmann M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016; 100(12): 5273-87.
2. Lorber B. Listeriosis. *Clin Infect Dis*, 1997; 24(1): 1-1.
3. Wang HL, Ghanem KG, Wang P, Yang S, Li TS. Listeriosis at a tertiary care hospital in Beijing, China: high prevalence of nonclustered healthcare-associated cases among adult patients. *Clin Infect Dis*, 2013; 56(5): 666-76.
4. Douglas A, Drevets, Michael S, Bronze. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Microbiol Immunol*, 2008; 53(2): 151-65.
5. Stavru F, Archambaud C, Cossart P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunol Rev*, 2011; 240(1): 160-84.
6. Jing-Jing Liang, Xiao-Yan He, Hong Ye. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* with hydrocephalus and intracranial hemorrhage: A case report and review of the literature. *World J Clin Cases*, 2019; 4(7): 538-7.
7. Morvan A, Moubareck C, Leclercq A, Hervé-Bazin M, Bremont S, Lecuit M. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010; 54(6): 2728-31.
8. Heyderman RS. Early management of suspected bacterial meningitis and meningococcal septicaemia in immunocompetent adults-second edition. *J Infect*, 2005; 50(5): 373-74.
9. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis*, 2004; 39(9): 1267-84.

# Gıda kaynaklı hastalıklarda intestinal mikrobiyotanın önemi

## Importance of intestinal microbiota in foodborne diseases

Lütfiye PARLAK<sup>1</sup>, Derya DİKMEN<sup>1</sup>

### ÖZET

Gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklar her yıl milyonlarca kişiyi etkileyen ve özellikle çocuk ölümlerine neden olan önemli bir sağlık sorunudur. Gıdaların üretimi, hazırlığı, pişirilmesi ve tüketimi esnasında yapılan yanlış uygulamalar ve meydana gelen patojen kontaminasyonu gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklara yol açmaktadır. Gıda kaynaklı birçok patojen vardır fakat bu hastalıkların çoğu bakteriyel kaynaklıdır. İnsan gastrointestinal sistem mikrobiyotası da trilyonlarca bakteri ile kolonize olmasına rağmen bu bakteriler konak ile simbiyotik bir ilişki içerisinde. Vücutta ek bir organ olarak düşünülecek kadar fonksiyona sahip olan bağırsak mikrobiyotası, gastrointestinal sisteme alınan patojen bakterilerin çoğalmasının ve enfeksiyona neden olmasının önlenmesi için sahip olduğu kolonizasyon direnci mekanizmaları ile konak savunmasına katkıda bulunur. Sağlıklı bağırsak mikrobiyotası patojen bakteriler ile antibakteriyel bileşikler ve inhibitör metabolitler üreterek ve teması bağılı öldürme yoluyla patojen virülansına müdahale ederek fiziksel alan, eser elementler, vitaminler, karbon kaynakları gibi gıda kaynakları ve metabolitler için yarışa girerek doğrudan mücadele etmektedir. Ayrıca hem bağırsak epitel

### ABSTRACT

Foodborne diseases are an important health problem that affect millions of people every year and especially lead to children mortality. Malpractices did during the production, preparation, cooking, and consumption of foods and the occurrence of pathogen contamination lead to diseases caused foodborne disease. There are many foodborne pathogens, but most of these diseases occur from bacterial sources. Although the microbiota of the human gastrointestinal system is colonized by trillions of bacteria, these bacteria are in a symbiotic relationship with the host. The intestinal microbiota with enough function to be considered as an additional organ in the body contributes to host defense with the mechanisms of colonization resistance, to prevent the colonization of pathogenic bacteria enter to the gastrointestinal system and prevent to develop infection by pathogenic bacteria. The healthy intestinal microbiota fights directly against pathogen bacteria by producing antibacterial compounds and inhibitory metabolites and by contact-dependent killing; by interfering with pathogen virulence; entering the race for the physical area, food sources and metabolites such as trace elements, vitamins, carbon sources. In addition, regulation of the intestinal epithelial cell

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Derya DİKMEN

Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : ddikmen@hacettepe.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 21.05.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 12.10.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.54926

Parlak L, Dikmen D. Gıda kaynaklı hastalıklarda intestinal mikrobiyotanın önemi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 497-508

bariyerini hem de ilişkili immün doku fonksiyonlarını koruyarak konağın bağırsak epitel hücre fonksiyonunun düzenlenmesi, doğuştan gelen bağışıklığın uyarılması ve kazanılmış bağışıklık yanıtlarını, B hücrelerini, T hücrelerini ve doğrudan antijen sunumunu modüle ederek de dolaylı yoldan mücadele etmekte ve böylece patojenlerin bağırsak yüzeylerine bağlanmasını ve çoğalarak enfeksiyon oluşturmalarını önlemektedir. Bağırsak mikrobiyotası başta diyet ve antibiyotik kullanımı olmak üzere birçok faktörden etkilenmektedir. Sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının bozulması ise kolonizasyon direncinde azalmaya ve bununla beraber patojenlere karşı duyarlılıkta artışa neden olmaktadır. Bu nedenle gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklarda bağırsak mikrobiyotası oldukça önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Gıda kaynaklı hastalıklar, kolonizasyon direnci, mikrobiyota

function by preserving both intestinal epithelial barrier and related immune tissue functions, stimulation of innate immunity and by modulating adaptive immune responses, B cells, T cells, and direct antigen presentation; thus, it prevents binding of pathogens bacteria to the intestinal surfaces and developing an infection by colonization. The intestinal microbiota is influenced by many factors, especially dietary and antibiotic use. Unhealthy intestinal microbiota causes a decrease in the resistance to colonization and therefore an increase in susceptibility to pathogens. Therefore, the intestinal microbiota is very important in foodborne diseases. In this review, antimicrobial mechanisms of intestinal microbiota against foodborne bacterial pathogens have been discussed.

**Key Words:** Foodborne disease, colonization resistance, microbiota

## GİRİŞ

İnsan vücudunda en geniş yüzey alanına sahip olan gastrointestinal sistem (GİS), mikrobiyota olarak adlandırılan trilyonlarca bakteri ve yüzlerce kommensal bakteri türü ile kolonizedir (1, 2). Bu bakteriler esas olarak konak ile simbiyotik bir ilişki içinde bulunur (1, 3). Mikrobiyota, bir yandan bağışıklık sisteminin uygun şekilde geliştirilmesi, besinlerin sindirimi ve emilimi, vitaminlerin üretimi ve hem besin metabolizmasına hem de gastrointestinal immün sisteminin gelişimine ve fonksiyonuna katkıda bulunur; öte yandan konak da bakteri topluluklarının hayatta kalmasını sağlamak için zengin besleyici yerler sağlar (1, 3-6). Ancak konağın karşılaştığı bakteriler yalnızca simbiyotik bakteriler değildir (1). Gastrointestinal sistem dış ortamdaki gıda kaynaklı patojen bakterilere de maruz kalır (5).

Gıda kaynaklı hastalıklar dünya çapında önemli

fakat önlenilebilir bir sağlık sorunudur (7, 8). 250'den fazla farklı besin kaynaklı hastalık tanımlanmıştır (9). Bu hastalıkların çoğu, çeşitli bakteri, virüs ve parazitlerin neden olduğu enfeksiyonlardır (8, 9). HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points- Tehlike Analizi ve Kritik Kontrol Noktaları) kurallarını uygulayan gıda güvenliği yönetim sistemlerinin geliştirilmesiyle beraber çoğu ülkede özellikle gıda kaynaklı hastalık vakalarında ciddi bir azalma olmuştur (10). Buna rağmen Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre dünyada neredeyse her 10 kişiden biri gıda kaynaklı patojenler nedeniyle hastalanmaktadır ve her yıl hastalanan 600 milyon kişiden yaklaşık 125.000'i beş yaş altı çocuklar olmak üzere 420.000 kişi hayatını kaybetmektedir (11). Gıda zinciri, herhangi bir noktada kontaminasyon nedeniyle bozulabilir (10). Gıdaların üretim, hazırlık, pişirme

ve tüketim esnasında yapılan hijyenik olmayan ve yanlış uygulamalar gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır (12). Et, süt ve ürünleri gibi hayvansal kökenli gıdalar da dahil olmak üzere çiğ, yeterince pişirilmemiş gıdaların tüketimi; dışkı ile kontamine olmuş, yıkanmamış meyve ve sebzeler; balık ve kabuklu deniz ürünleri gibi çiğ deniz ürünleri, besin kaynaklı hastalıklarla ilişkili başlıca etmenlerdir (7, 11). Gıda kaynaklı hastalıklara gıda güvenliğini tehdit eden fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmenler neden olabilir. Ancak patojen bakteriler gıda kaynaklı hastalıkların ana nedenidir (13). *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp. başta olmak üzere *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*'un gıda kaynaklı hastalıklara neden olduğu ve yılda milyonlarca insanı etkilediği bilinen en yaygın bakteriyel patojenlerdendir (11, 12).

Sağlıklı mikrobiota, patojenlerin büyümesinin, kalıcılığın ve ardından enfeksiyonun önlenmesi anlamına gelen kolonizasyon direncinde önemli bir rol oynar ve mukozal bağışıklık sistemi üzerinde üzerindeki etkileriyle konak savunmasına katkıda bulunur (14, 15). Doğal korumanın altında yatan mekanizmalar hala tam olarak netliğe kavuşmamıştır (16). Ancak yapılan çalışmalarda (17-19), normal bağırsak mikrobiyotasının patojenlere karşı koruduğu iddiasını destekleyen çok sayıda veri vardır. Mikrobiyotaya sahip olmayan germ-free hayvanlarla yapılan çalışmalarda, bu hayvanların *Shigella flexneri*, *L. monocytogenes*, *Clostridium difficile* ve *Salmonella enterica* gibi enfeksiyonlara karşı konvansiyonel hayvanlardan daha az direnç gösterdikleri ve enfeksiyon duyarlılıklarının arttığı gösterilmiştir (17-19).

Bu derlemede, gıda kaynaklı patojenlere karşı insan doğal intestinal mikrobiyotasının antimikrobiyal mekanizmaları ele alınmıştır.

### İnsan mikrobiyotası

Yakın zamana kadar infant GIS'in steril olduğu

kabul edilmiştir. Fakat yapılan çalışmalarda, GIS'deki kolonizasyonun aslında doğumdan önce başladığı anlaşılmıştır (20, 21). Doğumla beraber insan gastrointestinal sistemi çeşitli arkea, bakteri, mantar, virüs ve mikroökaryot topluluklar ile hızla kolonize olmaktadır. Yaşamın ilk yıllarında mikroorganizmaların kolonizasyonu yetişkinlere göre daha az çeşitlidir ve birçok faktörden etkilenir (3, 14).

Vücut ağırlığının yaklaşık 2 kg'ını oluşturan intestinal alan, yüzlerce türden oluşan yaklaşık 100 trilyon (10<sup>14</sup>) mikroorganizma içerdiği ve insan vücudundaki hücre sayısından 10 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (22, 23). Yemek borusu ve midedeki bakteri sayısı 101 ila 103 arasında değişiklik gösterirken, ince bağırsağa geçişle artış göstermekte ve kolonda ise 1 gram, dışkıda 10<sup>14</sup>'e kadar ulaşabilmektedir (22). GIS mikrobiyota bileşimi bireyler arası farklılık göstermesine rağmen, sağlıklı yetişkin bir mikrobiyotanın çoğunluğu *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*'in hakimiyetiyle beraber *Actinobacteria* ve *Proteobacteria* olmak üzere dört ana filumdan ve bunlara ek olarak *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* ve *Cyanobacteria* gibi birçok küçük filumdan oluşur (2, 16, 24). Bu filumlar, farklı mikro ortamlardan ve besin kullanılabilirliğinden etkilenen GI (gastro intestinal) kanal boyunca değişir (24, 25). Yeni doğan bağırsağındaki oksijenin bolluğu nedeniyle, yaşamın ilk haftasında bulunan mikrobiyotada, çoğunlukla *Proteobacteria* türleri (örneğin, *Escherichia*, *Klebsiella* ve *Enterobacter*'e ait türleri) gibi fakültatif anaeroblar baskındır. *Proteobacteria* ait türlerinin bağırsağı, sağlıklı yetişkin mikrobiyotasında bol bulunan diğer anaerobların kolonizasyonu için hazırladığı söylenebilir (26).

Toplam bakteri yoğunluğu kolonda ince bağırsaktan daha fazladır. *Firmicutes* ve *Bacteroidetes*, kolondaki bakteriyel popülasyonun %90'ından fazlasını oluştururken *Actinobacteria* ve *Proteobacteria* düşük miktarda bulunur (2, 26). Genel olarak, *Firmicutes* filumunun bir üyesi olan *Lactobacillus* ve *Proteobacteria*, ince bağırsağın başlıca elemanlarıdır (2, 4). *Firmicutes* filumu, temel olarak Gram pozitif

aerobik ve anaerobik bakterilerden oluşur ve bu filumun üyeleri, yararlı ve koruyucu ile patojenik arasında değişen *Clostridia* türleridir. Potansiyel olarak patojenik olan streptokoklar, enterokoklar ve stafilkoklar da *Firmicutes*'dir. *Bacteroidetes* filumu ise bağırsak ortamına son derece iyi adapte olan Gram negatif bakterileridir (24). Konağın sindirim enzimlerine dirençli olan kompleks polisakaritleri sindirir (2). Aktinobakteriler, genellikle *Bifidobacterium* cinsi gibi faydalı olduğu düşünülen ve birçok probiyotik preparasyona dahil edilen Gram pozitif bakterilerdir (4, 24). *Proteobacteria* filumu ise, *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* dahil olmak üzere, özellikle *Enterobacteriaceae* familyası olan Gram negatif bakterileri içerir (24).

Bağırsak mikrobiyotası, vücutta ek bir organ olarak düşünülecek kadar fonksiyona sahiptir. Bağırsaklarda patojen kolonizasyonunu önler, immün gelişimi ve homeostazi, konak hücre proliferasyonunu, vaskülarizasyonu, nörolojik sinyalizasyonu, intestinal endokrin fonksiyonları, kemik yoğunluğunu, enerji biyojenezini de etkiler. Vitamin, nörotransmitter ve steroid hormon sentezler (22, 24, 27). Dalı zincirli ve aromatik amino asitlerin, besin bileşenlerinin, safra tuzlarının, ilaçların ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynar. Mikrobiyotanın etkisi bağırsakla sınırlı değildir ve beyin de dahil olmak üzere çoğu organın fizyolojisini etkiler (24, 27).

### Bakteriyel patojenlerin gastrointestinal sisteme girişi

GİS, konakçının hem simbiyotik hem de patojenik olan çeşitli mikroorganizma dizileriyle etkileşime girdiği karmaşık bir ortamdır. Besin veya su ile alınan bakteriler, öncelikle midedeki gastrik asit nedeni ile asit ortama (pH=2) daha sonra ise duodenumda daha yüksek pH'a (pH=6) maruz kalır (28, 29). Ancak asite dirençli bir miktar bakteri ince bağırsağa geçebilir. Alınan bakterilerin bazıları zararsız bir şekilde bağırsak mukozasında kolonize olurken, çoğu bakteri ise GİS'den atılır. Eğer bağırsak mukozasını normal flora kolonize ederse, inflamatuvar yanıtı ve doku

hasarına neden olan metabolik olayları tetiklemez (13). Alınan bakteriler probiyotik ise, mikrobiyotanın şekillenmesini ve çeşitlenmesini sağlayarak metabolik üretkenliği geliştirir. Eğer bakteriler mikrobiyotada küçük ve olumsuz değişikliklere neden olursa hızla düzeltilerek normal duruma geri döndürülür (6). Gİ kanalına giren çoğu bakteri, mikrobiyal bağlanma ile aktive olan bir süreç olan normal bağırsak mukozasını kolonileştirme kabiliyetine sahip değildir. Bağlanma, bakterinin konak hücrenin yüzeyine bağlanmasını içeren spesifik bir olaydır ve bakterinin, konağın epitel hücresine bağlanması GİS'den atılmasını geciktirir (13, 28). Ancak alınan bakteriler patojen ise mikrobiyotada disbiosis oluşturabilir (6). Hastalık meydana getirebilmek için patojenlerin, bağırsak lümeninde çoğalarak yeterli bir popülasyon yoğunluğuna ulaşması gerekir (16). Bu nedenle, bakteriler GİS'i kolonize etmek ve epitel bariyeri geçmek için çeşitli stratejiler geliştirir. Patojen bakteriler, çeşitli bağlanma faktörleri, biyofilm oluşumuna izin veren hücre dışı matrisler üretirler. Farklı metabolitleri algılama sistemleri sayesinde mikrobiyotaya karşı yarışarak bağırsakları kolonize edebilirler (29, 30). Böylece GİS'e giren bakterilerin az bir miktarı hastalığa neden olabilir. Fakat bunun için bakterinin bir dizi daha antimikrobiyal mekanizmayı da aşması gerekir (16, 22).

