



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 79 ■ Sayı/Number 1 ■ Yıl/Year 2022

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

Doç. Dr. Fatih KARA, Genel Müdür (General Director)

EDİTÖR

EDITOR IN CHIEF

Doç. Dr. Hasan IRMAK (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

EDİTÖR YARDIMCILARI

DEPUTY EDITORS

Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN (TOBB ETÜ Tıp Fakültesi)

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enst.)

Prof. Dr. Hülya ŞİMŞEK (Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Dr. Öğrt. Üye. Pınar KAYNAR (Hitit Üniversitesi Alaca Avni Çelik MYO)

YAYIN KURULU

EDITORIAL BOARD

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK (Bakırçay Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Doç. Dr. Fatih BAKIR (Lokman Hekim Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Doç. Dr. Selin NAR ÖTGÜN (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Doç. Dr. Cemile SÖNMEZ (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Doç. Dr. Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK (Marmara Üniversitesi Pendik EAH)

Dr. Gıda Müh. Şule ŞENSES ERGÜL (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Dr. Edibe Nurzen NAMLI BOZKURT (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

İSTATİSTİK EDİTÖRLERİ

STATISTICAL EDITORS

Uzm. Dr. Fehminaz TEMEL (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Doç. Dr. Can Hüseyin HEKİMOĞLU (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

İNGİLİZCE DİL EDİTÖRÜ

ENGLISH LANGUAGE EDITOR

Dr. Gülsen BUDAK TOPAKTAŞ (S.B. Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü)

TEKNİK KURUL

TECHNICAL BOARD

Utku ERCÖMERT (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Zeynep KÖSEOĞLU (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Selahattin TAŞOĞLU (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

Gülşay GÜLTAY (S.B. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü)

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 :

Mart - 2022 / March - 2022

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

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADİLOĞLU, 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, Alanya

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Ankara

Banu ÇAKIR, Ankara

Bayram ŞAHİN, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Afyonkarahisar

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

Gülnaz ÇULHA, Hatay

Gülnur TARHAN, Adıyaman

Hakan ABACIOĞLU, İzmir

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

Hanefi ÖZBEK, İzmir

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Hasan IRMAK, Ankara	Orhan BAYLAN, İstanbul
Hasan TEZER, Ankara	Orhan YILMAZ, Ankara
Hayrettin AKDENİZ, Bolu	Özlem KURT AZAP, Ankara
Hilal ÖZDAĞ, Ankara	Pınar KAYNAR, Çorum
Hülya ŞİMŞEK, Yozgat	Pınar OKYAY, Aydın
Hürrem BODUR, Ankara	Rahmet GÜNER, Ankara
Işıl MARAL, İstanbul	Recep AKDUR, Ankara
İ. Mehmet Ali ÖKTEM, İzmir	Recep KEŞLİ, Afyonkarahisar
İpek MUMCUOĞLU, Ankara	Recep ÖZTÜRK, İstanbul
İrfan EROL, Ankara	Rıza DURMAZ, Ankara
İrfan ŞENCAN, Ankara	S. Aykut AYTAÇ, Ankara
İsmail CEYHAN, Ankara	Saime ŞAHİNÖZ, Gümüşhane
Kemal Osman MEMİKOĞLU, Ankara	Sami AYDOĞAN, Kayseri
Koray ERGÜNAY, Ankara	Sarp ÜNER, Ankara
Levent AKIN, Ankara	Seçil ÖZKAN, Ankara
Mahinur AKKAYA, Ankara	Seda KARASU YALÇIN, Bolu
Mehmet Ali ONUR, Ankara	Seda TEZCAN, Mersin
Mehmet Kürşat DERİCİ, Kırıkkale	Selçuk KAYA, Trabzon
Mestan EMEK, Antalya	Selçuk KILIÇ, Ankara
Metin KORKMAZ, İzmir	Selim KILIÇ, Ankara
Mithat ŞAHİN, Kars	Selin NAR ÖTGÜN, Ankara
Muhsin AKBABA, Adana	Sema BURGAZ, Ankara
Murat DİZBAY, Ankara	Semra Ayşe GÜREŞER, Çorum
Mustafa AKSOY, Ankara	Sercan ULUSOY, İzmir
Mustafa ERTEK, Ankara	Sultan ESER, İzmir
Mustafa Necmi İLHAN, Ankara	Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa
Mustafa Kasım KARAHOCAGİL, Kırşehir	Sümer ARAS, Ankara
Mustafa Kemal BAŞARALI, Ankara	Şule SENSES ERGÜL, Ankara
Mustafa KAVUTÇU, Ankara	Tayfur Ata SÖKMEN, Hatay
Mükerrem KAYA, Erzurum	Tevfik PINAR, Kırıkkale
Nazan YARDIM, Ankara	Turan BUZGAN, Ankara
Nazime MERCAN, Denizli	Yeşim ÖZBAŞ, Ankara
Nazmi ÖZER, Ankara	Yunus Emre BEYHAN, Van
Nilay ÇÖPLÜ, Ankara	Zafer ECEVİT, Ankara
Nur AKSAKAL, Ankara	Zafer KARAER, Ankara
Nur Münevver PINAR, Ankara	Zati VATANSEVER, Kars
Nuran ESEN, İzmir	Zeynep GÜLAY, İzmir
Oğuz GÜRSOY, Denizli	

I) AMAÇ VE KAPSAM

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi (THDBD), T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün yayın organı olan bilimsel bir dergidir. Dergi üç (3) ayda bir (Mart, Haziran, Eylül, Aralık) yayımlanır ve dört (4) sayıda bir cilt tamamlanır. Talep olması durumunda Ek Sayı çıkartılır.