### Bağırsak mikrobiyotasının antimikrobiyal direnç mekanizmaları

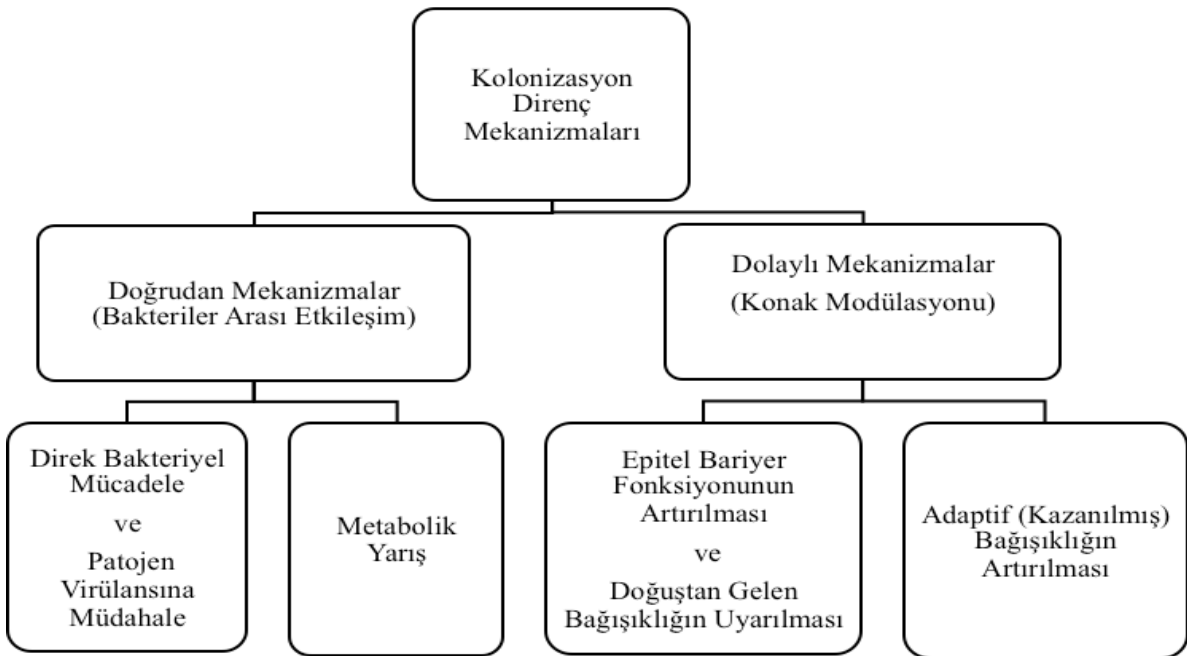
Mikrobiyotadaki bakterilerin varlığı genel olarak faydalı olsa da, patojen bakterilerin ekstraintestinal organlara yayılması veya enterik patojenik bakterilerin büyümesi konak için ciddi sağlık sorunlarına neden olabilir ve bağırsakların geniş yüzey alanı da bu riski artırmaktadır (5, 31). Bu nedenle patojenlerin, bağırsak lümeninde çoğalarak hastalığa neden olmasının önlenmesi ve dengenin korunması için çeşitli mekanizmalar mevcuttur (16, 22). Bu mekanizmalar, trilyonlarca kommensal bakterinin bağırsak lümenini kapladığı ve kompleks mikrobiyal ağlarla birbirleriyle olduğu gibi konakçı ile de yakından etkileşime girdiği

bağırsakta en iyi şekilde karakterize edilmiştir (32). Bağırsak mikrobiyotasının, bakterilerin aşırı miktarda çoğalmasının engellenmesi, ekstraintestinal organlara yayılması veya bağırsağın patojenlerin kolonizasyonundan koruması ve enfeksiyona en başından müdahale etmesi kolonizasyon direnci olarak adlandırılır (2, 16). Mikrobiyota bakteriler arası etkileşim ve konak modülasyonu olmak üzere iki mekanizma ile patojenlere karşı kolonizasyon direnci sağlamaktadır (Şekil 1) (4, 33).

### 1. Doğrudan mekanizmalar (Bakteriler arası etkileşim)

Patojen büyümesinin inhibisyonu; doğrudan bakteri yok edici mekanizmalar, besin ve yer yarışı ve patojenlerin spesifik virülans mekanizmalarını zayıflatma yoluyla meydana gelebilir (4, 33).

**Metabolik yarış:** Kommensal bağırsak bakteriyel florası ve enterik bakteriyel patojenler, ihtiyaçları olan nişler ile çeşitli karbon ve enerji kaynakları, demir gibi eser elementler, B12 gibi vitaminleri içeren bazı önemli besin kaynaklarını paylaşır. Ayrıca konakçı epitel hücrelerini kolonileştirmek, besin maddelerine kolay ulaşmak ve bağırsak boyunca çoğalmak için de benzer ekolojik nişlere ihtiyaç duyar. Bu yüzden bakterilerin bağırsakta sınırlı besin kaynakları ve aynı zamanda fiziksel alan için rekabet etmesi gerekir. Kommensal bakteriler, metabolik kaynaklar için enterik patojenlerle yarışarak, ihtiyacı olan aminoasitleri ve organik asitleri tüketir, bu da patojenik bakterilerin yarış dışı kalmasına, açlığına ve ölümüne neden olur. Böylece bağırsak yüzeylerine patojenik mikroorganizmaların bağlanmasını ve çoğalmasını önler, patojen kolonizasyonunu



Şekil 1. Bağırsak mikrobiyotasının kolonizasyon direnç mekanizmaları (4, 32)

ve enfeksiyonu sınırlamada, yani kolonizasyon direncinde kritik bir rol oynar (16, 23, 33-36). Ayrıca kommensal bakteriler, konakçı ve diğer bakterilerin erişemediği kompleks polisakaritlerin sindirimini sağlayan birçok gene sahiptir. Bu bakteriler tarafından serbest bırakılan metabolitler, diğer kommensal bakteriler tarafından tüketilmektedir. Mikrobiyota kompozisyonunda değişiklik meydana geldiğinde kommensal bakteriler tarafından tüketilemeyen besin kaynakları ve metabolitlerin, patojenik bakteriler tarafından tüketilmesiyle patojen kolonizasyonuna destek vermektedir (36). Ek olarak bakteriler oksijen için de yarışa girerek en sık karşılaşılan patojenler olan anaerobik fakültatif patojenlerin büyümesini engelleyebilir (16). Sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotası, böylece gelen patojenleri yarışarak saf dışı bırakabilir (23).

**Direk bakteriyel mücadele ve patojen virülansına müdahale:** Kommensal bakteriler, patojenlerin ve diğer komşu bakteri türlerinin yapışmasını, çoğalmasını, hayatta kalmasını ve kolonizasyonunu engelleyen bazı antimikrobiyaller üretir (23, 37, 38). Üretilen intestinal bakteriyosinler, mikrosinler ve enterotoksinler gibi antimikrobiyaller; patojenik bakterileri hedef alarak bu bakterileri öldürebilir veya büyümesini inhibe ederek kolonizasyonunu doğrudan bloke edebilir (4, 23, 39-41). Bağırsak mikrobiyotasının patojenlere karşı doğrudan inhibe edici bir başka etkisi de safra asitlerini içeren bir mekanizmadır. Karaciğerde üretilen ve duodenumdan salınan safra asitleri daha sonra bağırsak mikrobiyotası tarafından antibakteriyel faktörler olarak patojen bakterilere etki edebilen sayısız sekonder safra asidi haline getirilir (41). Kommensal bakteriler, diğer bakteriyel türlerin büyümesini, antibakteriyel bileşiklerin ve inhibitör metabolitlerin yanı sıra temasa bağlı öldürme yoluyla da sınırlayabilir. Birçok Gram negatif bakteri türü, sahip oldukları Tip-VI salgılama sistemi (T6SS) kullanarak komşu hücreleri doğrudan antagonize edebilir (33). T6SS, sadece Gram negatif bakterilerde bulunan ve efektör moleküllerin Gram negatif

bakterilerin iç ve dış zarlarına ve bitişik bakteri veya ökaryotik hücrelere taşınmasına izin veren kompleks yapılardır. Bu nedenle, antimikrobiyal bileşiklerden veya metabolizmanın toksik yan ürünlerinden farklı olarak, T6SS aktivitesi, antagonizm için hücreden hücreye temas gerektirir. İletilen efektör maddeler genellikle bir antimikrobiyal toksindir ve çeşitli etki mekanizmaları ile komşu hücreleri antagonize eder (2, 42). Ayrıca kommensal bakteriler, virülans gen ekspresyonunun entegre ettiği, çeşitli çevresel ipuçlarını modifiye ederek patojen virülans mekanizmalarını doğrudan etkileyebilir (33). Ek olarak bu bakterilerin ürettiği çeşitli kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) gibi metabolik yan ürünler de, konakçı bağışıklığını modüle etmenin yanında çeşitli patojenlerin virülans gen ekspresyonuna doğrudan modüle etmektedir (23, 33).

## 2. Dolaylı mekanizmalar (Konak modülasyonu)

Mikrobiyota, bağırsak epitel bariyeri ile doğuştan gelen ve adaptif immün sistemlerini geliştirmelerine aracılık eder ve kolonizasyon direncini artırarak enfeksiyona duyarlılığı azaltabilir (33). Tablo 1'de besin kaynaklı hastalıklara neden olan bazı önemli bakterilerin intestinal epitel hücrelere bağlanma yolu ve mikrobiyotada karşılaştıkları kolonizasyon direnci örnekleri gösterilmektedir (32, 34, 35, 34, 43-47).

**Epitel bariyer fonksiyonunun artırılması ve doğuştan gelen bağışıklığın uyarılması:** Sağlıklı bağırsak mikrobiyotası, hem epitel bariyerini hem de ilişkili immün doku fonksiyonlarını koruyarak konak intestinal epitel hücre fonksiyonunun düzenlenmesi yoluyla enterik bakteriyel patojenlerin kolonizasyon ve enfeksiyonuna karşı koruma sağlar (48). Enterositler, panet hücreleri ve goblet hücreleri gibi farklı hücre tiplerinden oluşan bağırsak mukozasının epiteli, bakteri ürünlerinin ve potansiyel antijenlerin geçişini engelleyen sıkı bir bariyer oluşturur (22, 37). Fakat bağırsak epiteli besin ve su alışverişine uyum sağlamak için yalnızca tek tabakalı, bir



**Tablo 1.** Bazı patojen bakterilerin intestinal epitel hücrelere bağlanma yolu ve mikrobiyotada karşılaştıkları kolonizasyon direnci

Patojen Bakteri	Epitel Hücreye Bağlanma Yolu	Mikrobiyotada Karşılaştığı Kolonizasyon Direnci
<i>Salmonella typhimurium</i>	Tip III Salgılama Sistemi (T3SS) (43)	*SCFA (Propiyonat) (32) *SCFA (Clostridia tarafından üretilen bütirat) (43) * <i>E. coli</i> Nissle 1917 ile demir rekabeti (34)
<i>Campylobacter</i> spp.	Bakteri yüzeyindeki Adezin Proteinleri (44)	*Mikrobiyotada yüksek tür çeşitliliği (45)
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	Salgıladığı Shiga Toksini (46)	*Kommensal <i>E. coli</i> ( <i>E. coli</i> Nissle 1917 ve HS) ile besin rekabeti (35)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sahip olduğu Internalin Proteini (47)	* <i>Lactobacillus</i> spp. suşları ile karbon ve azot rekabeti (47)

hücre kalınlığındadır. Ayrıca alt GI kanalının (ince bağırsak ve kolon) epiteli, sindirime yardımcı olan trilyonlarca bakteriye yakın bir şekilde bulunur (31). Patojenlerin bağırsak kolonizasyonu için ilk adım, mukozal yüzeylere yapışmalarıdır. Bu adım, goblet hücreleri tarafından salgılanan mucus sayesinde, kalın bir mukus tabakası tarafından bağırsak epitelinin kaplanmasıyla engellenir ve bu da bakteriyel kolonizasyona karşı ilk savunma katmanını sağlar (1, 4, 22). Mukus tabakası, mucus, glikoproteinler, trefoil peptidler, yüzey-aktif fosfolipidlerden oluşur. Hepsini beraber mikroorganizmalara karşı koruyucu bir engel olarak önemli rol oynayan, polisakarit içeriği sayesinde ise ayrıca besin yönünden zengin bir tabaka oluşturur (29, 49). Mukus, bağlanma ve beslenme için iyi bir ortam sağlasa da, hem epitel hücresinin engajmanını önler hem de immunoglobulin A (IgA) ve antimikrobiyal peptitler (AMP) gibi diğer antimikrobiyal maddeleri içerir (1). AMP'ler bağırsak homeostazını sağlamada büyük öneme sahiptir ve geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumu gösterir (50). Özellikle defensinler ve kateksinler gibi katyonik antimikrobiyal peptitler (CAMP) membranda

gözenekler oluşturarak bakterileri öldürmektedir (1, 33). CAMP'ler ayrıca, nötrofillerin enfeksiyon bölgelerine toplanmasına yol açan immünomodülatör aktivitelere de sahiptir (1). Konağın özel bir ince bağırsak epiteli olan panet hücresi antimikrobiyal peptitlerin (özellikle C tipi lektinler ve  $\alpha$ -Defensinler) ana kaynağıdır ve bu antimikrobiyal peptitler bağırsak mikrobiyotasının bileşiminin düzenlenmesinde rol oynar ve lümen bakterilerine karşı mukozal bariyer fonksiyonunu artırırlar (4, 15, 16).

Bağırsak immünitesini artıran bir başka mekanizma ise epitelyal hücreler tarafından kemokinlerin ve antimikrobiyallerin salgılanmasını indükleyerek patojenlere karşı mukozal bariyeri güçlendiren bir sitokin olan IL-22'nin uyarılmasıdır (4). Ayrıca bağırsaktaki makrofajlar ve dendritik hücreler kommensal bakterilere karşı düşük duyarlılığa sahipken, patojenlere karşı yüksek duyarlılık gösterir ve buna cevaben IL-1b salgılanması ve uyarımıyla beraber nötrofiller enfeksiyon bölgesine toplanır (4, 23). Bariyer bütünlüğünü korumak için ise bazı bakteriler ile küçük mukozal alanlar arasındaki uzun süreli etkileşimi engelleyen bağırsak mobilitesi

mevcuttur. Ayrıca klorür salınımı da bariyer bütünlüğünün korunumunda oldukça önemlidir (22). Bazı kommensal bakteriler de, spesifik metabolitlerin üretilmesi yoluyla epitel bariyer fonksiyonunu artırabilir (4). *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* spp. gibi kommensal bakteriler tarafından diyet liflerinin fermantasyonu ile butirat, propiyonat gibi KZYA'ların üretimi, bağırsak ortamını asitleştirerek patojenik enterohemorajik *E. coli* O157: H7 (EHEC), *Salmonella typhimurium* dahil olmak üzere birkaç bağırsak patojeninin büyümesini engeller (23, 32, 42). Ayrıca KZYA'lar, bağırsak lümenindeki sınırlı oksijen ve nitrat mevcudiyetinin korunmasında da kritik bir rol oynar. KZYA'ların kaybı artan oksijen ve nitrat salınımı tetikler (43, 51). Kommensal bakteriler ayrıca hücrenin içsel mikrobiyal temizleme mekanizmalarını da düzenleyebilir. Özellikle, hücre içi geri dönüşüm yolu olan otofaji, intestinal bariyer fonksiyonunun ve doğal bağışıklık sisteminin önemli bir parçası olarak ortaya çıkmıştır (33).

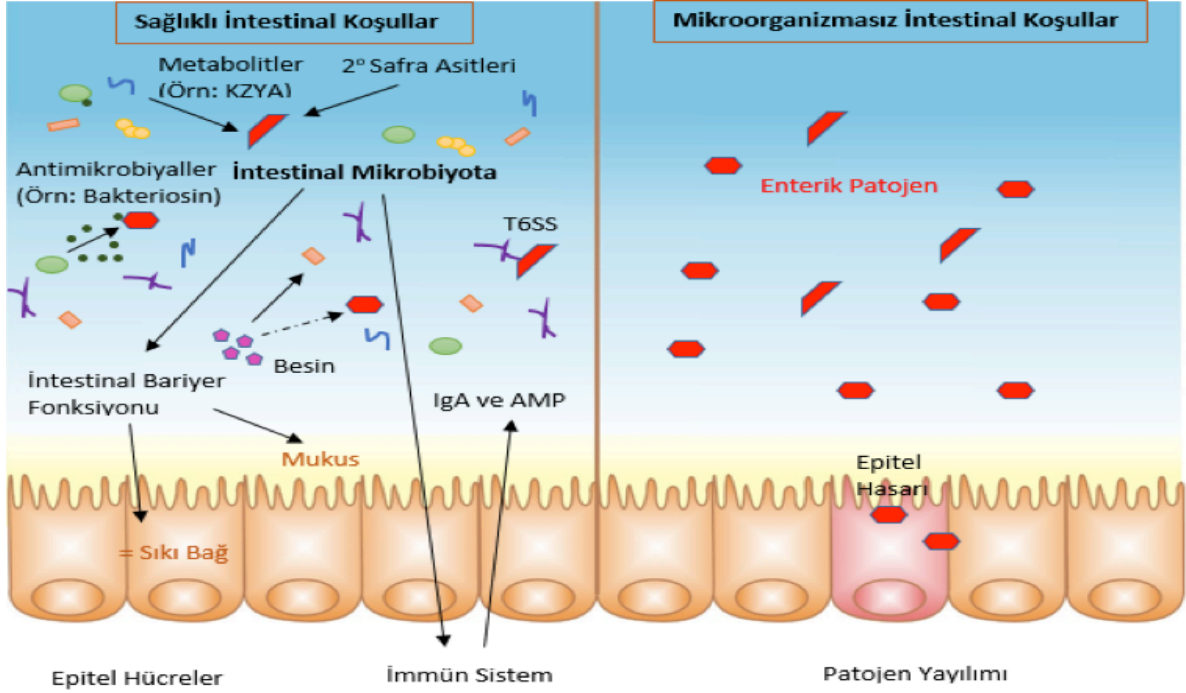
**Adaptif (Kazanılmış) bağışıklığın artırılması:** Mikrobiyota, adaptif immün yanıtları düzenleyerek enterik patojenlere karşı savunmada merkezi bir rol oynar (33). Kommensal bakteriler bağışıklık sistemi olgunlaşmasını etkileyen T hücrelerinin, T Helper (Th) ve T Regulator hücrelerine (Treg) olmak üzere farklı alt gruplara farklılaşmasında görev alır (37). Özellikle bakteriler tarafından üretilen KZYA, epitel hücreler ile diğer immün hücrelerin yüzeyindeki insan genomundaki en yaygın membran proteini olan G protein-bağlı reseptörlere (GPCR) bağlanarak anti-inflamatuar sitokinlerin ve Treg hücrelerinin uyarılmasına yol açmaktadır (33). Th-17 patojenlere (ekstrasellüler bakteriler ve bazı mantarlar) karşı korumada önemli rol oynayan IL-17 ve IL-22 sitokinlerini sentezler. Treg ise enfeksiyona karşı doku hasarını önlemek için inflamasyonun kontrolünde rol oynayan IL-10, TGF- $\beta$  ve IL-35 gibi immünoşüpresif sitokinleri sentezler (37). Kommensal bakteriler, çeşitli yollarla bağışıklık sistemi olgunlaşmasını etkileyen bu hücrelerin oranını etkileyerek, bakteriyel patojenlere karşı konakçı yanıtını etkileyebilir (33).

Ayrıca bakteriyel peptit ve protein antijenleri; bakteriye özgü T hücre yanıtları oluşturmak için, majör doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf I ve II molekülleri tarafından işlenir ve T hücrelere sunulur (33). Bu nedenle bakteriyel metabolitler, antijen sunum yollarını doğrudan değiştirerek de adaptif immün yanıtta rol oynar (33).

Bağırsak bakterileri, B hücre gelişimini ve IgA antikor üretimini de etkilemektedir (37). Son zamanlarda bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen KZYA'ların, B hücresi farklılaşması için gerekli moleküller için gen ekspresyonunu kontrol ettiği, B hücre yanıtlarını metabolik olarak arttırdığı ve patojene özgü antikor yanıtlarını kolaylaştırdığı, patojen duyarlılığını azalttığı gösterilmiştir (52). B hücreleri tarafından üretilen IgA, bağırsak bariyer fonksiyonunu desteklemede, mikrobiyota kompozisyonunu belirlemede ve enterik patojenlerin temizlenmesinde rol oynayarak GİS'deki enfeksiyonların kontrolünde görev alır (4, 16, 33, 37). IgA üretiminin etkilenmesine ek olarak bazı kommensal bakteriler, IgG antikor yanıtlarını da etkileyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada Enterobacteriaceae ailesinin üyeleri gibi bazı kommensal bakterilerin enfeksiyonları önlemek için sistemik olarak yayılarak IgG'ye özgü antikorların sentezini indüklediği gözlenmiştir (53).

Şekil 2'de görüldüğü gibi çoğu durumda, mikrobiyota patojenlere karşı etkili bir kolonizasyon direnci sağlar ve patojenlerin çoğalmasına imkan vermez (36, 41).

Eğer patojen bakteriler bağırsakta çoğalarak yeterli sayıya ulaşır hastalık meydana gelebiliyorsa bu durum genellikle kolonizasyon direncinin zayıflığından kaynaklanır. Örneğin yeni doğarlarda olduğu gibi olgunlaşmamış bağırsak mikrobiyotası düşük kolonizasyon direncine sahiptir (3). İnsan GİS mikrobiyota tür bileşimi kolonizasyon direncinde önemli rol oynadığı için mikrobiyotanın tür çeşitliğinde azalma da azalmış kolonizasyon direnci ve enfeksiyonlara artan duyarlılıkla ilişkilidir (45).



Şekil 1. Sağlıklı intestinal mikrobiyotanın enterik patojen ile mücadelesi (35, 40)

KZYA: Kısa Zincirli Yağ Asitleri, IgA: İmmüoglobulin A, AMP: Antimikrobiya Peptitler, T6SS: Tip-VI Salgılama Sistemi

Mikrobiyotadaki değişiklikler patojen bakterilerin enfeksiyonunu engelleyebileceği gibi destek de verebilir. Mikrobiyotanın bozulması, bağırsak ekosistemini bozar ve patojenlerin kommensal bakteriler tarafından tüketilecek olan kaynaklara ulaşmasını sağlar. Bu durumda mikrobiyota, konak ve patojen arasındaki çok yönlü etkileşimler patojen lehine değiştirilir (16, 39). Mikrobiyotayı etkileyen çevresel faktörler henüz tam olarak belirlenememiş olsa da gastrointestinal mikrobiyota konağın genetiğinden, yaşından, diyetinden, cinsiyetinden ve yaşam tarzından etkilenebilir (3, 29, 54-57). Diyet bağırsak mikrobiyotasını etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. Kısa ve uzun vadeli diyet değişiklikleri mikrobiyotanın bileşimini etkilediği, mikrobiyotanın diyetdeki değişikliklere bir gün içerisinde bile cevap verebileceği gösterilmiştir (55, 58). Yapılan bir çalışmada, tek bir nesildeki olumsuz diyet değişikliğinin büyük ölçüde düzeltilebilir olduğu

ancak birkaç kuşak aynı şekilde kötü beslenmenin sonraki nesillere bozulmuş bir mikrobiyota aktardığı görülmüştür (59). Ayrıca antibiyotik tedavisi sonrası patojenlerin besin kullanılabilirliğinin değişmesiyle beraber, kommensal bakteri kaybı, bazı taksonların orantısız artışı ile mikrobiyota ciddi şekilde değişerek bozulmakta, kolonizasyon direnci azalmakta ve enterik enfeksiyonlara karşı duyarlılık önemli ölçüde artmaktadır (33, 60).

## SONUÇ

Gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklar sıklıkla gözlenen ve toplumun her kesimini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Bu hastalıkların önlenmesinde gıda güvenliği, hijyen ve sanitasyon uygulamalarının yanı sıra sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının da önemli rol oynadığı açıktır. Sağlıklı bağırsak mikrobiyotası enterik patojen

bakterilerin kolonizasyonuna karşı antimikrobiyal direnç mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmalar hala net olarak çözülemese de, antibiyotik kullanımı, diyet değişikliği gibi mikrobiyotayı değiştirebilen faktörler, kolonizasyon direncini de değiştirip enterik patojenlere karşı duyarlılığı artırabilir. Bu nedenle gıda kaynaklı patojenlerin neden olduğu hastalıklardan korunmada sağlıklı mikrobiyota oldukça önemlidir. Buna ek olarak kaybedilen kolonizasyon direncini yeniden sağlamak veya artırmak ya da

potansiyel patojenleri ortadan kaldırmak için kolonizasyon direncini destekleyen diyetler, gıda katkı maddeleri ve yeni nesil probiyotikler geliştirilmesi ile sağlıklı mikrobiyotanın geri kazanımı bu hastalıklardan korunmada önemli rol oynayabilir. Ayrıca konak, mikrobiyota ve patojen arasındaki karmaşık etkileşim ağının çözülmesi kolonizasyon direnci mekanizmalarına ışık tutarak gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesine yardımcı olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Ahmer BMM, Gunn JS. Interaction of Salmonella spp. with the intestinal microbiota. *Front Microbiol*, 2011; 2: 101.
2. Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunol Rev*, 2017; 279 (1): 90-105.
3. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Nunez G. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*, 2017; 279 (1):70-89.
4. Sassone-Corsi M, Raffatellu M. No vacancy: how beneficial microbes cooperate with immunity to provide colonization resistance to pathogens. *J Immunol*, 2015; 194 (9):4081-87.
5. Mukherjee S, Hooper LV. Antimicrobial Defense of the Intestine. *Immunity*, 2015; 42(1): 28-39.
6. Josephs-Spaulding J, Beeler E, Singh OV. Human microbiome versus food-borne pathogens: friend or foe. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016;100 (11): 4845-3.
7. Ünüvar S. Microbial foodborne diseases. In: Holban AM, Grumezescu AM, eds. *Foodborne Diseases*. 1st ed. Massachusetts: Academic Press Elsevier, 2018:1-31.
8. Kalyoussef S, Feja KN. Foodborne illnesses. *Adv Pediatr*, 2014; 61 (1): 287-312.
9. Bhaskar SV. Foodborne diseases - disease burden. In: Gupta RK, Dudeja, Singh M, eds. *Food Safety in the 21st Century*. 1st ed. Massachusetts: Academic Press Elsevier, 2017: 1-10.
10. Özdemir A, Dikmen D. Gıda savunmasında yeni yaklaşımlar: risk yönetim metodolojileri. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2018; 75(1): 93-100.
11. WHO, Food Safety. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>, (Erişim tarihi: 22.01.2019.).
12. Dodd CE, Aldsworth TG, Stein RA. *Foodborne Diseases*. 3rd ed. Massachusetts: Academic Press Elsevier, 2017.
13. Sharif MK, Javed K, Nasir A. Foodborne illness: threats and control. In: Holban AM, Grumezescu AM, eds. *Foodborne Diseases*. 1st ed. Massachusetts: Academic Press Elsevier, 2018: 501-523.
14. Libertucci J, Young VB. The role of the microbiota in infectious diseases. *Nat Microbiol*, 2019; 4(1): 35-45.
15. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 2011; 9 (5): 356-368.
16. Stecher B, Hardt W-D. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Curr Opin Microbiol*, 2011; 14 (1): 82-91.

17. Nardi R, Silva M, Vieira E, Bambirra E, Nicoli J. Intra-gastric infection of germfree and conventional mice with *Salmonella typhimurium*. *Braz J Med Biol Res*, 1989; 22(11): 1389-92.
18. Zachar Z, Savage DC. Microbial interference and colonization of the murine gastrointestinal tract by *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 1979; 23(1):168-174.
19. Sprinz H, Kundel DW, Dammin GJ, Horowitz RE, Schneider H, Formal SB. The response of the germfree guinea pig to oral bacterial challenge with *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *Am J Pathol*, 1961; 39: 681-695.
20. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*, 2015;17(5): 690-703.
21. Moles L, Gomez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*, 2013; 8(6): e66986.
22. Biedermann L, Rogler G. The intestinal microbiota: its role in health and disease. *Eur J Pediatr*, 2015; 174(2):151-167.
23. Peng M, Biswas D. Short chain and polyunsaturated fatty acids in host gut health and foodborne bacterial pathogen inhibition. *Crit Rev in Food Sci and Nutr*, 2017; 57(18): 3987-4002.
24. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends Mol Med*, 2016; 22(6): 458-78.
25. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*, 2015; 21(29): 8787-8803.
26. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*, 2015; 33(9): 496-503.
27. Lynch SV, Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease. *N Eng J Med*, 2016; 375 (24): 2369-79.
28. Becattini S, Pamer EG. Multifaceted defense against *Listeria monocytogenes* in the gastrointestinal lumen. *Pathogens*, 2018; 7(1):13.
29. Lustrì BC, Sperandio V, Moreira CG. Bacterial chat: intestinal metabolites and signals in host-microbiota-pathogen interactions. *Am Soc Microbiol*, 2017; 85(12): 14.
30. Bhunia AK. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. New York: Springer, 2018.
31. Ramanan D, Cadwell K. Intrinsic defense mechanisms of the intestinal epithelium. *Cell Host Microbe*, 2016; 19(4): 434-41.
32. Jacobson A, Lam L, Rajendram M, Tamburini F, Honeycutt J, Pham T, et al. A Gut commensal-produced metabolite mediates colonization resistance to salmonella infection. *Cell Host Microbe*, 2018; 24(2): 296-307.
33. Rangan KJ, Hang HC. Biochemical mechanisms of pathogen restriction by intestinal bacteria. *Trends Biochem Sci*, 2017; 42(11): 887-98.
34. Deriu E, Liu JZ, Pezeshki M, Edwards RA, Ochoa RJ, Contreras H, et al. Probiotic bacteria reduce *Salmonella typhimurium* intestinal colonization by competing for iron. *Cell Host Microbe*, 2013; 14(1): 26-37.
35. Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, Cohen PS, Conway T. Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157: H7 in the mouse intestine. *PLoS One*, 2013; 8(1): e53957.
36. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*, 2017; 279(1): 70-89.
37. Ubeda C, Djukovic A, Isaac S. Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clin Transl Immunology*, 2017; 6(2):e128.
38. Kommineni S, Bretl DJ, Lam V, Chakraborty R, Hayward M, Simpson P, et al. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*, 2015; 526: 719-22.
39. Abt MC, Pamer EG. Commensal bacteria mediated defenses against pathogens. *Curr Opin Immunol*, 2014; 29:16-22.

40. Sassone-Corsi M, Nuccio SP, Liu H, Hernandez D, Vu CT, Takahashi AA, et al. Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut. *Nature*, 2016; 540 (7632):280.
41. Rohlion N, Chassaing B. When pathogenic bacteria meet the intestinal microbiota. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016.
42. Sorbara MT, Pamer EG. Interbacterial mechanisms of colonization resistance and the strategies pathogens use to overcome them. *Mucosal Immunology*, 2019; 12(1):1-9.
43. Rivera-Chávez F, Zhang LF, Faber F, Lopez CA, Byndloss MX, Olsan EE, et al. Depletion of butyrate-producing clostridia from the gut microbiota drives an aerobic luminal expansion of salmonella. *Cell Host Microbe*, 2016; 19(4): 443-54.
44. Bolton DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiol*, 2015; 48: 99-108.
45. Kampmann C, Dicksved J, Engstrand L, Rautelin H. Composition of human faecal microbiota in resistance to *Campylobacter* infection. *Clin Microbiol Infect*, 2016; 22(1):61.
46. Sperandio V, Nguyen Y, Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012; 2 (90).
47. Archambaud C, Nahori MA, Soubigou G, Bécavin C, Laval L, Lechat P, et al. Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109 (41): 16684-9.
48. Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 2011; 469 (7331):543.
49. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, et al. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell*, 2016; 167(5):1339-53.
50. Wang S, A Thacker P, Watford M, Qiao S. Functions of antimicrobial peptides in gut homeostasis. *Curr Protein Pept Sci*, 2015;16(7): 582-91.
51. Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, et al. Microbiota-activated PPAR- $\gamma$  signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science*, 2017;357 (6351): 570-5.
52. Kim M, Qie Y, Park J, Kim CH. Gut microbial metabolites fuel host antibody responses. *Cell Host Microbe*, 2016; 20(2): 202-214.
53. Zeng MY, Cisalpino D, Varadarajan S, Hellman J, Warren HS, Cascalho M, et al. Gut microbiota-induced immuno globulin g controls systemic infection by symbiotic bacteria and pathogens. *Immunity*, 2016; 44(3): 647-58.
54. O'Toole PW, Jeffery IB. Gut microbiota and aging. *Science*, 2015; 350 (6265):1214-15.
55. Conlon M, Bird A. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*, 2015;7(1): 17-44.
56. Haro C, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Gómez-Delgado F, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, et al. Intestinal microbiota is influenced by gender and body mass index. *PLoS One*, 2016;11(5): e0154090.
57. Erdinc AS, Aksoy EK, Sapmaz FP, Dikmen D. The effect of low-fodmap diet on the quality of life of patients with constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Clin Nutr*, 2018; 37:S107.
58. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*, 2009;1(6).
59. Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, 2016; 529 (7585): 212.
60. Modi SR, Collins JJ, Relman DA. Antibiotics and the gut microbiota. *J Clin Invest*, 2014; 124 (10): 4212-18.