Dergimizin amacı tıp alanında aşağıdaki konularda yapılan, bilimsel açıdan nitelikli ve literatüre katkı sağlayacak klinik ve deneysel araştırma yazılarını yayımlamaktır.

Dergide biyoloji, mikrobiyoloji, enfeksiyon hastalıkları, farmakoloji, toksikoloji, immünoloji, parazitoloji, entomoloji, kimya, biyokimya, gıda, beslenme, çevre, halk sağlığı, epidemiyoloji, patoloji, fizyopatoloji, moleküler biyoloji, genetik ve biyoteknoloji ile ilgili alanlardaki özgün araştırma, olgu sunumu, derleme, editöre mektup ve teknik rapor türündeki yazılar yayımlanır.

II) YAYIN İLKELERİ

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 Üyesi'nden (Hakem'den) olumlu görüş alındığında yayımlanmaya hak kazanır. Hakemlerin ve yazarların isimleri gizli tutulur. Hakemler değerlendirme süreçlerini en geç üç ay içinde tamamlar. 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.

III) TELİF VE LİSANS

Makalelerin tıbbi ve etik sorumluluğu yazarlara aittir. Makalelerin ve kaynakların içeriğinden, yayımlanan makalelerdeki veriler, fikirler ve ifadelerden yazarlar sorumludur; editörler, yayın kurulu ve T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü bu konularda herhangi bir sorumluluk kabul etmemektedir. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

Yazarlar, makalenin yayına kabul edilmesi halinde telif haklarını Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne devretmeyi kabul ederler. Ancak yazarlar aşağıdaki haklara sahiptir:

- Telif haklarının dışında kalan patent vb. tescil edilmiş haklar,
- Dergi ve kitap yayını dışında tüm eğitim faaliyetlerinde ücret ödemediği kullanılabileceği hakkı,
- Ticari olmamak koşulu ile makaleyi çoğaltabileceği hakkı.

Yazarlar, Telif Hakkı Devir Sözleşmesini imzalayarak, makalenin Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi tarafından yayımlanmak üzere kabul edilmesi durumunda Creative Commons Atıfı GayriTicari-Türetilemez 4.0 Uluslararası (CC BY-NC-ND 4.0) kapsamında lisanslanacağını kabul ederler.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi tarafından yayımlanan tüm makaleler, Creative Commons Atıfı GayriTicari-Türetilemez 4.0 Uluslararası (CC BY-NC-ND 4.0) lisansına tâbidir. Bu Lisans, makalenin uygun şekilde belirtilmesi, kullanımın ticari olmaması ve herhangi bir değişiklik veya uyarılama yapılmaması koşuluyla, herhangi bir ortamda kullanıma, dağıtılmasına ve çoğaltılmasına izin verir. Lisansın koşulları hakkında daha fazla bilgi için lütfen bakınız: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>. Bu lisans altında yayımlanan materyalin ticari amaçlı kullanım (satış vb.) durumunda telif hakkı sahibi ve yazar haklarının korunması için izin gereklidir. İçerik bilimsel bağlantı verilerinde ve sunumlarda referans olarak kullanılabilir. Bu koşullar dışında, makalelerin yeniden kullanımına ilişkin izinler THDBD Editörlüğü'nden alınmalıdır.

IV) AÇIK ERİŞİM POLİTİKASI

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi açık erişim politikasını benimsemiştir. Açık erişim politikası Budapeşte Açık Erişim Girişimi (BOAI) kuralları esas alınarak uygulanmaktadır. BOAI'ye göre Açık Erişim, "Hakem değerlendirmesinden geçmiş bilimsel makalelerin, internet aracılığıyla; finansal, yasal ve teknik engeller olmaksızın, serbestçe erişilebilir, okunabilir, indirilebilir, kopyalanabilir, dağıtılabilir, basılabilir, taranabilir, tam metinlere bağlantı verilebilir, dizinlenebilir, yazılıma veri olarak aktarılabilir ve her türlü yasal amaç için kullanılabilir olması"dır. <https://www.budapestopenaccessinitiative.org/boai-10-translations/turkish-translation>

Dergide yayımlanan bilimsel yazılara, Creative Commons Atıfı-GayriTicari-Türetilemez 4.0 Uluslararası Lisansı çerçevesinde ücretsiz erişilebilir. Dergimiz, hakem değerlendirmesinden geçmiş bilimsel literatürün, herkese

serbestçe ulaşılabilir kılınması, daha geniş bir küresel bilgi alışverişini desteklemesi ilkesine dayanarak içeriğine anında açık erişim sağlar. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'nde yayımlanan tüm makaleler Açık Erişim talimatlarına uygundur.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi yayımladığı makaleleri tüm dünyada serbestçe çevrimiçi erişilebilir kılmak için makalelere anında açık erişim sağlamaktadır. Makalelere erişim için abone olunmasında gerek yoktur. Dergi kullanıcıları olmadan da sistemdeki tüm makaleler ulaşıp okunabilmektedir. Makale gönderme, değerlendirme ve yayımlama ücreti alınmamaktadır.

V) ÜCRET POLİTİKASI

Makale gönderilmesi, değerlendirilmesi ve yayımlanması için **ücret alınmaz**.

VI) ETİK KURALLAR

Araştırma ve yayın etiği kurallarına uymak yazarların sorumluluğundadır. 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 uymalıdır.

Etik kurul izni gerektiren tüm araştırmalar için Etik Kurul Onayı alınmış olmalı, belgelendirilmeli; kurul adı, tarih ve sayısı "Gereç ve Yöntem" bölümünde belirtilmelidir.

Klinik araştırmalarda, çalışmaya katılanlardan bilgilendirilmiş olur alındığının gereç ve yöntem bölümünde belirtilmesi gerekmektedir. Gönüllü ya da hastalara uygulanacak prosedürlerin özelliği tümüyle anlatıldıktan sonra kendilerinin bilgilendirilip onaylarının alındığını gösterir beyan "Gereç ve Yöntem" kısmında bulunmalıdır. Olgu sunumlarında ve araştırma makalelerinde hasta kimliğini içeren herhangi bir doküman kullanılmamalıdır. Hasta kimliği ortaya çıkaracak bilgiler (fotoğraf vs.) kullanıldığında hastanın yazılı onayı gönderilmelidir.

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar için de gereken izinler alınmalı; yazıda deneklere ağrı, acı ve rahatsızlık verilmemesi için neler yapıldığı açık bir şekilde belirtilmelidir. Hayvan deneylerinde, çalışma "Laboratuvar Hayvanlarının Bakım ve Kullanımı Kılavuzunda" (www.nap.edu/catalog/5140.html) belirtilen etik düzenlemelere göre yapılmalıdır ve yazarlar etik kurul onayı alındığını ve etik kurul tarih ve sayısını "Gereç ve Yöntem" kısmında beyan etmelidirler. Deneysel ve klinik ilaç çalışmalarında Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı düzenlemelerine uygun olarak yapıldığı ve etik kurul onayı alındığı metin içinde belirtilmelidir.

Makalenin formatı ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors) ve COPE (Committee on Publication Ethics) rehberlerine uygun olmalıdır.

VII) YAZI DİLİ

Dergimizin yazı dilleri Türkçe ve İngilizcedir. Dili Türkçe olan yazılar İngilizce "abstract" ile, dili İngilizce olan yazılar da Türkçe özetleri ile yer alırlar. Özet ve "Abstract" bölümleri bire bir çevirileri şeklinde yer almaz. Yazının hazırlanması sırasında, Türkçe kelimeler için Türk Dil Kurumundan (www.tdk.gov.tr), teknik terimler için Türk Tıp Terminolojisinden (www.tipterimleri.com) yararlanılması önerilir. Dili İngilizce olan yazıların mutlaka yazım ve dilbilgisi açısından yeterliliklerinin kontrol edilmiş olması gereklidir. Dil açısından yetersiz görülen yazılar değerlendirmeye alınmazlar.

VIII) YAZIM KURALLARI

Dergide yayımlanmak üzere gönderilen yazılar, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi yazım kurallarına göre hazırlanmalıdır.

Başvurular www.turkhijyen.org adresinden "**Çevrimiçi Makale Gönder, Takip Et, Değerlendir**" programı aracılığıyla on line olarak yapılmaktadır.

Yayımlanmak üzere gönderilecek yazılar;

* Bilimsel düzeyi yüksek, orijinal ve kaynak gösterilebilecek özellikte olmalıdır.

* Bilgiler ve kaynaklar son 5 (beş) yıla ait güncel verileri içermelidir.

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

2. Makale başlığı, İngilizce başlık, kısa başlık, yazar ad(ları), yazar(lar)ın çalıştığı kurum(lar) ve birim(ler), yazıma 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 yazılmalıdır. Herhangi bir ticari ürün ve/veya

şirkette bir ilişki yoksa, başvuru yazısında belirtilmelidir.

d. Makale, kongre/sempozyumda sunulmuşsa sunum türü ile birlikte dipnot şeklinde mutlaka belirtilmelidir.

3. Yazılardaki terimler mümkün olduğunca Türkçe ve Latince olmalı, dilimize yerleşmiş kelimelere yer verilmeli ve **Türk Dil Kurumu**'nun güncel sözlüğü kullanılmalıdır. Yazıların dili açık ve anlaşılır olmalı, imlâ ve yazım hataları olmamasına özen gösterilmelidir.