## Nano-ilaç taşıma sistemleri ve toksikolojik değerlendirmeleri

### Nano-drug delivery systems and their toxicological assessment

Özge MARANGOZ<sup>1</sup>, Oğuzhan YAVUZ<sup>1</sup>

#### ÖZET

Bilim ve teknoloji dünyasına 1960'lı yılların başından itibaren giren nanoteknoloji, nanometre boyutundaki parçacıkların bilimi olarak tanımlanmaktadır. Nanoteknoloji günümüzde organik kimya, moleküler biyoloji, endüstri, elektronik ve sağlık gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin özellikle sağlık alanında kullanılması ile hastalıkların erken teşhisi, önlenmesi ve daha iyi takibi mümkün olabilmektedir. Beşeri ve veteriner hekimlikte ilaç etkin maddelerinin çeşitli nedenlerle etki yerinde istenen yoğunluğa ulaşamaması veya toksik düzeyin üstüne çıkması sıklıkla karşılaşılan istenmeyen durumlardır. Bu nedenle bütün dünyada etkin maddeyi hedef bölgeye yüksek yoğunluklarda ulaştıran ve istenmeyen etkileri mümkün olduğunca azaltan ilaç taşıma sistemleri elde edilmesi için çalışmalar yürütülmektedir. Bu amaçla son yıllarda nanoteknoloji yardımıyla geliştirilen nano-ilaç salınım sistemleri ile birlikte ilaç aktif maddeleri etki yerinde yeterli yoğunluğa ulaştırılabilmekte, sadece hedeflenen organ, doku ve hücrelerde etkin olabilmekte ve kullanılan doz ve doz aralığı azaltılarak istenmeyen etkilerin önüne geçilebilmektedir. Bunun gibi birçok avantaja sahip olmasına rağmen nano-ilaç komplekslerinin boyutları ve bileşenlerinin çok küçük olması nedeniyle, insan ve

#### ABSTRACT

Nanotechnology, which involved in the science and technology from beginning of 1960s, defined as science of nano-sized particles. Nanotechnology is used in many fields, such as organic chemistry, molecular biology, industry, electronic and medicine. Thanks to usage of nanotechnology in the health sector, early diagnosis, prevention and better monitoring of diseases can be possible. Lower access of drug active ingredients than desired concentrations and their higher accumulations than the toxic levels in the action point are usual adverse effects in human and veterinary medicine. Therefore, studies are performed worldwide on drug delivery systems for transferring active ingredients in high concentrations to the target place and for reducing adverse effects as much as possible. Owing to nano-drug delivery systems, active ingredients can be transported to the effect point; they can be effective only in the target organ, tissue and cells; dose and dose intervals can be reduced and adverse effects can be decreased. But, because of small sizes of nano-drug complexes, exposure risk of humans and domestic animals to these materials increased and their toxic effects became conflictive. Thus, toxicity

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Samsun



İletişim / Corresponding Author : Özge MARANGOZ

Ondokuz Mayıs Üni. Vet. Fak. Farmakoloji ve Toksikoloji A.D. Atakum 55139 Samsun - Türkiye

E-posta / E-mail : ozgemarangos@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 09.07.2019

Kabul Tarihi / Accepted : 12.07.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.37790

Marangoz Ö, Yavuz O. Nano-ilaç taşıma sistemleri ve toksikolojik değerlendirmeleri.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(4): 509-526

evcil hayvanların bu yapılara maruziyet riski oldukça artmıştır ve toksik etkilerinin olup olmadığı tartışmalı hale gelmiştir. Bu nedenle nano-ilaç salınım sistemlerinin güvenliklerinin tespitine yönelik toksikolojik çalışmalar önem kazanmıştır. Yapılan araştırmalarda nanomateryallerin hücrelerde apoptoz, nekroz, otofaji, mitotik yıkılma gibi istenmeyen etkilere yol açtıkları rapor edilmiştir. Ancak bu tür sonuçların elde edildiği toksikolojik araştırmalar daha çok in vitro denemelerdir ve in vivo çalışmaların yetersizliğinden dolayı nano-ilaç ve nano-ilaç taşıma sistemlerinin canlı vücudu üzerindeki etkileri tam olarak ortaya konamamıştır. Bu nedenle nano-ilaçların toksisitesi konusunda ayrıntılı, sistematik ve uzun soluklu in vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu derlemede, önemli nano-ilaç ve nano-ilaç taşıma sistemleri ile ilaç taşıma sistemlerinde kullanılan nanomateryallerin toksisitesi ve güvenli kullanımları değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nano-ilaç, taşıma sistemleri, toksisite

studies for determination of safety of nano-drug delivery systems are very imported. It was reported that nanomaterials caused adverse effects on cells, such as apoptosis, autophagy, mitotic catastrophe. However, toxicological researches are mainly based on in vitro experiments and due to lack of enough in vivo studies, exact effects of nano-drug delivery systems on live organisms are not clear. Therefore, detailed, systematic and long term in vivo studies regarding toxicity of nano-drugs, are needed. In this review, important nano-drug and nano-drug delivery systems and their toxicities were evaluated.

**Key Words:** Nano-drug, delivery systems, toxicity

## GİRİŞ

Bilindiği gibi, bir ilaç etkin maddesinin istenilen etkiyi oluşturabilmesi için etki yerine ulaşması, etki yerinde belirli bir yoğunlukta olması ve etki yerinde belirli bir süre kalması gerekmektedir. Beşeri ve veteriner hekimlikte tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar bu gereklilikleri sağlamak için hastalara genellikle sık aralıklarla ve tekrarlanan dozlarda uygulanır. Ancak çeşitli nedenlerle etkin maddenin etki yerinde istenen yoğunluğa ulaşamaması veya toksik düzeyin üstüne çıkması sıklıkla karşılaşılan istenmeyen durumlardır. Bu nedenle bütün dünyada daha düşük dozlarda ve daha uzun doz aralıklarında etkin maddeyi hedef bölgeye yüksek yoğunluklarda ulaştırılan ve istenmeyen etkileri mümkün olduğunca

azaltan ilaç taşıma sistemleri geliştirilmesi için çalışmalar yürütülmektedir. Farmakolojide ideal ilaç uygulamalarını karşılayan bu tür sistemlerden birisi son yıllarda üzerinde yoğun olarak durulan nano-ilaç taşıma sistemleridir (1).

Nano, Yunanca bir kelime olan 'nanos' yani 'cüce' anlamına gelir. Nanometre, metrenin milyarda biridir. Nanoteknoloji ise çok küçük maddelerin, yani nanometre (genellikle 1-100 nm) boyutundaki parçacıkların bilimi olarak adlandırılır. Nanoteknoloji, çeşitli disiplinler arasında birçok köklü etkiler oluşturmuş olup, en önemli uygulama alanlarından biri sağlık alanıdır. Nanotıp, patolojik süreçlerin erken saptanması, önlem alınması ve hedefe yönelik



tedaviler gibi tıbbi amaçlar için organik ya da sentezlenmiş nano-ölçekli materyallerin kimyasal, fiziksel, elektriksel, optik ve biyolojik özelliklerinden yararlanılması olarak tanımlanabilir. Günümüzde nanotıp uygulamalarının gelişmesine paralel olarak çeşitli şekillerde kullanılacak ilaç ve ilaç taşıyıcı nanopartikülleri üretmek mümkün hale gelmiştir. Nano-ilaçlar ve nano-ilaç taşıma sistemleri sayesinde biyoyararlanımı düşük olan ilaçları doğrudan istenen bölgeye hedeflendirme, tanıya yönelik daha verimli görüntüleme ve özellikle tümoral dokuların daha yüksek doğrulukta tespiti, kanserli hücrelere ilaçların yüksek yoğunluklarda ulaştırılması gibi önemli faydalar sağlanabilmektedir (2,3).

Son derece avantajlı özelliklerine karşın canlı üzerinde kullanılacak nanopartiküllerin fizyolojik olarak uyumlu (biyouyumlu) olması, fizyolojik ortamda parçalanabilmesi ve böbrek veya safra yoluyla atılma kabiliyeti gibi çeşitli özelliklere sahip olmaları gerekir. Ancak, aşağıda ayrıntılı şekilde açıklanacağı gibi, yapılan çalışmalar bazı nanopartiküllerin kompozisyonlarına ve boyutlarına bağlı olarak çeşitli şekillerde hücrelere geri dönüşsüz hasar verdiklerini ortaya koymaktadır (2,4).

Bu nedenle, özellikle nano ilaç taşıyıcı sistemlerdeki nanopartiküllerin vücuttaki etkileri ve hasta için güvenilirlikleri, üzerinde özel olarak durulması gereken hususlardır. Bilindiği gibi bir ilacın tüketime sunulmadan önce etkinlik ve güvenliğinin ortaya konması, zehir potansiyeli olan kimyasal maddelerin zehirlilik profillerinin belirlenmesi son derece önem taşımaktadır. Bu amaçla bilgisayar programları ve matematiksel modeller yardımıyla gerçekleştirilen in silico yöntemlerden başlayarak, in vitro ve in vivo birçok denemenin yapılması gerekmektedir (2,4). Buna rağmen, farmakolojide gittikçe önem kazanan nanopartiküllerin çevre, hayvan, insan sağlığı üzerindeki etkileri ve riskleri hakkında bilgiler halen çok yetersizdir ve yapılan çalışmaların önemli bölümünü in vitro denemeler oluşturmaktadır. Bu materyallerin ortamlardaki tespit çalışmalarının yanı sıra çevre ve canlılar üzerindeki

toksik etkilerinin belirlenmesi üzerine yapılan özellikle in vivo çalışmalar son derece sınırlıdır (1-4).

Bu derlemede, önemli nano-ilaç ve nano-ilaç taşıma sistemleri ile ilaç taşıma sistemlerinde kullanılan nanomateryallerin toksisitesi ve güvenli kullanımları değerlendirilmiştir.

## ÖNEMLİ NANO-İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER ve TOKSİKOLOJİK DEĞERLENDİRMELERİ

Nanoteknolojinin en önemli uygulama alanlarından birisi hedeflendirilmiş nano-ilaç taşıma sistemleridir. Özellikle kanser araştırmalarında ve aşı geliştirme çalışmalarında modifiye edilmiş ve fonksiyonlaştırılmış nano-ilaç taşıma sistemlerinin etkinliği konusunda umut verici çalışmalar yapılmıştır. Bu sayede ilaç molekülerinin ulaşması zor olan kanser dokusu, kan-beyin bariyeri gibi engelleri aşması sağlanmış ve tedavide başarılı sonuçlar alınmıştır. Nano-ilaç taşıma sistemleri lipozomlar ve misellerle başlamıştır. Günümüzde, bunların yanı sıra katı-lipit nanopartiküller, polimerik sistemler, dendrimerler, karbon nanotüpler, fullerener, metalik nanopartiküller, nano boyutlu yarı iletken kristal yapılar (kuantum noktaları), metaloksitler gibi birçok nano-ilaç sistemi kullanılmaktadır (1,4,5).

### 1. Lipozomlar

Lipozomlar ilk olarak geliştirilen öncü nano-ilaç taşıma sistemleri olarak kabul edilmektedir. Lipozomlar 50-200 nm büyüklüğünde, temel olarak hücre zarının yapısına benzeyen sistemlerdir. Aynı hücre zarlarında olduğu gibi içte ve dışta polar, arada ise apolar uçlara sahip çift tabaka fosfolipidlerden oluşurlar. Bu sayede lipozomların bükülebilen bir vezikül oluşturma kabiliyetleri vardır. Lipozomlar biyouyumlu olmalarının yanı sıra çok yönlü ve iyi ilaç bağlama verimliliğine sahip sistemlerdir (4,6).

Lipozomların ilaç taşıma sistemi olarak önemli avantaj ve dezavantajları avantajları vardır. Lipozomların önemli avantajları geri dönüşümlerinin mümkün olması, biyouyumlu ve non-iyonik olmaları, hem suda hem de yağda çözünebilir ilaçların

taşınilmesi, etkilerinin arttırılabilir olması, kapsülleme yoluyla stabiliteilerinin artması ve kapsüllemiş ajanların toksisiteilerinin azalmasını sağlamaları sayılabilir. Lipozomların dezavantajları ise üretim maliyetlerinin yüksek olması ile kapsüllemiş ilaç/moleküllerin sızma ve füzyon riskidir (7).

Lipozomlar en eski ilaç taşıma sistemlerinden olduğu için toksisiteilerine ilişkin geçmişten günümüze kadar yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Roursgaard ve ark. (2016), insan akciğer (A-549) ve karaciğer (HepG2) hücre hatlarında lipozom ve katyonik misel ilaç taşıma sistemlerinin doza bağımlı olarak mitokondriyal fonksiyonlarda ve membran bütünlüğünde bozukluklara yol açtıklarını, bunun yanında oksidatif stres belirteçlerinin ortaya çıktığını belirlemişlerdir. Ayrıca iki nano-taşıma sistemi karşılaştırıldığında, meydana gelen bu istenmeyen etkilerin lipozomlarda çok daha yüksek oranda görüldüğü tespit edilmiştir (8).

Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda lipozomların toksik olmadığı ve çeşitli konvansiyonel ilaçların toksisitesini de azalttıkları ortaya konmuştur. Yin ve ark. (2019), BALB/C farelere CT-26 (fare kolon kanseri) hücrelerinin deri altı yolla uygulanması ile bir ksenograf tümör modeli oluşturmuşlar ve tümör oluşan hayvanlara kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaç olan kabazitaksel'i tek başına ve PEG'lenmiş lipozom ile birlikte damar içi uygulamışlardır. Çalışma sonunda lipozomun ilacın in vivo olarak hem tümör hücreleri üzerindeki inhibe edici etkisini artırdığı, hem de ilaca bağlı sistemik toksisiteyi azalttığı ortaya konmuştur (9). Pippa ve ark. (2019) ise karbon nanotüp ve lipozom nanopartikül kombinasyonlarının fare embriyonik fibroblast hücre hattında in vitro toksisitesini incelemişler ve herhangi bir toksisite gözlemlenmemişlerdir (10). Abud ve ark. (2019) lipozom ile kapsüllemiş sirolimus (rapamisin) formülasyonlarının in vitro olarak ARPE-19 ve HRP hücre hatlarında ve in vivo olarak Yeni Zelanda tavşanlarında göz içi uygulama sonunda toksisite saptanmadığını bildirmişlerdir (11).

Zhang ve ark. (2018) ise farelerde melanoma modeli oluşturmuşlar ve sistemik olarak immün stimulan ajanlar olan anti-CD137 ve interlökin-2'yi lipozomal nano-taşıma sistemleri ile uygulamışlardır. İmmün stimulan ajanlar anti-tümör immünite sağlamada yararlı olmalarına rağmen önemli toksisitelere neden olabilmektedirler. Bu çalışma sonunda nano-taşıma sistemi ile uygulanan immün stimulan ajanların tümoral doku üzerinde tek başlarına verilmelerine eşit şekilde etkili oldukları, ancak herhangi bir sistemik toksisiteye yol açmadıkları bulunmuştur. Sonuçta lipozomal nano taşıma sistemlerinin immün agonistlerin uygulamasında genel bir yaklaşım olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (12). Bunun yanında lipozomların sisplatin gibi kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan diğer ilaçların toksik etkilerini önemli ölçüde azalttığına dair bildirimler de bulunmaktadır (9-12).

Görüldüğü gibi lipozomlar genel anlamda güvenli nanomateryaller olarak değerlendirilse de bileşimleri, partikül büyüklüğü ve yüklerine bağlı olarak çeşitli toksik etkilerin ortaya çıkabileceği unutulmamalı ve lipozomlara bağlı bu istenmeyen etkiler lipozom-ilaç taşıma sistemleri tasarlanırken mutlaka göz önüne alınmalıdır (8-12).

## 2. Miseller

Miseller, lipozomlara benzeyen, ancak tek tabakalı olmaları ile ayrılan, lipid ya da polimer yapıda, boyutları 10 nm civarında olan sistemlerdir. Misellerin en önemli avantajları kolay elde edilebilmeleri, radyoaktif olarak işaretlenebilmeleri, hidrofilik ve hidrofobik gruplara sahip olmaları nedeniyle çözünürlüğü az olan vitaminler, enzimler, steroidler gibi etkin maddeleri çözünür hale getirerek emilimlerini arttırmalarıdır (5).

İlaç ve gen taşıma sistemi olarak kullanılan misellerin toksisiteilerine ilişkin çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Ancak, yapı olarak çok benzer olduklarından misellerin toksisitesinin lipozomlara benzer olduğu düşünülmektedir. Misellerin hücresel geçiş ve toksik potansiyelleri boyut, yapı ve yük durumlarına bağlı

olarak değişmektedir. Sıçanlarda polimerik yapıda farklı misel ve lipozomların damar içi yolla 7 gün süreyle uygulanarak tekrarlanan doz zehirlilikleri ve genotoksisitelerinin incelendiği bir çalışma sonunda her iki nano-taşıyıcı sistemin (lipozomlar ve miseller) düşük dozlarda toksik etkilere neden olmadığı, yüksek dozlarda ise muhtemelen katyonik yüzey yükleri nedeniyle çeşitli bozukluklar oluşturdukları görülmüştür. Aynı çalışmada genotoksisite testleri sonunda misellerin sadece en yüksek dozda (100 mg/kg, 48 saat) genotoksik olduğu bildirilmiştir (13). Benzer bir çalışmada, misel ve lipozomların insan akciğer (A-549) ve karaciğer (HepG2) hücre hatlarında doza bağlı olarak mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna, membran bütünlüğünün kaybolmasına ve oksidatif strese yol açtıkları görülmüş ancak bu etkilerin misellerde lipozomlara göre daha az olduğu tespit edilmiştir (8). Bunun yanında katyonik polimerik misellerin akciğer, karaciğer, böbrek gibi organlarda birikebildiği ama diğer misel tiplerine göre daha az toksik olduğu belirlenmiştir. Örneğin Costamagna ve ark. (2019), polietilen glikol ile kaplanan polimerize (p-DA-PEG) ve polimerize edilmemiş (DA-PEG) misellerin RAW 264.7 makrofaj hücre hattı üzerinde toksisitelerini incelemişler ve polimerik olmayan misellerin özellikle hücre zarında yüksek oranda birikip geçirgenliğini değiştirerek polimerik misellerden çok daha yüksek sitotoksisite gösterdiğini ortaya koymuşlardır (14). Soodvilai ve ark. (2019) ise polimerik misellerin silimarin'in biyoyararlanımını arttırdığını ve sisplatin'e bağlı böbrek hasarını azalttığını göstermişlerdir (15).

### 3. Katı Lipit Nanopartiküller

Katı lipit nanopartiküller (Solid-lipid nanoparticles, SLN), oda ve vücut sıcaklığında katı olan lipitlerden yapılmış ve yüzey aktif maddeler ile dengelenmiş parçacıklardır. Bu yapılar yüksek oranda saflaştırılmış trigliseritler, kompleks gliserol karışımları, hatta balmumundan oluşabilirler. SLN'ler parenteral uygulamalar için mükemmel fiziksel stabiliteye sahiptir ve bu sayede eklenen kararsız ilaçların

bozunmaya karşı korunması sağlanırken, ekleme modeline bağlı olarak kontrollü ilaç salınımı (hızlı veya uzun süreli), iyi tolere edilebilirlik ve hastaya özgü hedeflenme gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte yeterli düzeyde yükleme kapasitesinin olmaması, polimorfik geçiş sonrası ilaç atılımı ve dağılımda yüksek oranda su içeriğinin açığa çıkması (% 70-99.9) gibi dezavantajları gözlenmiştir. SLN'nin bu potansiyel zorluklarının üstesinden gelmek için nanoyapılı lipit taşıyıcılar (Nano lipid carriers, NLC) ve lipit ilaç konjugatları (Lipid-drug conjugates, LDC) gibi ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir (16).