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 aralıkla yazılmalı ve sayfa kenarlarından 2.5 cm boşluk bırakılmalıdır.

8. 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.

Dergimizin ve makalenizin olabildiğince fazla atıf alabilmesi için özetler son derece kapsamlı hazırlanmalı; gramer, imlâ ve yazım hataları barındırmamalıdır.

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

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

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

d) **Giriş:** Araştırmanın amacı ve gerekçesi güncel literatür bilgisi ile desteklenerek iki sayfayı 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 araştırmacıların 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.

Makalenizin Kaynaklar bölümünde Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisinde yayımlanmış makalelere atıf yapılmasına özen gösterilmelidir.

- **Sürelî yayın:** Yazar(lar)ın Soyadı Adının baş harf(ler)i (altı veya daha az yazar varsa hepsi yazılmalıdır; yazar sayısı yedi veya daha çoksa 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 numarası.

- **Standart 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 Parazitol 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 numarası.

- **Örnek:** Weinstein L. Swarts MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic Physiol ogy: Mechanism of Disease*. Philadelphia. 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.

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.

- **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.

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

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

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

12. **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.

13. **Teknik Rapor türü yazılar** ilgili alanda önemli katkısı olabilecek bilgileri içermelidir. Teknik raporlarda Türkçe ve İngilizce başlık, tek paragraf olacak şekilde Türkçe ve İngilizce özet, Türkçe ve İngilizce olmak üzere anahtar kelimeler yer almalıdır. Kaynak sayısı en fazla 10 olmalıdır.

14. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

15. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

I) AIM and SCOPE

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (TBHEB) is a publication of the "Republic of Turkey, Ministry of Health, General Directorate of Public Health". The Journal is published every three months (March, June, September, December) and one volume consists of four (4) issues.

Goal of the our journal is to publish clinical and experimental research articles which are scientifically qualified and will provide a new contribution to the literature.

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, letters to the editor and technical reports.

II) PUBLISHING POLICY

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. The names of the reviewers and authors are kept confidential. Reviewers complete the evaluation processes within three months at the latest. 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.

III) COPYRIGHT and LICENSING

The authors are responsible for the scientific and ethical liability of the manuscripts. Authors are responsible for the contents of the manuscript and the references. The data, opinions and statements of published articles are authors' responsibility, and the Editors, Editorial Board and Republic of Turkey Ministry of Health General Directorate of Public Health deny any responsibility on these subjects. Copyright fee is not paid to the authors.

The authors agree to transfer the copyright to The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology if the article is accepted for publication. However, the authors retain the following rights:

- Registered rights rather than copyrights such as patent etc.
- The right to use it no charge in all educational activities except for publication in journals or books.
- The right to multiply manuscript provided that it is not commercial.

By signing the Copyright Transfer Form, authors agree that the article, if accepted for publication by The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology, will be licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).

All articles published by The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology are subject to the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0). This License permits use, distribution, and reproduction in any platform, provided that the article is properly cited, the usage is noncommercial, and no modifications or adaptations are made. For more information on the conditions of the license please look at: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/> Permission is required for the protection of copyright holder and author rights in the case of commercial use (sales etc.) of material published under this license. The content can be used as a reference in scientific publications and presentations. Except these conditions, permissions for re-use of manuscripts should be obtained from TBHEB editorial office.

IV) OPEN ACCESS POLICY

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology has adopted open access policy. Open Access Policy is based on rules of Budapest Open Access Initiative (BOAI). According to BOAI, Open Access states, "Scientific articles that have been evaluated by the referee, via the Internet; be freely accessible, readable, downloadable, copied, distributed, printed, scanned, linked to full texts, indexed, transmitted as data and used for any legal purpose, without financial, legal and technical barriers. <https://www.budapestopenaccessinitiative.org/read>

Scientific articles published in the journal are freely available under the Creative Commons 4.0 International License (CC BY-NC-ND 4.0). Our Journal, provides immediate open access to its peer-reviewed scientific literature on

the principle of making it freely available to the everyone and supporting a greater global exchange of knowledge. Published articles in The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology are fully comply with Open Access instructions.

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology instant open access to the articles is provided to make the articles published in journals freely available online all over the world. There is no need to subscribe to access articles. All articles in the system can be accessed and read without being a journal user. There is no fee for article submission, evaluation and publishing.

V) PRICE POLICY

Article submission, evaluation and publication are free.

VI) ETHICAL RULES

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology expects the authors to comply with the ethics of research and publication. In case the authors do not have a local ethics committee, the principles outlined in the "Declaration of Helsinki" should have been followed. Authors must comply with the internationally accepted guidelines and provisions set out in all applicable legislation when it comes to this type of work.

Ethics Committee Approval must be obtained and documented for all researches requiring ethics committee approval; The name, date and number of the committee should be stated in the method section of the article.

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 reports, information about the signed informed patient consent form should be included in the article. In case patient information (photograph, etc.) is used which shows patient ID, a written informed consent of the patient must be submitted.