SLN'lerin toksisitelerine ilişkin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar mevcuttur. Shahgaldian ve ark. (2003) ampifilik kaliks-aren türevi SLN'lerin insan eritrositleri üzerinde herhangi bir hemolitik etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (17). Buna karşın Silva ve ark. (2012), farklı orijinli ve surfaktan eklenmiş SLN'lerin toksisitelerini iki fibroblast hücre hattında (Vero ve MDCK) incelemiş ve 500 µg/mL maruziyet sonucunda özellikle vazelin ve tristearin içeren SLN'lerin oldukça yüksek toksisiteye sahip olduklarını belirlemişlerdir (18). Albuquerque ve ark. (2015) ise, romatoid artrit tedavisinde kullanılmak üzere metotreksat ve süperparamanyetik demir oksit'i SLN'ler ile kapsüle etmişler ve benzer şekilde THP-1 hücre hattında 500 µg/mL doza kadar hiçbir formülasyonun sitotoksisiteye neden olmadığını göstermişlerdir (19). Mendonça ve ark. (2019) suda çözünürlüğü düşük bileşiklerin ve aynı zamanda genetik materyallerin iletimi için oldukça elverişli olan katyonik katı lipit nanopartikülleri erkek Wistar sıçanlara damar içi yolla uygulamışlardır. Çalışma sonunda dalak, karaciğer, akciğer ve böbreklerde hafif ve geçici olarak (<72 saat) hematolojik, biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler belirlemişlerdir. Ayrıca kan- beyin bariyerine zarar vermeden beyin parenkim hücrelerinde katı lipit nanopartikül sayısında artış olduğu görülmüştür (20). SLN'lerin düşük toksisiteye sahip olduklarına dair çalışmalar da mevcut olmasına karşın farklı yüzey aktif maddelerle birlikte uygulanan SLN'lerin kullanılan yüzey aktif maddesine bağlı

olarak toksisitelerinin değişebileceğine dair yayınlar da bulunmaktadır (18). Sonuç olarak, literatürdeki farklı in vitro ve in vivo bulgular, SLN'lerin insan ve hayvanlarda ilaç salınım sistemi olarak kullanılmalarda sırasında dikkatli olunması gerektiğini göstermektedir (18-20).

#### 4. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller (PNP'ler), polikaprolakton, poliakrilamid ve poliakrilat gibi sentetik ve albümin gibi doğal polimerlerden oluşan, boyutları 10-100 nm olan yapılardır. Özellikle biyolojik olarak inert bir polimer olan polietilen glikol (PEG) nanopartiküllerin yüzeyine kovalent bağlanarak ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılır. PEG ile kaplamanın, antijenik özelliği azalttığı, retikuloendotelial sistem (RES) tarafından nanopartiküllerin fagositozunu sınırladığı, beyin, bağırsaklar ve böbrekler gibi organlarda kan düzeylerinde artışa yol açtığı bildirilmiştir. Bunun yanında FDA, insan kullanımı için polilaktik asit (PLA) ve polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) gibi biyolojik olarak parçalanabilir polimerik nanopartikülleri onaylamıştır (21).

PNP'lerin kolay sterilize edilebilmeleri, fizyolojik ortamda parçalanabilmeleri ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması, etkin madde yüklem kapasitelerinin yüksekliği ve bu sayede etkin maddenin hücre içi dağılımının artması, ağız yoluyla uygulandığında etkin maddenin biyoyararlanımının yüksek olması, çok uzun süre (günler, hatta haftalarca) kontrollü ilaç salınımına olanak vermesi, diğer kolloidal taşıyıcı sistemlerle kıyaslandığında biyolojik sıvılarda çok daha yüksek stabiliteye sahip olmaları, küçük partikül boyutları sayesinde küçük kapillerlere girişin ve hücreler tarafından tutulmasının mümkün olması, yüksek hedeflendirme yetenekleri sayesinde diğer doku ve organlarda toksik etkileri azaltması, parenteral yolla uygulanmalarının kolay olması ve üretim tekniklerinin genel olarak basit olması gibi önemli avantajları vardır (21).

PNP'lerin tek başlarına toksisitesine bakıldığında

in vitro ve in vivo denemelerde genel olarak güvenli maddeler olduğu görülmektedir. In vitro çalışmalar çok yüksek dozlara kadar farklı PNP'lerin sitotoksik, mutajenik ve genotoksik olmadıklarını göstermektedir (22, 23). Ritter ve ark. (2019) bakteriyel akciğer enfeksiyonlarına karşı yeni tedavi seçeneklerinden biri olan yeni antimikrobiyal peptitler ile birlikte kullanılan PNP'lerin antimikrobiyal peptitlerden kaynaklanan toksisiteyi azalttığını bildirmiştir (22). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda da PNP'lerin sadece normal kullanımda uygulanan dozların çok üstünde (PEG için ortalama 600 kat) ve parenteral yollarla verildiğinde toksik etkilere yol açtığı bildirilmektedir. Patolojik incelemelerde de organ ve hücre düzeyinde kayda değer bir fonksiyon bozukluğu belirlenmemiştir (23).

Sonuç olarak normal terapötik dozlarda özellikle PEG ve diğer PNP'lerin çok düşük toksisiteye sahip oldukları, ayrıca nanopartiküllerin PNP'ler ile kaplanması in vitro ve in vivo toksisiteyi önemli düzeyde azalttığı bildirilmektedir. Ancak, nanopartikül üretiminde proteinlerin kullanımında antijenik reaksiyonların oluşması gibi olumsuz sonuçlar meydana gelirken, biyobozunur olmayan sentetik polimerlerin kullanımında bu polimerlerin toksik olma potansiyeli önemli bir risk oluşturmaktadır. Bu nedenle PNP'lerin yüzeyleri genellikle kimyasal gruplar arasındaki immünolojik ve moleküler etkileşimleri azaltmak için non-iyonik yüzey aktif maddelerle kaplanmaktadır (21,23,24).

#### 5. Dendrimerler

“Dendrimer” ismi Yunancada ağaç anlamına gelen ‘dendron’ kelimesinden gelmektedir. Dendrimerler, çekirdek, çekirdek etrafındaki dallanma birimleri ve fonksiyonel grup olarak adlandırılan yüzey gruplarından oluşan polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Dendrimerlerin hem iç kısmındaki boşluğa hem de dallanmış yapılarındaki birçok fonksiyonel gruba ilaç bağlanması, kontrollü olarak salınması ve hedeflendirilmesi mümkündür. Bunun yanında dendrimer ilaç taşıma sistemleri küçük boyutları

sayesinde RES etkilerinden kurtulabilmektedir (25).

Dendrimerler tümör hücrelerine diğer küçük moleküllerden daha fazla permeabilite ve tutulma gösterebilirler. Bu yüzden genel olarak kanser tedavisinde ilaçların hedeflendirilmesinde kullanılmaktadırlar. Dendrimerik taşıyıcılar yaygın olarak doğrudan tümör dokusu içine veya sistemik olarak damar içi ya da diğer parenteral yollarla uygulanmaktadır. Uygun konjugasyon için bol miktarda primer amin ile aşırı yüklü yüzey grupları nedeniyle suda iyi çözünen poliamidoamin (PAMAM), ticari olarak temin edilebilen ve son yıllarda ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılan dendrimerdir. PAMAM gibi dendritik yapıya sahip olan polimerlerin, bağırsak epitelini geçebilmeleri nedeniyle oral uygulamalar için de umut vaat ettiği bildirilmektedir (25).

Dendrimerler, son derece önemli hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcıları olmakla birlikte toksisite potansiyeline sahip maddelerdir. Dendrimerlerin toksisitesi katyonik yüzeylerinin negatif yüklü biyolojik zarlarla etkileşime girmeleri ile ilişkilidir. Dendrimerler ve biyolojik zarlar arasındaki etkileşim sonucu zarın parçalanması, incilmesi ve erozyona uğraması gerçekleşebilir. Biyolojik sistemlerde dendrimer toksisitesi genellikle hemolitik toksisite, sitotoksikite ve hematolojik toksisite şeklinde ortaya çıkmaktadır. PAMAM, PPI (peanut protein isolate) ve PLL (poly-L-lysine) gibi dendrimerlerin bu tür etkileri aşağıda belirtildiği gibi in vitro denemelerde görülmesine rağmen bu yönde in vivo kanıt çok azdır (26).

Yapılan in vitro denemelerde dendrimerlerin çevresinde bulunan serbest amin gruplarının konsantrasyonuna ve oluşumuna bağlı toksisite rapor edilmiştir. Amin, guanidin, karboksil, sülfonat veya fosfonat gibi yüzey gruplarına sahip katyonik melamin dendrimerlerinin sitotoksikitesi değerlendirildiğinde; katyonik dendrimerlerin, anyonik veya PEG'lenmiş dendrimerlerden çok daha sitotoksik olduğu sonucuna varılmıştır. (26). PAMAM dendrimerlerinin in vitro hücre canlılığı üzerine etkisini ortaya koymak için yapılan

çalışmalarda serbest oksijen türlerinin (Radical Oxygen Species, ROS) oluşumu, lizozomal aktivitenin artması, apoptozun indüksiyonu ile DNA hasarı belirlenmiştir. Bu etkilerin mitokondride PAMAM dendrimerlerinin lokalizasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Ayrıca fotosentetik mikroorganizmalar (yeşil algler ve siyanobakteriler) üzerinde yapılan çalışmalarda dendrimerlerin jenerasyona ve partikül yüzey alanına bağlı olarak sitotoksikite gösterdiği rapor edilmiştir. Zebra balığı embriyosunda yapılan çalışmalarda ise dendrimerin yüzey gruplarından kaynaklanan toksisitenin, jenerasyona bağlı toksisiteden daha fazla ve önemli olduğu gösterilmiştir. PAMAM ve PPI-DAB dendrimerlerinin RAW 264.7 sıçan makrofaj hücre hattında doza bağlı sitotoksikite meydana getirdiği ve apoptozu indüklediği görülürken, fare fibroblast (NIH/3T3) ve fare karaciğer (BNL CL.2) hücre hatlarında apoptozu indüklediği belirlenmiştir (27).

Bu in vitro çalışmaların yanında sınırlı sayıda in vivo deneme mevcuttur. Zebra balığında (Danio rerio) yüzey amino gruplarına sahip katyonik PAMAM dendrimerlerin 24 saat inkübasyon sonrası % 100 ölüme neden olduğu, amino asit etanol yüzey gruplarına sahip nötr PAMAM dendrimerler ve süksinamik asit uç gruplarına sahip anyonik dendrimerlerin ise katyonik amin gruplu dendrimerlere göre daha az toksik olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında PAMAM dendrimerlerinin farelerde nazal maruziyetten sonra nöronal etkilere yol açabilecekleri öne sürülmüştür. Yine farelere farklı PAMAM tiplerinin farklı dozlarda tek ve 10 hafta süreyle uygulanması sonucunda, herhangi bir ağırlık kaybı ve davranış değişikliği görülmemiş, ancak bazı PAMAM tiplerinin değişik periyotlarda hayvanlarda ölüme ve karaciğer hücrelerinde çeşitli bozukluklara neden olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında PAMAM ve PEG'lenmiş PAMAM bileşiklerinin kısa süreli maruziyet sonucu deney hayvanlarında önemli değişikliklere neden olmadığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalardan elde edilen sonuçların doğrulanması için farklı doz ve sürelerde yapılmış daha detaylı denemelere ihtiyaç vardır (28).

Dendrimerlerden kaynaklanabilecek toksik etkilerin önlenmesi için biyoyumlu dendrimerlerin tasarlanması ve sentezlenmesi yoluna gidilmektedir. Bunun yanında dendrimerlerin çevresel yüklerinin PEG ile kaplanma, asetilasyon, karbonhidrat ve peptid bağlanması yoluyla nötralize edilmesi gibi uygulamalar toksisitenin azaltılmasında son derece yararlı olmaktadır (26). Bu konuda yapılan son çalışmalardan birinde Wang ve ark.(2020), yeni bir tiyoketal çekirdekli poliamidoamin dendrimeri (ROS-PAMAM) sentezlemişler ve yaygın olarak kullanılan polieterimid katyonik polimerler ile karşılaştırıldığında daha düşük sitotoksikite gösterdiğini bildirmişlerdir (27). Gorzkiewicz ve ark. (2020) ise iki yeni lizin bazlı dendritik makromolekülün (D3K2 ve D3G2) normal hücreler üzerinde önemli toksik etkiler göstermeden kanser hücre hattına karşı spesifik sitotoksikite gösterdiğini, bundan dolayı dendrimer nanopartiküllerin klinik uygulamaları için umut verici bir ilaç taşıma sistemi olduğunu belirtmişlerdir (29).

## 6. Karbon Nanotüpler

Karbon nanotüpler (Carbon nano tubes, CNT) uzunlukları 1-100 nm ve çapları 1 nm olan altıgen karbon atom ağlarıdır. Bugün kullanımda tek duvarlı ve çok duvarlı nanotüpler olmak üzere iki tip CNT bulunmaktadır. CNT'ler, mekanik, elektriksel ve yüzey özelliklerinden dolayı avantajlı sistemlerdir ve günümüzde otomobil imalatında, sprey boyalarda, plastik panellerde ve lityum iyon pillerde kullanılmaktadır. İğne benzeri şekillerinden ötürü zarlardan geçişleri kolaydır ve ilaç taşıma sistemi olarak da kullanılma potansiyelleri vardır. İlaçlar, CNT'lerin çekirdeğine dahil edilebilir veya kovalent olarak bağlanabilirler. İlaç uygulamaları için potansiyelleri umut verici olsa da canlıların bu bileşiklere toleransı bilinmemektedir ve aşağıda örnekleri görüleceği gibi çelişkili toksisite raporları bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda nanotüplerin akut toksiteye ve oksidatif stres yolu ile hücrelölüme neden olabildiği gösterilmiştir. Tek ve çok duvarlı nanotüplerin uzunluk ve şekillerine bağlı

olarak farklı toksik etkileri vardır ve organlarda farklı birikim özelliği gösterirler. CNT'lerin toksik etkilerine en duyarlı organlar böbrek, akciğer, deri ve konjunktivadır (30).

CNT'lerin belirtilen toksik etkilerine dair genellikle in vitro çalışmalar bulunmaktadır. Lee ve ark. (2019) farklı karboksillenmiş karbon materyallerin hücre döngüsü ve apoptoz mekanizmasına etkilerini incelemişlerdir. Nanopartiküllere maruz kalan insan H1299 akciğer kanser hücrelerinin canlılığında önemli bir değişiklik gözlemlenmemiş olsa da, yüksek konsantrasyonda (50 µg/mL) tek duvarlı CNT'lerin normal gelişim göstermeyen hücrelerin çoğalmasına ve G2 fazında duraksamaya neden olduğu görülmüştür (31). Nahle ve ark. (2018) tek duvarlı ve çok duvarlı CNT'lerin sıçan alveol makrofaj hücrelerindeki toksik etkisini araştırmışlardır. Tek duvarlı CNT'ler apoptozu ve bozulmuş mitokondriyal fonksiyonu indüklerken, çok duvarlı CNT'lerin inflamasyonu indüklediği gözlemlenmiş ve çok duvarlı CNT'lerin daha toksik olduğu belirlenmiştir (32). Siegrist ve ark. (2019), farklı tip çok duvarlı CNT'lerin insan akciğer epitel hücrelerinde (BEAS-2B ve SAEC) çeşitli genotoksik etkilere neden olduğunu bildirmiştir (33).

CNT'lerin hücre kültürlerinde belirtilen toksisitesinin amorf karbon ve metalik nanopartiküller içermelerinden kaynaklandığı ve CNT'lerin toksisitesinin çapları, fonksiyonlaştırılmaları için kullanılan maddeler, ortamdaki diğer toksik bileşenlere bağlı olarak değişebildiği bildirilmektedir. Zhao ve ark. (2019) insan umbilical ven endotel hücre hattında (HUVEC) ticari olarak elde edilen üç farklı çapta (çaplarına göre küçükten büyüğe doğru XFM4, XFM22 ve XFM34) CNT'lerin toksisitesini araştırmış ve en küçük çaplı CNT'nin daha toksik olduğu görülerek sitokinlerin salınması, monositlerin yapışması ve ROS seviyelerinde artışın sadece XFM4 kullanımdan sonra arttığı sonucuna varılmıştır (34). Requardt ve ark. (2019) da iki farklı çok duvarlı CNT'lerin in vitro toksisitesini A549 akciğer epitel ve HepG2 karaciğer hücre hatlarında incelemişler, doza ve maruziyet

süresine bağlı olarak laktat dehidrojenaz (LDH) düzeyinde artış, hücre zarının bütünlüğünde bozulma ve hücre döngüsünde durma gözlemlenmiştir. Bu çalışmada ısıtma işlemi görmüş çok duvarlı nano karbon tüplerin ısıtma işlemi görmemişlere kıyasla daha toksik olduğu belirlenmiştir (35).

Yapılan çalışmalarda CNT'lerin fonksiyonelleştirilmesinin de toksisitesini değiştirdiği, özellikle oksitlenmiş ve PEG'lenmiş CNT'lerin in vitro toksisitesinde azalma meydana geldiği ortaya konmuştur (36). Mohammadiana ve ark. (2019), havada bulunan önemli bir kirlenici olan benzo[a]piren (BaP) ile saf ve fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı CNT'lerin kombinasyon toksisitesini A549 akciğer hücre hattında araştırmışlar, CNT'lerin serbest oksijen radikali oluşumunu arttırdığını, ortamda BaP bulunmasının additif, sinerjistik ve antagonistik etkilere yol açabileceğini ve fonksiyonelleştirilmenin hem tek başına hem de kombine toksisiteyi azalttığını bulmuşlardır (37). Tian ve ark. (2020) ise kan proteinlerinin CNT'lere bağlanmasının hücreler arası etkileşim yollarını güçlü bir şekilde etkileyebileceği, sitotoksik etkilerini büyük ölçüde azaltabileceği ve böylece nanomalzemelerin biyouyumluluğunu artırabileceği hipotezi ile siğir serum albümini ile CNT'leri bağlamışlar ve bu bağlanma sonucunda CNT'lerin toksisitesinin HUVEC hücre hattında önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir (38).