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. In animal experiments, the study should be conducted in accordance with the ethical regulations specified in the "Guide to the Care and Use of Laboratory Animals" (www.nap.edu/catalog/5140.html) and the authors should declare that the ethics committee approval was obtained and the date and number of the ethics committee in the "Materials and Methods" section. Experimental and clinical drug studies performed in accordance with the Republic of Turkey Ministry of Health regulations and ethics committee approval must be stated in the article.

The format of the article should be in accordance with ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors) and COPE (Committee on Publication Ethics) guidelines.

VII) LANGUAGE of the JOURNAL

The official languages of the our Journal are Turkish and English. The manuscripts written in Turkish have also abstracts in English, and the articles in English have also abstracts in Turkish. The Turkish and English abstracts should be literal translations of each other. When preparing manuscripts, the Turkish Language Institution (www.tdk.gov.tr) is advised for consulting Turkish words and Turkish Medical Terminology (www.tipterimleri.com) for technical terms. Manuscripts in English must absolutely be checked for spelling and grammar. Manuscripts considered insufficient in language will not be considered for evaluation.

VIII) WRITING RULES

Manuscripts submitted for publication in the journal should be prepared according to the writing rules of the Turkish Journal of Hygiene and Experimental Biology.

Applications are made online at www.turkhijyen.org via the "Online Manuscript Submit, Track, Evaluate Program".

Articles to be submitted for publication;

- * Should have a high scientific level, be original and suitable for reference.
- * Information and references should contain up-to-date data for the last 5 (five) years.

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, Turkish title, short title, author name(s), names of institutions and the departments of the author(s), full address of the

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

corresponding author, telephone numbers (landline and mobile), 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". The language of the articles should be clear, and care should be taken to avoid spelling and writing mistakes.

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. 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).

Abstracts should be prepared in an extremely comprehensive way; it should not contain grammatical, spelling and writing errors.

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 papers:** 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.

- **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)".

- **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.

9. **Research articles** should have up to 40 references.

10. **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.

11. **Case reports** should have a maximum of seven pages of text. Case report should have a Turkish and English title, abstract, keywords and also introduction, case description and discussion sections should be given. Number of references should be maximum 20.

12. **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.

13. **Technical report** should contain information that may contribute significantly to the relevant field. Technical reports should include Turkish and English titles, Turkish and English abstracts in a single paragraph, keywords in Turkish and English. The number of references should be maximum 10.

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

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

ETİK İLKELER VE YAYIN POLİTİKASI

ETİK İLKELER

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editör ve Hakemleri, Uluslararası Tıp Dergisi Editörleri Komitesi (ICMJE), Yayın Etiği Komitesi (COPE), Dünya Tıp Editörleri Birliği (WAME), Bilim Editörleri Konseyi (CSE), Avrupa Bilim Editörleri Birliği (EASE), ABD Ulusal Tıp Kütüphanesi (NLM), Dünya Tıp Birliği (WMA) ve Ulusal Bilgi Standartları Örgütü (NISO) rehber kurallarına uymaktadır.

Yazarlara yönelik; dergi politikası gereğince, uluslararası anlaşmalara uygun bir etik kurul tarafından araştırma protokollerinin onaylanması gereklidir. [WMA Helsinki Deklarasyonu - İnsan Denekleri İçeren Tıbbi Araştırmalar için Etik İlkeler (son güncelleme: Ekim 2013, Fortaleza, Brezilya), "Tüm araştırma çalışmaları için laboratuvar hayvanlarının bakım ve kullanımı kılavuzu (8. baskı, 2011) "ve / veya" Hayvanları içeren Biyomedikal Araştırmalara Yönelik Uluslararası Rehber İlkeler (2012)]. Gönderilen makale, etik kurul onayı içermemesi durumunda değerlendirme için işleme alınmaz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI POLİTİKASI

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'nin editör incelemesi, uluslararası editör organizasyonları (ICMJE, EASE, WAME, COPE, CSE,...) tarafından belirlenen İyi Editörlük Uygulamalarına uygundur. WAME, yayın sürecinde (makalenin gönderilmesi, hakem incelemesi, editör kararları ve yazarlar, hakemler ve editörler arasındaki iletişim) yazar, hakem veya editörlerin, süreçteki sorumluluklarını (akademik dürüstlük, çalışmanın yürütülmesinde ve raporlanmasında yanıltma olmaması, karar ve hükümlerin uygunluğunu) etkileyebilecek herhangi bir rekabetçi çatışma varsa çıkar çatışmasının mevcut olduğunu belirtmektedir.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, tüm yazarların, hakemlerin ve editörlerin, WAME tarafından yukarıda belirtilen herhangi bir rekabet çıkarının yanı sıra, ailevi, kişisel, finansal, politik veya dini konularla ilgili herhangi bir çıkar çatışmasını editöre bildirmesini istemektedir. Herhangi bir çıkar çatışması ve finansal desteğin olup olmadığı, makalelerin sonunda beyan edilmelidir.