CNT'lerin toksisitesine ait in vivo çalışmalar daha çok zebra balığı üzerinde yapılmış ve tek duvarlı CNT'lerin beyin dokusunda dopamin ve serotonin seviyelerinde 3 ila 6 kat oranında artış ve asetilkolin aktivitesinde önemli oranda azalmaya neden olduğu görülmüştür. Çok duvarlı CNT'lerin ise lokomotor aktivite, kalp atım hızında değişiklikler, davranış bozuklukları ve yüksek dozlarda embriyo ölümüne yol açtığı bildirilmiştir (39). Chowdhry ve ark. (2019) ise çok duvarlı CNT'lere karboksil ve amino gruplarının eklenmesinin zebra balıklarında oksidatif stresi azalttığını gözlemlenmiştir (40).

Pandey ve ark.(2020) mum isinden elde edilen karbon nanopartiküller ile karbon nanotüplerin toksisitesini *Drosophila melanogaster* larvaları üzerinde araştırmışlardır. Sonuçta organizmanın gelişiminde herhangi bir etki gözlenmezken, oksidatif stres parametrelerinin yükseldiği ve yalnızca yüksek dozlarda iç organlarda ve beyin gangliyonlarda çeşitli toksik etkiler meydana geldiği görülmüştür (41).

Semak ve ark. (2019) ise siğir serumu ile sulu çözeltisi hazırlanmış CNT'lerin kuşlardaki etkilerini incelemişlerdir. CNT'ler erkek Moskovskaya kuşlarında arka bacak ve pektoral kas içine enjekte edilmiş ve enjeksiyon bölgesinde lokal yangı oluştuğu, ancak bu yangının 100 gün sonra yapılan incelemede iyileştiği ve CNT'lerin kuşlar için görünürde önemli bir etki meydana getirmediği bildirilmiştir (42).

Knudsen ve ark. (2018), dişi C57BL/6N BomTac farelerde 11 iyi karakterize edilmiş çok duvarlı CNT'leri intratrakeal uyguladıktan 1 yıl sonra akciğer ve karaciğer dokusundaki histolojik değişiklikleri incelemişlerdir. İnce ve karmaşık çok duvarlı CNT'ler lenfositik agregat, granülom ve makrofaj infiltrasyonu oluşumunu indükleyerek akciğer yangısına neden olurken, kalın ve düz çok duvarlı CNT'lerin böyle bir etkisi gözlemlenmemiştir. Ayrıca akciğerlerde ve pleurada fibroz veya tümör oluşumu görülmemiş, ince ve karmaşık çok duvarlı CNT'lerin karaciğerde DNA zincir kopmalarına neden olduğu belirtilmiştir (43). CNT'ler ile ilgili tavşan, kobay ve gönüllü insanlarda yapılmış sınırlı sayıda diğer çalışmalarda ise CNT maruziyetinin cilt tahrişi veya alerji riski bulunmazken, güç solunum ve akciğer dokusunda çeşitli patolojilerin indüklenmesinde kritik rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca fonksiyonlaştırılmış CNT'lerin deney hayvanlarında akciğer hava yollarında yangı ve fibrotik reaksiyonlara neden olduğu rapor edilmiş ve bu etkinin tek veya çok duvarlı olup olmadıklarına göre değiştiği belirtilmiştir (44). Tek duvarlı CNT'lerin akut pulmoner toksisiteye, çok duvarlı CNT'lerin ise apoptozu belirleyen, ROS artışı, hücre döngüsü durması, mitokondriyal membran potansiyelindeki

düşüşe neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (44). Bütün bu çalışmaların aksine CNT'lerin toksik olmadığına, hatta çok duvarlı CNT'lere akut ve düşük dozlarda 6 ay boyunca sürekli maruziyetten sonra bile in vitro hücre ölümünü uyardıklarına dair yayınlar da bulunmaktadır (44).

## 7. Fullerenler

Fullerenler, CNT'lere benzeyen, ancak karbon sayıları farklı (28->100) küresel kafesler olarak tanımlanmaktadır. İlk olarak 1985 yılında sentezlenmiş fullerenlerin en yaygın formu 60 karbon atomu içeren C60'dır. Fullerenler birbirine bağlı karbon beşgenleri veya altıgenlerden oluşan futbol topuna benzeyen içi boş kürelerdir. Kimyasal olarak değiştirilmiş fullerenler nöroprotektif, antiviral, antibakteriyel, antitümoral, antiapoptik ve antioksidan maddeler için tek başlarına veya CNT'lere bağlanarak ilaç salınım sistemleri olarak kullanılmaktadır (45).

Saf C60'ın fare derisine topikal olarak akut ve subakut maruz bırakılmasının ardından, epidermiste toksik etki gözlenmediği rapor edilmiştir. Ayrıca su içinde süspansiyon C60'ın insan keratinosit hücre hattında herhangi bir akut toksisitesinin olmadığı bildirilmiştir. Escherichia coli PQ37 suşu kullanılarak in vitro ve Drosophila melanogaster larvalarının somatik hücreleri üzerinde yapılan in vivo çalışmalarda C60'ın mutajenik toksisitesi olmadığı da gözlemlenmiştir. Sonuç olarak yapılan çalışmalar saf C60'ın bakteri, mantar, insan lökositleri üzerinde ve ayrıca Drosophila'lar, fareler, sıçanlar ve kobaylarda akut veya subakut toksisiteye sahip olmadığını göstermiştir (45). Son yıllarda yapılan çalışmalar C60 nanopartiküllerin tedavi sırasında çok önemli toksik etkilere neden olan antineoplastik ilaçların toksisitesinin azaltılmasında da oldukça yararlı olduğunu göstermektedir. Elshater ve ark. (2020) sıçanlarda in-vivo olarak C60 nanopartiküllerin bir kemoterapötik ajan olan siklofosfamid'in hepaotoksitesine etkilerini incelemişlerdir. Siklofosfamid'e fulleren eklenmesi ile hematolojik parametreler, karaciğer enzimleri, oksidatif

stres ve antioksidan sistem parametreleri ile histopatolojik inceleme sonuçları göz önüne alınarak oluşan karaciğer toksisitesinin normalize edildiği görülmüştür. Böylece, fullerenin gelecekte toksik kemoterapötiklerin klinik uygulamalarında güvenli bir yol olacağı sonucuna varılmıştır(46).

Saf C60 toksik olmasa da, çeşitli işlemlere maruz bırakılarak modifiye edilmiş fullerenlerin toksisite potansiyeli vardır. Biby ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada, sulu çözeltilerde stabilitesinin artırılması için dekstran eklenen C60 moleküllerinin, C6 gliyal hücre hattında doza bağımlı olarak toksisitesinin arttığı görülmüştür. Bunun yanında, ışığa maruz kalma durumunda, oksijen şekillenmesi ile karanlıkta toksik olmayan C60 fulleren moleküllerinin, yüksek derecede toksik olabileceği ortaya konmuştur. Bu nedenle modifiye C60 fulleren molekülleri kullanımında ve çevreye salınımında son derece dikkatli olunması gerektiği belirtilmektedir (45,47).

## 8. Metalik Nanopartiküller

Metalik nanopartiküller, nano aralıktaki metal elementlerden oluşur. Metalik nanopartiküller küçük boyutları ve yüzey modifikasyonları nedeniyle, dolaşımda uzun süre kalabilirler ve öncelikli olarak tümör bölgelerini hedefleyerek etkili olabilirler. Ayrıca metalik nanopartiküllerin bir alt tipi olan manyetik nanopartiküller, manyetik rezonans görüntüleme için kontrast ajanlar olarak kullanılabilir. Metalik nanopartiküller içerisinde özellikle altın ve gümüş nanopartiküller ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bunların güvenlik ve etkinlikleri hala tartışılmaktadır (48).

### 8.1. Altın nanopartiküller

Altın nanopartiküller, sentezlerinin kolaylığı, kimyasal stabilite ve gelişmiş optik özellikleri nedeniyle bilimsel ve teknolojik anlamda umut verici inorganik nanomateryallerden birisidir. Altın nanopartiküllerin bu özellikleri onları kanser teşhis ve tedavisinde çekici hale getirmektedir. Bununla birlikte yaygın klinik uygulamadan önce altın



nanopartiküllerin toksisite riskini incelemek için artan sayıda çalışmalar, toksisitenin sentez yöntemlerine ve bunun sonucunda altın nanopartikül büyüklüğü, şekli, yüzey kimyası ve yüzey yüküne büyük ölçüde bağlı olduğunu göstermektedir (48).

Altın nanopartiküllerin boyuta (0.8-15 nm) bağlı toksisitesi dört farklı hücre hattında araştırılmış, test edilen en küçük nanopartiküllerden birinin (1.4 nm), 15 nm'ye kadar olan diğer altın nanopartiküllerle karşılaştırıldığında en yüksek toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir (49). Ayrıca, külçe altının buharlaştırılması ve öğütülmesiyle ortaya çıkan küresel altın nanopartiküllerin toksik olduğu ve daha küçük altın nanopartiküllerin interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü (TNF- $\alpha$ ) ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir (49). Yine yapılan çalışmalar CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) kaplı altın nanopartiküllerin küresel altın nanopartiküllerden ( $\approx$ 30 nm) HaCat (human keratinocyte cell line) hücre hattında daha toksik olduğunu göstermiştir (49,50). Akciğer fibroblastları üzerinde yapılan çalışmalarda ise 20 nm boyutunda altın nanopartiküllerin toksik olmadığı, ancak önemli miktarda oksidatif DNA hasarı oluşturduğu yönünde bulgular elde edilmiştir. Ayrıca dermal fibroblast hücre hattında altın nanopartiküller nedeniyle anormal aktin ve hücre dışı matriks oluştuğu tespit edilmiştir (49). Sıçanlarda yapılan deri çalışmalarında, daha küçük boyutlu altın nanoparçacıklarının derinin daha derin bölgesinde biriktiği, daha büyük parçacıkların ise çoğunlukla epidermis ve dermiste yoğunlaştığı gözlemlenmiştir (48,49). Son yapılan ilginç çalışmalardan birinde Barkur ve ark. (2020), 10-100 nm arasındaki farklı boyutlardaki altın ve gümüş nanopartiküllerin eritrositler ile etkileşimini Mikro-Raman spektroskopisi ile incelemiş ve her iki nanopartikülün boyuta bağlı olmaksızın hemoglobinin oksijen bağlamasını bozduğu ve gümüş nanopartiküllerin oksidatif strese yol açarak daha toksik olduğunu bildirmişlerdir (50).

Sentez metodunun altın nanopartiküllerin toksisitesini değiştiren önemli bir faktör olduğu

bildirilmektedir. Birçok çalışmada, çeşitli bitkiler, bal, propiyonik asit gibi biyolojik kaynaklardan ve yeşil sentez yöntemleri ile elde edilen altın nanopartiküllerin genel olarak sitrat gibi moleküllerden kimyasal sentez yoluyla elde edilen altın nanopartiküllere göre hem in vitro, hem de in vivo olarak daha güvenli olduğu rapor edilmiştir (51). Bu nedenle biyolojik ve yeşil sentez yoluyla elde edilen nanopartiküllerin daha düşük toksisiteye ve daha iyi biyouyumluluğa sahip olduğu düşünülse de Hernandez-Adame ve ark. (2019)'nın yaptığı çalışmada *Yarrowia lypolitica* D1 mayasından izole edilen  $\beta$ -D-glukanlar kullanılarak elde edilen altın nanopartiküllerin sitotoksitesisi fare dalak hücrelerinde araştırılmış ve beklenenin aksine  $\beta$ -D-glukan/altın nanopartikül kompleksinin oksidatif stresi arttırdığı ve toksik olduğu görülerek biyomedikal uygulamalar için uygun bir aday olmadığı sonucuna varılmıştır (52). Bailly ve ark. (2019) ise alternatif bir sentez yöntemi olarak sulu dekstran çözeltisinden lazer ablasyon yoluyla altın nanopartikülleri üretmişler ve farelere damar içi yolla uygulayarak dağılım, farmakokinetik ve güvenlik açısından değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda hayvanların vücut ağırlığında bir değişme görülmemiş, nanopartiküllerin çok hızlı dağılıp elimine edildiği ve özellikle karaciğer ve dalakta akümüle oldukları gözlenmiştir. Histopatolojik incelemelerde böbrek, dalak ve karaciğerde toksisite verilerine rastlanmamış ve lazer yardımıyla elde edilen nanopartiküllerin biyomedikal uygulamalar için yararlı olacağı belirtilmiştir (53).

Son yıllarda yapılan çalışmaların geneline bakıldığında altın nanopartiküllerin toksisitelerinin düşük olduğu kanısında varılmakta ise de özellikle yüksek dozlarda zebra balıklarında davranış değişikliklerine, genetik farklılıklara ve oral uygulama sonrası ratlarda hemen tüm organlarda histopatolojik değişikliklere yol açtığını bildiren yayınlar da vardır (54). Wang ve ark. (2019) ise altın nanopartikülleri BALB/c farelere 7 gün süreyle oral yolla vererek bağırsak mikrobiyotası üzerine etkileri incelemiş ve ilk 3 günde bir değişiklik gözlenmezken, 7. günde

bağırsak mikrobiyatasında önemli değişiklikler oluştuğu belirlenmiştir (55).

## 8.2. Gümüş nanopartiküller

Gümüş nanopartiküller, kozmetik ürünler, ayakkabılar, deterjanlar, diyet takviyeleri, solunum maskeleri, oyuncaklar, dizüstü bilgisayarları, su filtreleri gibi birçok üründe kullanılmaktadır. Gümüş nanopartiküller ayrıca, güçlü antibakteriyel etkileri nedeniyle tekstil, tıbbi cihazlar, kontraseptifler ve oda spreyi gibi ürünlerin içeriğinde de yer almaktadır. Bunların yanında, gümüş nanopartiküllerden yara ve yanıkların tedavisi amacıyla yararlanır. Gümüş genel olarak memelilerde toksik etkili bir madde değildir. Ancak gümüş elementine kronik mesleki maruziyetin deri, mukozolar ve konjunktivada renk değişikliği ile karakterize argyria (argrozis) bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir. Bu yüzden gümüş nanopartiküllerin canlılar üzerindeki etkileri dikkatle değerlendirilmelidir. Ayrıca, altın nanopartiküllerle kıyaslandığında özellikle oksidatif stres mekanizmaları aracılığıyla gümüş nanopartiküllerin daha toksik oldukları bildirilmektedir (49).

Gümüş nanopartiküllerin toksisitesini değerlendirmek için yapılan çalışmaların önemli bir bölümü diğer nano-taşıyıcılarda olduğu gibi in vitro denemelerdir. Sıçan karaciğer hücrelerinde gümüş nanopartiküllerin düşük dozlarda bile oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olduğu belirlenmiştir. Gümüş nanopartiküllerin ayrıca hücre zarının potasyum ve sodyum iyonlarına geçirgenliğinde değişiklikler meydana getirdiği bildirilmiştir. Gümüş nanopartiküllerin erkek üreme sistemi üzerinde ciddi toksik etkiler gösterdiği de bilinmektedir. Araştırmalar, gümüş nanopartiküllerin kan-testis bariyerini geçebileceğini ve sperm hücrelerini olumsuz etkileyerek testislerde birikebileceğini göstermektedir. Gümüş nanopartikülleri uygulanan akciğer hücre hattında boyuta bağlı toksisite meydana gelmiş ve 10 nm boyutundaki gümüş nanopartiküllerin daha büyük boyuttaki partiküllere göre daha toksik olduğu gösterilmiştir (56).

Gümüş nanopartiküllerle ilgili in vivo çalışmalarda, *Drosophila*'larda oksidatif strese; *Daphnia magna* üzerinde ise doza bağlı olarak çeşitli olumsuz etkilere yol açtıkları belirlenmiştir. Farelerde gümüş nanopartiküllerin oral toksisitesi üzerine yapılan az sayıdaki in vivo çalışma hedef organın karaciğer olduğunu göstermiştir. Ayrıca, gümüş nanopartiküllerin farelerde oral yolla kullanımının mikrovillusların tahrip olması nedeniyle ince bağırsak mukozasının işlevinin engellenmesine neden olduğu bildirilmiştir (56). Mozafari ve ark. (2019) oral yolla uygulanan gümüş nanopartiküllerin farelerde gebelik üzerine etkilerini incelemişler ve 1 mg/kg/gün dozda 7 ve 14 gün süreyle uygulanan gümüş nanopartiküllerin fetal vücut kitle indeksinde azalma, fetüslerin büyümesinde kısıtlanma, fetüslarda eksansefal, baş, toraks ve gövdede anormalliklere ve orta beyinde fibroz ve nekroza neden olduklarını ortaya koymuşlardır (57).

## 9. Kuantum Noktaları

Kuantum noktaları (Quantum dots, QD), 2-10 nm boyutlarındaki yarı iletken kristallerdir. QD'ler çok küçük boyutlara sahip olması ve yüksek parlaklık, fotostabilite, ayarlanabilir emisyon spektrumu ve fonksiyonel gruplara bağlandığında spesifik biyoaktivite gibi benzersiz fotokimyasal ve fotofiziksel özelliklere sahip olduklarından birçok kullanım alanına sahiptirler. QD'ler biyomedikal sahada görüntülemelerde kontrast madde ve özellikle küçük moleküllü hidrofobik ilaçlar için taşıma sistemi olarak kullanılmaktadır (58).