Yazarlar inceleme sürecinde bölüm editörlerinden hiçbiri ile iletişime geçmemelidir. Makalelerin süreci ile ilgili tüm gerekli bilgiler dergi sekreterliğinden edinilebilir. Editör ve hakemlerin isimleri yazarlara verilmez. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'nin çift kör gözden geçirme ilkeleri nedeniyle, yazarların ve hakemlerin isimleri diğer kişilerce bilinmemektedir.

YAYIN POLİTİKASI ve HAKEM DEĞERLENDİRME SÜRECİ

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi (THDBD), **çift kör hakem değerlendirmesi** ile Türkçe ve İngilizce dillerinde T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yayımlanmaktadır. THDBD yayın ilkelerinde belirtilen konularda yazılan makaleleri kapsamaktadır. Sadece çevrimiçi (online) başvurular kabul edilmektedir. Dergiye kabul edilme sürecindeki değerlendirilmelerde aranan temel özellikler öngünlük ve bilim literatürüne katkıdır.

Makaleler gönderildikten sonra öncelikle editörler tarafından değerlendirilmektedir. Editörler hakem değerlendirme sürecinden önce makalelerin THDBD yazım kurallarına uygun yazılıp yazılmadığını değerlendirmektedirler. Bu kurallara göre yazılmayan makaleler değerlendirilmeye alınmamaktadır.

Sonrasında, makalenin değerlendirilmesi için iki hakem atanır. Hakemler aynı alanda yayınları olan uzmanlar arasından seçilir. Makaleler ihtiyaç halinde istatistik editörü tarafından da kontrol edilebilir. Tüm makaleler İngilizce dil editörü tarafından da incelenir. Hakemlere değerlendirme için 20 gün süre verilmektedir ve eğer herhangi bir düzeltme istenirse yazarların gerekli düzeltmeleri yapmak için 30 gün süresi vardır. Editör, editör yardımcıları, istatistik editörü ve İngilizce dil editörü kabul edilen makalenin asıl anlamını değiştirmeyen küçük düzeltmeler yapabilirler.

ETHICAL PRINCIPLES AND PUBLICATION POLICY

ETHICAL PRINCIPLES

The Editorial Board and Reviewers of the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology adhere to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), Committee on Publication Ethics (COPE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), European Association of Science Editors (EASE), the US National Library of Medicine (NLM), the World Medical Association (WMA), and National Information Standards Organization (NISO).

For Authors; as journal's policy, an approval of research protocols by an ethics committee in accordance with international agreements "WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (last updated: October 2013, Fortaleza, Brazil)" , "Guide for the care and use of laboratory animals (8th edition, 2011)" and/or "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (2012)" is required for all research studies. If the submitted manuscript does not include ethics committee approval, it will not be processed for evaluation.

CONFLICT OF INTEREST POLICY

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology's editorial review process is in accordance with the Good Editorial Practice set by international editorial organizations (ICMJE, EASE, WAME, COPE, CSE, ...). WAME indicates that "conflict of interest exists when an author, reviewer, or editor in the publication process (submission of manuscripts, peer review, editorial decisions, and communication between authors, reviewers and editors) has a competing interest that could unduly influence his or her responsibilities (academic honesty, unbiased conduct and reporting of research, and integrity of decisions or judgments) in the publication process".

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology requires that each author, reviewer, and editor must disclose to the editor-in-chief any conflict of interest related to family, personal, financial, political or religious issues as well as any competing interest outlined above at the WAME's definition. Whether or not a conflict of interest and financial support exist, they must be declared at the end of the manuscripts.

Authors should not contact any of the section editors during the review process. All necessary information regarding the process of a manuscript can be obtained from the editorial office. However, the names of the handling editor and the reviewers are not given to the author(s). Due to the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology's double-blind review principles, the names of authors and reviewers are not known to the other.

PUBLICATION POLICY and PEER REVIEW PROCESS

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (TBHEB) is published in Turkish and English by Republic of Turkey Ministry of Health General Directorate of Public Health which processing through **double-blind peer review**. The journal covers clinical and experimental research articles on subjects from all medical areas, review articles, case reports, letters to the editor, manuscripts on historical evolution of diseases and medicine and content on ethical problems. Articles are accepted only by online submission. The basic features supposed to be in an article during assessment processes for the acceptance to journal are the contribution to the scientific literature and the originality.

All manuscripts are underwent an initial process by the Editors after the submission. Editors firstly evaluates whether the manuscript is prepared according to the journal's manuscript submitting rules before peer review process. Manuscripts which are not appropriate for those rules will not be evaluated.

Then, two reviewers are assigned for manuscript evaluation. Reviewers are selected among specialists who also have publications in literature in the same medical field. Articles might be checked by the statistical editor in addition if needed. All manuscripts are also inspected for English grammatical and manuscript preparation rules. 20 days are given for reviewer and, if any corrections are required, the author(s) has 30 days to make the requested corrections. The Editor-in-Chief, Associate Editors, statistical editor and English language editor may make minor corrections to accepted manuscripts that do not change the main meaning of the manuscript.

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

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.

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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 adresinden online olarak makale gönderilebilir
Submissions can be made online at the address www.turkhijyen.org
to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL

Scopus

ResearchGate

CAS
A division of the American Chemical Society

Google
scholar beta

Academic Journals Database
disseminating
quality controlled scientific knowledge

EBSCO
HOST Electronic
Journals
Service

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi (Türk Hij Den Biyol Derg); Index Copernicus, ResearchGate, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, OpenJ-Gate, GenamicsJournalSeek, AcademicJournals 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 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.

TUBITAK
ULAKBİM

TÜRK MEDLINE

TÜRKİYE ATIF DİZİNİ

GENAMICS™
...research from your desktop

medoanet
Mediterranean Open Access Network

Open
J-Gate

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

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

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Synergistic antibacterial effect of ciprofloxacin and green tea extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical cases
Klinik vakalardan izole edilen metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarına siprofloksasin ve yeşil çay ekstraktının sinerjik antibakteriyel etkisinin araştırılması
Yalçın DİCLE, Halil YAĞZI, Mehmet Veysel COŞKUN, Zeynal TOPALCENGİZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.90532 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
2. SARS-CoV-2 pozitif sağlık çalışanlarının gerçek zamanlı PCR döngü eşik değeri, klinik ve epidemiyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi
Evaluation of real-time PCR cycle threshold value, clinical and epidemiological characteristics of SARS-CoV-2 positive healthcare workers
Gül BAYRAM, Harun GÜLBUDAK, Aslıhan BEKÇİ, Seda TEZCAN ÜLGER, Gülçin YAPICI, Gönül ASLAN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.59913 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
3. Kronik hastalığı olan erişkinlerin 2015-2017 yılları arasında influenzaya karşı aşılama durumları
Influenza vaccination status in adults with chronic diseases between 2015-2017
Halil EKİNCİ, Turan BUZGAN, Banu EKİNCİ, Fatih KARA, Bekir KESKİNKILIÇ, Hasan IRMAK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.23326 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
4. Prediction of treatment cost by artificial neural network of patients with COVID-19 in intensive care unit
Yoğun bakım ünitesindeki COVID-19 hastalarının yapay sinir ağı ile tedavi maliyetinin tahmini
Suna KOÇ, Mehmet DÖKÜR, Türkan ÖZER, Betül BÖRKÜ UYSAL, Mehmet Sami İSLAMOĞLU, Nilgün AÇIKGOZ, İlke KÜPELİ, Sena Gül KOÇ, Sema Nur DOKUR, İsmail Tuncer DEĞİM
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.48642 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
5. *Androctonus crassicauda* antivenomunun *Leiurus abduhbayrami* venomuna karşı çapraz koruyuculuğunun değerlendirilmesi
Evaluation of cross-protection of *Androctonus crassicauda* antivenom against *Leiurus abduhbayrami* venom
Mehmet Ali KANAT, Derya ALTUN, Kübra KILIÇ, Edibe Nurzen NAMLİ BOZKURT, Ertuğrul TURAN, Gökhan CENGİZ, İlhan BOZYİĞİT
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.34445 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
6. Mitigative effects of chloroquine treatment against hypoxia-induced intestinal injury: a histological and immunohistochemical study
Hipoksiye bağlı bağırsak hasarına karşı klorokin tedavisinin hafifletici etkileri: histolojik ve immünohistokimyasal bir çalışma
Ali Tuğrul AKIN, Emin KAYMAK, Emel ÖZTÜRK, Tayfun CEYLAN, Betül YALÇIN, Kemal Erdem BAŞARAN, Derya KARABULUT, Züleyha DOĞANYİĞİT, Saim ÖZDAMAR, Birkan YAKAN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.78476 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
7. Hiperglisemi RBL-1 hücrelerinde Ca^{2+} salınımı ile aktive olan Ca^{2+} akımlarını (I_{CRAC}) artırır
Hyperglycemia increases Ca^{2+} release activated Ca^{2+} current (I_{CRAC}) in RBL-1 cells
Yasin GÖKÇE, Taufiq RAHMAN, Nazmi YARAŞ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.06332 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")
8. Vitamin B12 alleviates methotrexate-induced lung injury in rat: A histopathological, immunohistochemical and biochemical study
B12 vitamini sıçanlarda metotreksatin neden olduğu akciğer hasarını azaltır: Histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal bir çalışma
Emin KAYMAK, Derya KARABULUT, Emel ÖZTÜRK, Ali Tuğrul AKIN, Nurhan KULOĞLU, Birkan YAKAN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.00947 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
9. The epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from patients in intensive care units of a research hospital
Araştırma hastanesinde yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin epidemiyolojisi ve antifungal duyarlılığı
Esmâ EREN, Hafize SAV, Zehra BEŞTEPE DURSUN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.34356 (Dili: "İngilizce" - Language: "English")
10. Periferik arter hastalarında yükselmiş serum homositrulin düzeyleri
Elevated serum homocitrulline levels in patients with peripheral artery disease
Duygu ERYAVUZ ONMAZ, Canan AYDOĞAN, Nazif AYGÜL, Abdullah SİVRİKAYA, Sedat ABUŞOĞLU, Ali ÜNLÜ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.76402 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