Yaygın kullanımları nedeniyle QD'lerin toksisitelerinin incelenmesi önem taşımaktadır. QD çekirdeği kadmiyum içermektedir ve toksik etkileri genellikle kadmiyum ile ilişkilendirilmektedir (59). Sıçan hepatositleriyle inkübe edilen QD'lerin yüzey oksidasyonu yoluyla kadmiyumu serbest bıraktığını ve partikül çekirdeklerinin biyolojik ortamda bozunabileceği ortaya çıkarılmıştır (59). Sıçan feokromositoma hücrelerinde (PC12) 1 µg/mL konsantrasyonda QD'lerin sitotoksik olduğu ve kromatin

yoğunlaşması ile membran parçalanması dahil olmak üzere apoptoz benzeri hücre ölümünün indüklediği gösterilmiştir. Bunun yanında, keratinositlerin QD'lere maruz bırakılması ile IL-1b, IL-6 ve IL-8'in önemli ölçüde arttığı ve buna bağlı deri üzerinde toksisite olduğu ortaya konmuştur (59). Ayrıca kadmiyumlu QD'lerin fare mikrogliya hücrelerinde (BV2) DNA hasarını indüklediği belirlenmiş, ancak bu değişikliklerin ekzojeni azaltılmış glutasyon uygulamasıyla tersine çevrilebildiği bildirilmiştir. Çinko ve kadmiyum ile kaplı QD'lerin toksisitesi zebra balığı üzerinde tek tek ve kombine halde incelenmiş ve QD'lerde bulunan çinko ve kadmiyumun balıklarda biriktiği ve kombinasyon uygulamasının oksidatif stres enzimlerini ve ısı şok proteinlerini (HSP70) artırarak daha yüksek toksisiteye neden olduğu belirlenmiştir (60).

Kadmiyum yerine farklı metallerle birleşim halindeki QD'lerle yapılan çalışmalarda, mangan bağlanmış çinko sülfür QD nedeniyle 6-8 haftalık erkek BALB/c farelerde hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde dozdan bağımsız olarak değişiklikler meydana geldiği, ancak organ işleyişinde ve histopatolojisinde bozukluk olmadığı belirlenmiştir (61). PEGlenmiş bakır indiyum sülfür ve çinko sülfür QD'lerin DC2.4 (fare dendritik) hücre hattında ve BALB/c farelerde immunotoksitesini araştırılmış ve QD'lerin in vitro çeşitli değişikliklere neden olmasına rağmen in vivo toksisite saptanmamıştır (62). Aynı şekilde Singh ve ark. (2018), biyomedikal görüntüleme alanında yaygın olarak kullanılan azotlu karbon QD'lerin insan serviks kanser hücre hattında (HeLa) ve Swiss albino farelerde herhangi bir toksik etkiye yol açmadıklarını rapor etmiştir (63).

#### 10. Metal Oksit Nanopartiküller

Metal oksitler, kimya, fizik ve malzeme bilimlerinin birçok alanında önemli rol oynayan maddelerdir. Metal oksit nanoparçacıkları kozmetik ürünlerde, farmasötik preparatlarda ve gıdalarda renklendirici olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Metal oksit nanopartiküller, ilaçlar ve görüntüleme ajanları için

taşıma sistemi olarak da kullanılmaktadır. Metal oksitler içerisinde en yaygın olarak kullanılanlar titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>) ve çinko oksit (ZnO)'dir. Bu iki madde birçok ilaç, kozmetik ürün, UV kaynaklı cilt hasarına karşı güneş koruyucuları ve gıdaların içerisinde opaklık ve beyazlık sağlamak amacıyla yer almaktadır (48).

Genellikle stabil ve biyoyumlu olarak kabul edilen bu maddelerin toksisiteleri ile ilgili tartışmalar uzun süredir devam etmektedir. Bu çözünür olmayan metal oksit nanopartiküllerin neden olduğu potansiyel sitotoksikite mekanizması hala tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda bu nanopartiküllerin immunotoksikite ve genotoksikiteyi indüklediği belirtilmiştir (28,30). Yapılan araştırmalarda bu nanopartiküllerin fototoksikiteye neden olduğu ve oluşan fototoksikite ile partikül boyutu arasında karşılıklı bir ilişki olduğunu görülmüştür. UV ışığı ile fotoaktivasyondan sonra 10 nm boyuttaki TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin hücrelerin mortalitesinin, daha büyük partiküllere (20 ve 100 nm ) kıyasla daha fazla artırdığı ortaya konmuştur (48). TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin fototoksik etkilerini değerlendirmek için zebra balığında birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonunda TiO<sub>2</sub> maruziyetinin fototoksik etkisini oksidatif hasar yoluyla meydana getirdiği, kuluçka randımanı, canlılık ve malformasyon oranını etkilemezken larvaların yüzme parametrelerinde değişikliğe neden olduğu, kan-beyin bariyerini kolayca geçerek nörotoksikite oluşturduğu ve subkronik maruziyette üreme bozukluklarına neden olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, 100 nm'den küçük olan TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerinin farklı insan ve hayvan hücre hatlarında apoptotik hücre ölümünü tetiklediği, büyüklüğe bağlı keratinosit hücre hattında hücre ölümü mekanizmasını etkilediği ve büyüklükten bağımsız bir şekilde nekroz oluşturduğu gösterilmiştir (64).

Metal oksit nanopartiküllerin toksisitelerinin önemli araçlarından biri oksidatif strestir. Yapılan birçok çalışmada TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin balıklarda, farelerde ve sıçanlarda ROS oluşumunu indüklediği

ve oksidatif stres parametrelerinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin memelilerde lipit, karbonhidrat ve protein metabolizmasına zarar verdiği gösterilmiştir. Ayrıca hücre dışına aşırı glutamat salınımına yol açarak nöronal disfonksiyona ve nörodejeneratif hastalıklara neden olabileceği bildirilmiştir. TiO<sub>2</sub> maruziyeti, karaciğerde detoksifikasyon tepkimelerinde çok önemli bir rolü olan glutatyon seviyesinde azalmaya neden olabilmektedir. Yapılan diğer toksisite çalışmalarında TiO<sub>2</sub>'in erkek C5Bl/6 farelerine 8 hafta süreyle 2 mg/kg dozlarda orofaringeal aspirasyon yoluyla uygulanması sonrasında akciğerde yangı, BEAS-2B akciğer normal hücrelerinde pulmoner toksisite, erkek Wistar sıçanlarda böbreklerde üre ve ürik asit seviyelerinde değişiklikler ve ICR farelerde WBC (beyaz kan hücresi) sayısında artışa neden olduğu görülmüştür (65,66).

ZnO partikülleri ile yapılan çalışmalara bakıldığında, Franz tipi difüzyon hücreleri kullanarak deri üzerindeki etkilerinin elektron mikroskobu ile incelenmesi sonucunda, alt stratum corneum ve epidermiste ZnO parçalarına rastlanmamış, bu partiküllerin deriyi çok az miktarda geçebildiği saptanmıştır (65,66). Zebra balığında yapılan çalışmalar ZnO nanopartiküllerin kuluçka geriliği, mortalitede artış ve ROS oluşumuna neden olduğunu göstermiş, kitosan ve PEG ile kaplamanın bu etkileri azalttığı bildirilmiştir. ROS artışı hücre kültürü çalışmalarında da görülmüş ve çeşitli hücre hatlarında sitotoksikite rapor edilmiştir. ZnO nanopartiküllerin foto-genotoksik potansiyeli ise, hamster yumurtalık hücre hattında incelenmiş ve ZnO nanopartiküllerinin, eş zamanlı olarak radyasyon öncesi ve UV ışınlama koşulları altında uygulandığında kromozomal sapmalara ve klastojenisiteye neden olabileceği gösterilmiştir (65). Yousef ve ark.(2019) alüminyum ve çinko oksit nanopartiküllerin erkek Wistar sıçanların subkronik maruziyetinden sonra karaciğer ve böbrek toksisitesine neden olduğunu göstermiştir. Her iki nanopartikülün birlikte kullanılması ise sinerjistik etkilere neden olmuştur (66). Bu toksisite

verilerine karşın, Hassan ve ark. (2019) birçok alanda yaygın olarak kullanılan ve Sınıf IIB karsinojen bir madde olan potasyum bromat (PB)'ın sıçanlarda oluşturduğu zararlı etkilerin ZnO nanopartiküller ile azaltılabileceğini ortaya koymuşlardır (67).

## SONUÇ

Hayatımızın her alanına büyük bir hızla girmekte olan nanopartiküllerin özellikle ilaç salınım sistemlerinde kullanılması, kanser başta olmak üzere birçok hastalık için umut verici sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır. Yaygın kullanımlarına karşın nanopartiküllerin toksik etki mekanizmaları halen tam olarak bilinmemektedir. Yapılan birçok çalışmada nanomateriyallerin toksisitesi fizikokimyasal özelliklerine yani küçük boyutlarına ve yüzey alanına bağlanmaktadır. Bu nedenle geleneksel toksikolojiden farklı olarak, belirli bir nanopartikülün güvenlik/toksisite değerlendirmesi, o nanopartikülün biyolojik etkilerinin yalnızca kimyasal içeriği esas alınarak değil, aynı zamanda büyüklüğü, yüzey yapısı, şekli vb. özellikleri ile birlikte incelenmek durumundadır (4,6,11).

Bu veriler ışığında özellikle insan ve hayvanlarda ilaç taşıma sistemleri, görüntüleme vb. medikal uygulamalar için kullanılacak nanopartiküllerin toksik etkilerinin göz önüne alınması ve son derece dikkatli olunması gerektiği ortadadır. Hali hazırda nanopartiküllere ilişkin elde edilen toksisite verilerinin önemli bir kısmı in vitro deneme sonuçlarına dayanmakta ve birbiri ile çelişen birçok yayın bulunmaktadır. In vitro çalışmalar, ilaçların etkilerinin ve güvenliklerinin değerlendirilmesinde ilk basamak olmaları, standardize ve valide edilmiş in vitro çalışmaların çok önemli veri kaynağı olmaları ve deney hayvanı kullanımının azaltılması yönünde çok önemli bir role sahip olmalarına rağmen organizmayı tam olarak temsil etmediklerinden elde edilen sonuçların in vivo denemeler ile doğrulanması gerekmektedir. Bu nedenle, nanopartiküllerin yerel ve sistemik toksisite mekanizmaları ile toksikokinetiklerine ilişkin geniş kapsamlı in vivo çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

1. Tüylek Z. İlaç taşıyıcı sistemler ve nanoteknolojik etkileşim. *Bozok Tıp Derg*, 2017; 7(3): 89-98.
2. Lamprecht A. *Nanotherapeutics: Drug Delivery Concepts in Nanoscience*. Singapore: Pan Stanford, 2016.
3. Yavuz O, Marangoz Ö. Farmakoloji ve toksikolojide in siliko yöntemlerin kullanımı. In: Güvenç D, ed. *İlaç Araştırma, Geliştirme ve Toksikolojik Çalışmalarda Kullanılan Alternatif Yöntemler*, 1. Baskı. Ankara. Türkiye Klinikleri, 2018: 35-42.
4. Marangoz Ö. Nano ilaç ve nano ilaç taşıma sistemleri. *Doktora Semineri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 2018.
5. Vural GU, Özer AY. Nükleer tıpta ilaç taşıyıcı sistemler ve teranostik kullanımları. *Nükleer Tıp Seminerleri*, 2015; (2): 109-19.
6. Sayiner Ö, Çomoğlu T. Nanotaşıyıcı sistemlerde hedeflendirme. *Ankara Ecz Fak Derg*, 2016; 40(3): 62-79.
7. Bhargav E, Madhuri N, Ramesh K, Anand M, Ravi V. Targeted drug delivery-A review. *World J Pharm Pharm Sci*, 2013; 3(1): 150-9.
8. Roursgaard M, Knudsen KB, Northeved H, Persson M, Christensen T, Kumar PE et.al. In vitro toxicity of cationic micelles and liposomes in cultured human hepatocyte (HepG2) and lung epithelial (A549) cell lines. *Toxicology in Vitro*, 2016; 36: 164-71.
9. Yin X, Luo L, Li W, Yang J, Zhu C, Jiang M et.al. A cabazitaxel liposome for increased solubility, enhanced antitumor effect and reduced systemic toxicity. *Asian J Pharm Sci*, 2019; 14(6): 658-67.
10. Pippa N, Stangel C, Kastanas I, Triantafyllopoulou E, Naziris N, Stellas D et.al. Carbon nanohorn/ liposome systems: Preformulation, design and in vitro toxicity studies. *Materials Sci Engin C*, 2019; 105: 110114.
11. Abud MB, Louzada RN, Isaac DLC, Souza LG, Dos Reis RG, Lima EM et.al. In vivo and in vitro toxicity evaluation of liposome-encapsulated sirolimus. *Intern J Retina Vitreous*, 2019; 5(1): 35.
12. Zhang Y, Li N, Suh H, Irvine DJ. Nanoparticle anchoring targets immune agonists to tumors enabling anti-cancer immunity without systemic toxicity. *Nature Commun*, 2018; 9(1): 1-15.
13. Knudsen KB, Northeved H, Kumar PE, Permin A, Gjetting T, Andresen TL et al. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. *Nanomed*, 2015; 11(2): 467-77.
14. Costamagna F, Hillaireau H, Vergnaud-Gauduchon J, Jamgotchian L, Loreau O, Denis S et.al. Nanotoxicology at the particle/micelle frontier: Influence of core-polymerization on the intracellular distribution, cytotoxicity and genotoxicity of polydiacetylene micelles. *Nanoscale*, 2020; 12: 2452-63.
15. Soodvilai S, Tipparos W, Rangsimawong W, Patrojanasophon P, Soodvilai S, Sajomsang W et.al. Effects of silymarin-loaded amphiphilic chitosan polymeric micelles on the renal toxicity and anticancer activity of cisplatin. *Pharm Develop Technol*, 2019; 24(8): 927-34.
16. Patil P, Harak K, Saudagar R. The solid lipid nanoparticles, a review. *JDDT*, 2019; 9(3): 525-30.
17. Patrick S, Eric DS, Anthony WC. A first approach to the study of calixarene solid lipid nanoparticle (SLN) toxicity. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2003; 46(3-4): 175-7.

18. Silva AH, Filippin-Monteiro FB, Mattei B, Zanetti-Ramos BG, Creczynski-Pasa TB. In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles. *Sci Total Environ*, 2012; 432: 382-8.
19. Albuquerque J, Moura CC, Sarmiento B, Reis S. Solid lipid nanoparticles: A potential multifunctional approach towards rheumatoid arthritis theranostics. *Molecules*, 2015; 20(6): 11103-18.
20. Mendonça MCP, Radaic A, Garcia-Fossa F, Da Cruz-Höfling MA, Vinolo MAR, De Jesus MB. The in vivo toxicological profile of cationic solid lipid nanoparticles. *Drug Deliver Translation Res*, 2020; 10(1): 34-42.
21. Derman S, Kızılbey K, Akdeste ZM. Polymeric nanoparticles. *Sigma*, 2013; 31: 107-20.
22. Ritter D, Knebel J, Niehof M, Loinaz I, Marradi M, Gracia R et.al. In vitro inhalation cytotoxicity testing of therapeutic nanosystems for pulmonary infection. *Toxicol in Vitro*, 2020; 63: 104714.
23. Yıldırım L, Thanh N, Loizidoua M, Seifalian MA. Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. *Nano Today*, 2011; (6): 585-607.
24. Hering I, Eilebrecht E, Parnham MJ, Günday-Türel N, Türel AE, Weiler M et.al. Evaluation of potential environmental toxicity of polymeric nanomaterials and surfactants. *EnvironToxicol Pharmacol*, 2020; 76: 103353.
25. Karabulut B, Kerimoğlu O, Uğurlu T. Dendrimerler-ilaç taşıyıcı sistemler. *MÜSBED*, 2015; 1(1): 31-40.
26. Jain K, Kesharwani P, Gupta U, Jain NK. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int J Pharm*, 2010; 394(1-2): 122-42.
27. Wang Y, Li C, Du L, Liu Y. A reactive oxygen species-responsive dendrimer with low cytotoxicity for efficient and targeted gene delivery. *Chine Chem Lett*, 2020; 31(1): 275-80.
28. Jain K, Mehra NK, Jain NK. Nanotechnology in drug delivery: Safety and toxicity issues. *Curr Pharm Des*, 2015; 21(29): 4252-61.
29. Gorzkiewicz M, Konopka M, Janaszewska A, Tarasenko II, Sheveleva NN, Gajek A et.al. Application of new lysine-based peptide dendrimers D3K2 and D3G2 for gene delivery: Specific cytotoxicity to cancer cells and transfection in vitro. *Bioorganic Chem*, 2020; 95: 103-504.
30. Monterio-Riviere NA, Tran CL. *Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects*. New York: Informa Healthcare, 2007.
31. Lee KC, Lo PY, Lee GY, Zheng JH, Cho EC. Carboxylated carbon nanomaterials in cell cycle and apoptotic cell death regulation. *J Biotechnol*, 2019; 296: 14-21.
32. Nahle S, Safar R, Grandemange S, Foliguet B, Lovera-Leroux M, Doumandji Z et.al. Single wall and multiwall carbon nanotubes induce different toxicological responses in rat alveolar macrophages. *J App Toxicol*, 2019; 39(5): 764-72.
33. Siegrist KJ, Reynolds SH, Porter DW, Mercer RR, Bauer AK, Lowry D, Salisbury JL. Mitsui-7, heat-treated, and nitrogen-doped multi-walled carbon nanotubes elicit genotoxicity in human lung epithelial cells. *Particle Fibre Toxicol*, 2019; 16(1): 36.
34. Zhao X, Chang S, Long J, Li J, Li X, Cao Y. The toxicity of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) to human endothelial cells: The influence of diameters of MWCNTs. *Food Chem Toxicol*, 2019; 126: 169-77.
35. Requardt H, Braun A, Steinberg P, Hampel S, Hansen T. Surface defects reduce carbon nanotube toxicity in vitro. *Toxicol in Vitro*, 2019; 60: 12-8.
36. Liu Y, Jiang H, Liu C, Ge Y, Wang L, Zhang B et.al. Influence of functional groups on toxicity of carbon nanomaterials. *Atmosph Chem Physics*, 2019; 19(12): 8175-87.

37. Mohammadian Y, Rezazadeh Azari M, Peirovi H, Khodaghali F, Pourahmad J, Omidi M et.al. Combined toxicity of multi-walled carbon nanotubes and benzo [a] pyrene in human epithelial lung cells. *Toxin Rev*, 2019; 38(3): 212-22.
38. Tian R, Long X, Yang Z, Lu N, Peng YY. Formation of a bovine serum albumin diligand complex with rutin and single-walled carbon nanotubes for the reduction of cytotoxicity. *Biophysic Chem*, 2020; 256: 106268.
39. Falinski MM, Garland MA, Hashmi SM, Tanguay RL, Zimmerman JB. Establishing structure-property-hazard relationships for multi-walled carbon nanotubes: The role of aggregation, surface charge, and oxidative stress on embryonic zebrafish mortality. *Carbon*, 2019; 155: 587-600.
40. Chowdhry A, Kaur J, Khatri M, Puri V, Tuli R, Puri S. Characterization of functionalized multiwalled carbon nanotubes and comparison of their cellular toxicity between HEK 293 cells and zebra fish in vivo. *Heliyon*, 2019; 5(10): 02605.
41. Pandey H, Saini S, Singh SP, Gautam NK, Singh S. Candle soot derived carbon nanoparticles: An assessment of cellular and progressive toxicity using *Drosophila melanogaster* model. *Compar Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol*, 2020; 228: 108646.
42. Semak AE, Cherepanova NG, Komarchev AS, Ichkitidze LP, Sokolova DK. Toxicity Study of Solid Carbon Nanotube-Based Composites. In: 2019 IEEE Conference of Russian Young Researchers in Electrical and Electronic Engineering, 2019; 2272-4.
43. Knudsen K. B, Berthing T, Jackson P, Poulsen SS, Mortensen A, Jacobsen NR et. al. Physicochemical predictors of multi-walled carbon nanotube-induced pulmonary histopathology and toxicity one year after pulmonary deposition of 11 different multi-walled carbon nanotubes in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2019; 124(2): 211-27.
44. Khalid P, Hussain MA, Suman VB, Arun AB. Toxicology of carbon nanotubes-A review. *Int J Appl Eng Res*, 2016; 11(1): 148-57.
45. Kolosnjaj TJ, Baati T, Szwarc H, Moussa F. Toxicity studies of [60] fullerene and carbon nanotubes: State of the art. In: D'Souza F, Kadish KM, eds. *Handbook of Carbon Nano Materials*. Singapore. World Sci, 2012; 49-75.
46. Namadr F, Bahrami F, Bahari Z, Ghanbari B, Shahyad S, Mohammadi MT. Fullerene C60 nanoparticles decrease liver oxidative stress through increment of liver antioxidant capacity in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Reactive Oxygen Species*, 2020; 9(26): 70-80.
47. Biby TE, Prajitha N, Ashtami J, Sakthikumar D, Maekawa T, Mohanan PV. Toxicity of dextran stabilized fullerene C60 against C6 Glial cells. *Brain Res Bull*, 2020; 155: 191-201.
48. Fard JK, Jafari S, Eghbal MA. A review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. *Adv Pharm Bull*, 2015; 5(4): 447-54.
49. Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review. *Arch Toxicol*, 2013; 87(7): 1181-200.
50. Barkur S, Lukose J, Chidangil S. Probing nanoparticle-cell interaction using Micro-Raman Spectroscopy: Silver and gold nanoparticle-induced stress effects on optically trapped live red blood cells. *ACS Omega*, 2020; 5(3): 1439-47.
51. Selvaraj T, Thirunavukkarasu A, Rathnavelu SM, Kasivelu G. In Vivo non-toxicity of gold nanoparticles on wistar rats. *J Cluster Sci*, 2019; 30(2): 513-19.
52. Hernandez-Adame L, Angulo C, Delgado K, Schiavone M, Castex M, Palestino G et.al. Biosynthesis of B-d-glucan-gold nanoparticles, cytotoxicity and oxidative stress in mouse splenocytes. *Intern J Biol Macromol*, 2019; 13:, 379-89.
53. Bailly AL, Correard F, Popov A, Tselikov G, Chaspoul F, Appay R et.al. In vivo evaluation of safety, biodistribution and pharmacokinetics of laser-synthesized gold nanoparticles. *Sci Reports*, 2019; 9(1): 1-12.

54. Elbehiry A, Al-Dubaib M, Marzouk E, Moussa I. Antibacterial effects and resistance induction of silver and gold nanoparticles against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis and the potential toxicity in rats. *Microbiol Open*, 2019; 8(4): e00698.
55. Wang L, Zhang C, Zhi X, Hou W, Li T, Pan S, Cui D. Impact of short-term exposure of AuNCs on the gut microbiota of BALB/c mice. *J Biomed Nanotec*, 2019; 15(4): 779-89.
56. Sukumaran P, Eldho KP. Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett*, 2012; 2(1): 32.
57. Mozafari M, Khoradmehr A, Danafar A, Miresmaeili M, Kalantar SM. Toxic effects of maternal exposure to silver nanoparticles on mice fetal development during pregnancy. *Birth Defects Res*, 2020; 112(1): 81-92.
58. Giovanni L, Emilia G, Annarita F, Rosa C, Elisabetta A, Marco G. Toxicity effects of functionalized quantum dots, gold and polystyrene nanoparticles on target aquatic biological models: A review. *Molecules*, 2017; 22(9): 1439.
59. Rzigalinski BA, Strobl JS. Cadmium-containing nanoparticles: Perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009; 238(3): 280-8.
60. Matos B, Martins M, Samamed AC, Sousa D, Ferreira I, Diniz MS. Toxicity evaluation of quantum dots (ZnS and CdS) singly and combined in zebrafish (*Danio rerio*). *Intern J Environ Res Public Health*, 2020; 17(1): 232.
61. Yang Y, Lv S, Wang F, An Y, Fang N, Zhang W et.al. Toxicity and serum metabolomics investigation of Mn-doped ZnS quantum dots in mice. *Intern J Nanomed*, 2019; 14: 6297.
62. Chen T, Li L, Lin X, Yang Z, Zou W, Chen Y et.al. In vitro and in vivo immunotoxicity of PEGylated Cd-free CuInS<sub>2</sub>/ZnS quantum dots. *Nanotoxicol*, 2020; 1-16.
63. Singh V, Kashyap S, Yadav U, Srivastava A, Singh AV, Singh RK et.al. Nitrogen doped carbon quantum dots demonstrate no toxicity under in vitro conditions in a cervical cell line and in vivo in Swiss albino mice. *Toxicol Res*, 2019; 8(3): 395-406.
64. Bai C, Tang M. Toxicological study of metal and metal oxide nanoparticles in zebrafish. *J App Toxicol*, 2020; 40(1): 37-63.
65. Hou J, Wang L, Wang C, Zhang S, Liu H, Li S, Wang X. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *J Environ Sci*, 2019; 75: 40-53.
66. Yousef MI, Mutar TF, Kamel MAE. Hepatorenal toxicity of oral sub-chronic exposure to aluminum oxide and/or zinc oxide nanoparticles in rats. *Toxicol Reports*, 2019; 6: 336-46.
67. Hassan I, Husain FM, Khan RA, Ebaid H, Al-Tamimi J, Alhazza IM et.al. Ameliorative effect of zinc oxide nanoparticles against potassium bromate-mediated toxicity in Swiss albino rats. *Environ Sci Pollut Res*, 2019; 26(10): 9966-80.



<b>A</b>		BEYHUN NE. ....	2/195	<b>E</b>	
AÇIKGÖZ ZC. ....	1/15	BOZLU G. ....	2/185	EKİNCİ-AKDEMİR FN.	4/467
AHMADİ AA. ....	4/381	BULUT YE. ....	3/269	ENDER L. ....	3/269
AKÇA E. ....	2/167	<b>C - Ç</b>		ERAÇ B. ....	3/367
AKDOĞAN D. ....	2/217	CEYLAN A. ....	1/79	ERASLAN E. ....	4/467
AKIN AT. ....	3/333-4/459	CEYLAN T. ....	4/459	ERKEK S. ....	1/41
AKPINAR O. ....	2/217	COMBA A. ....	4/441	ERKMEN N. ....	2/179
AKSOY A. ....	1/3-3/319	COMBA B. ....	4/441	ERTEK M. ....	1/25
AKTAŞ E. ....	3/281	CÖMERT AKSU M. ....	2/139	ERYILMAZ M. ....	3/311
AKYILDIZ F. ....	3/343	ÇAKIR İ. ....	4/399	ETİZ P. ....	1/69
AKYÜZ E. ....	1/51	ÇAKMAK D. ....	3/269	<b>G</b>	
ALTINDİŞ M. ....	1/33-1/123	ÇALIŞKAN A. ....	4/487	GELBAL S. ....	1/97
ALTUNAY K. ....	3/269	ÇAN G. ....	2/195	GENÇ-BAHÇE Y. ....	1/3
ALTUNEL E. ....	4/381	ÇANKAYA S. ....	2/195	GEZER C. ....	2/155
ARDIÇ M. ....	4/399	ÇEKEN S. ....	1/25	GÖÇMEN AY. ....	1/51
ARDIÇOĞLU-AKIŞIN NY.	4/431	ÇELİK İ. ....	2/243	GÖÇMEN JS. ....	4/431
ARSLAN A. ....	3/301-4/381	ÇETİN Ş. ....	2/243	GÖRKEM Ü. ....	2/253
ARSLAN S. ....	2/253	ÇETİNKAYA N. ....	3/301	GÖZALAN A. ....	1/15
ARSLAN-AKVERAN G.	4/441	ÇÖPLÜ N. ....	1/15	GÜL H. ....	3/269
ASLAN R. ....	2/179	<b>D</b>		GÜLBUDAK H. ....	2/185
AŞÇI-TORAMAN Z. ....	2/179	DEĞERLİ S. ....	3/343	GÜLEGEN EC. ....	3/269
ATALAY B. ....	4/431	DELİALİOĞLU N. ....	2/185	GÜLER MC. ....	4/467
AYDEMİR Ö. ....	1/33	DEMİRKASIMOĞLU M.	3/269	GÜLÜM M. ....	3/269
AYDIN F. ....	4/399	DENİZ S. ....	2/139	GÜNAY E. ....	2/149
AYDIN-ACAR Ç. ....	1/107	DİKMEN D. ....	4/497	GÜNDÜZ M. ....	4/477
AYDOĞMUŞ A. ....	3/269	DİZMAN G. ....	4/493	GÜNEŞ İS. ....	4/381
AYHANCİ T. ....	1/123	DOĞANYİĞİT İ. ....	3/333	GÜNEŞ F. ....	2/139
AYTAÇ Ö. ....	2/179	DOĞANYİĞİT Z. ....	3/333	GÜRPINAR SS. ....	3/311
<b>B</b>		DOĞUKAN M. ....	2/179	GÜZEL M. ....	2/217
BARAN İ. ....	1/3	DURMAZ R. ....	1/15	<b>H</b>	
BARAN-AKSAKAL FN.	3/269			HANÇER-AYDEMİR D.	1/87
BASRALI F. ....	4/421			HASDE M. ....	4/381

HAZIROLAN G. ....	4/493	KOÇER G. ....	4/421-4/449	POLAT E. ....	4/467
HEKİMOĞLU CH. ....	1/97-3/325	KOLAYLI CC. ....	2/195	<b>S - Ş</b>	
HÜRKAL G. ....	4/431	KÖROĞLU M. ....	1/33	SARI N. ....	1/117
<b>I-İ</b>		KULOĞLU N. ....	4/459	SARIBAŞ A. ....	3/319
IRMAK H. ....	3/269	KURNAZ N. ....	2/185	SAYMAZ S. ....	2/195
İLTER B. ....	3/269	KURU O. ....	4/421	SEÇİLMİŞ E. ....	4/381
İRKEÇ C. ....	4/413	<b>M</b>		SOPACI B. ....	4/431
İNCİLİ GK. ....	3/301	MARANGOZ Ö. ....	4/509	ŞAHAN S. ....	3/325
<b>K</b>		MERT D. ....	1/25	ŞENOL FF. ....	2/179
KAÇAK H. ....	2/233	MÜDERRİS T. ....	1/15	ŞENTÜRK ÜK. ....	4/421
KAHVE Hİ. ....	4/399	<b>N</b>		ŞİMŞEK AÇ. ....	3/269
KANER G. ....	2/167	NACAR T. ....	4/467	ŞİRİN H. ....	4/381
KARA A. ....	3/269	NASIRCILAR S. ....	4/421	<b>T</b>	
KARAALP C. ....	2/167	NASIRCILAR-ÜLKER S	4/449	TANYELİ A. ....	4/467
KARAASLAN R. ....	3/281	<b>O-Ö</b>		TAVUKÇU N. ....	3/269
KARABACAK V. ....	2/195	OKAN A. ....	3/333	TAYLAN-ÖZKAN A. ...	2/207-4/441
KARABULUT D. ....	4/459	OLGAR Y. ....	4/449	TEMEL A. ....	3/367
KARAER ZK. ....	2/207	ORHAN F. ....	3/281	TEMEL H. ....	4/477
KARAGEÇİLİ H. ....	3/355	ÖĞÜN E. ....	1/59	TERZİ HA. ....	1/33
KARAKEÇE E. ....	1/33	ÖNER P. ....	2/179	TEZCAN-ÜLGER S. ..	2/185
KARAKULLUKÇU S. ..	2/195	ÖZÇELİK O. ....	2/227	TOGAY A. ....	2/139
KARASARTOVA D. ....	2/207-4/441	ÖZDEMİR S. ....	4/449	TOKPINAR A. ....	1/51
KART D. ....	3/311	ÖZKAN Ö. ....	3/349	TOKTAŞ İ. ....	1/79
KAYA Ş. ....	2/149	ÖZKAN S. ....	4/381	TOPBAŞ M. ....	2/195
KAYMAK E. ....	3/333-4/459	ÖZTÜRK E. ....	4/459	TOPDAĞI Ö. ....	4/467
KELOĞLU B. ....	3/289	ÖZTÜRK N. ....	4/431	TOPLUOĞLU S. ....	2/207
KESKİN A. ....	4/441	ÖZTÜRK Ş. ....	3/289	TOSUN E. ....	3/269
KETREZ G. ....	4/381	ÖZTÜRK-KÜP F. ....	3/333	TUNÇKAŞIK T. ....	4/431
KIRCA F. ....	1/15	<b>P</b>		TURAN G. ....	1/33
KİRİŞÇİ Ö. ....	4/487	PAÇACI MZ. ....	4/431	TURP AB. ....	4/413
KİRMİT A. ....	4/413	PARLAK L. ....	4/497	TÜFEK H. ....	3/349
KOÇAK B. ....	3/333	PEHLİVANOĞLU S. ...	1/107	TÜRKEGÜN M. ....	2/185

**U-Ü**

UÇARSU A. ....	4/431
UĞRAŞ S. ....	2/227
ULUSAN D. ....	2/155
ÜNALDI Ö. ....	1/15
ÜNER AK. ....	1/51

**V**

VURAL-TAŞDEMİR E.	2/185
-------------------	-------

**Y**

YAKAN B. ....	4/459
YALÇIN S. ....	3/289

YAVUZ O. ....	4/509
YEŞİLBAŞ-ÜÇÜNCÜ Ş.	2/195
YILDIRIM Z. ....	3/355
YILDIZ MS. ....	2/233
YILMAZ S. ....	1/51
YİĞİT A. ....	2/217
YÜKSEL E. ....	2/149
YÜZBAŞIOĞLU-ARİYÜREK S.	1/69



## TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE



HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH  
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

...../...../20...

Makale Türü/Article Type:

(...) Araştırma/Research (..) Derleme/Review (..) Olgu Sunumu/Case Report (..) Editöre Mektup/Letter to Editor

Makale Başlığı/Article Entitled : .....

Sayın Editör,

Yayımlanması dileğiyle Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;

1. Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orjinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
2. Makalenin; derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
3. Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
4. Yayın haklarının Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here, we affirm and warranty as the author(s) of this manuscript submitted to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology that;

1. The article I / We submitted to the Bulletin is original and responsibilities are belong to us ethically and scientifically,
2. The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under the evaluation of this bulletin,
3. The article contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights,
4. The article publishing rights belong to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology.

(...1) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...2) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...3) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...4) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

(...5) ..... İmza/Signature : .....

Yazışma Adresi/Corresponding Address : .....

Tel/Phone : ..... Faks/Fax : ..... e-posta/e-mail : .....

Not / Note : 1. İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz / Please indicate the corresponding author with (X)  
2. Formu aşağıdaki adrese faks/posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below by faks or mail or deliver personally

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 E Blok Park Girişi 06100 Sıhhiye-ANKARA-TURKEY

Tel/Phone : +90 312 565 55 80

Faks/Fax : +90 312 565 55 91

e-posta/e-mail : hsgm.thdbd@saglik.gov.tr