3 - 12



13 - 24



25 - 38



39 - 46



47 - 58



59 - 70



71 - 80



81 - 92



93 - 102



103 - 114



11. Geriatrik hastalarda idrar yolu enfeksiyonları ve etkenlerinin değerlendirilmesi

Evaluation of urinary tract infections and causative agents in geriatric patients

Müge AYHAN, Ayşe KAYA KALEM, İmran HASANOĞLU, Bircan KAYAASLAN, Rahmet GÜNER

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.19971 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

115 - 122



12. İnvitreal enjeksiyon odası ile gününbirlik ameliyathane odasının hava kalitesinin ve mikrobiyal yükünün değerlendirilmesi

Evaluation of air quality and microbial tests of the intravitreal injection room and the outpatient operating room

Erol HAVUZ, Seda GÜDÜL HAVUZ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.65390 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

123 - 132



13. *Inula viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının antibakteriyel ve antikanserojenik etkilerinin incelenmesi

Investigation of the antibacterial and anticarcinogenic effects of Inula viscosa methanol and hexane extracts

Berna ERDAL, Bahar YILMAZ, Bensu BAYLAN

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.55798 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

133 - 144



14. Borik asitin dezenfektan etkinliğinin araştırılması

Investigation of disinfectant effectiveness of boric acid

Yasemin ZER, Fatma Nur KARABACAK, Ayşe BÜYÜKTAŞ MANAY

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.54251 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

145 - 152



■ Derleme / Review

15. Yumurtalık kanserinde hedefe yönelik tedavi stratejilerinde moleküler mekanizmaların rolü

The role of molecular mechanisms in targeted therapy strategies in ovarian cancer

Betül ÇOLAK, Demet CANSARAN DUMAN, Erkan YILMAZ

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.60362 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

153 - 162



16. Sağlık alanındaki biyoteknolojik ürünlerin üretimi için mantarların kullanımı

The use of fungi for the production of biotechnological products in the field of health

Şule Aybüke YAVUZ, Ülkiye Dudu GÜL

Doi: 10.5505/TurkHijyen.2022.06982 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish")

163 - 172



Synergistic antibacterial effect of ciprofloxacin and green tea extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical cases

Klinik vakalardan izole edilen metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarına siprofloksasin ve yeşil çay ekstraktının sinerjik antibakteriyel etkisinin araştırılması

Yalçın DİCLE¹ (ID), Halil YAZGI² (ID), Mehmet Veyssel COŞKUN³ (ID), Zeynal TOPALCENGİZ⁴ (ID)

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the synergistic effect of ciprofloxacin and green tea extract combinations against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from various clinical registries.

Methods: Presumptive 90 MRSA strains isolated from various clinical specimens were identified by the biochemical tests followed by an automated bacterial recognition system. Resistance of isolates to ciprofloxacin was determined using a disk diffusion test. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of green tea extract and ciprofloxacin were determined for 54 MRSA isolates resistant to ciprofloxacin by microdilution method. Subsequently, the synergistic effect of the green tea + ciprofloxacin combinations against the isolates were determined by the checkboard dilution method to calculate fractional inhibitory concentration values.

Results: MRSA strains were isolated from three clinical sample types including wounds (54.4%), blood (30%) and urine (15.6%). MIC values of green tea extract, ciprofloxacin and their tested combinations ranged

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, siprofloksasin ve yeşil çay ekstraktı kombinasyonunun çeşitli klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarına karşı sinerjik etkisinin araştırılmasıdır.

Yöntem: Farklı klinik örneklerden izole edilen muhtemel 90 adet MRSA suşu biyokimyasal testlerden sonra otomatize bakteri tanımlama sistemiyle tür düzeyinde tanımlanmıştır. İzolatların siprofloksasine karşı dirençleri disk difüzyon testi kullanılarak belirlenmiştir. Siprofloksasine karşı dirençli bulunan 54 MRSA izolatının yeşil çay ekstraktı ve siprofloksasin için minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri mikrodilüsyon yöntemiyle tespit edilmiş ve izolatlara karşı yeşil çay + siprofloksasin kombinasyonunun sinerjik etkisi dama tahtası yöntemi ile hesaplanan fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Bulgular: MRSA izolatlarının %54,4'ü yara, %30'u kan ve %15,6'sı idrar olmak üzere üç farklı klinik örnek türünden izole edilmiştir. MRSA izolatlarının yeşil çay ekstraktı, siprofloksasin ve farklı kombinasyonlarının

¹ Muş Alparslan University, Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Muş

² Atatürk University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Erzurum

³ Health Sciences University, Ankara City Hospital, Department of Internal Medicine, Ankara

⁴ Muş Alparslan University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Food Engineering, Muş



İletişim / Corresponding Author : Yalçın DİCLE

Muş Alparslan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Muş - Türkiye

E-posta / E-mail : y.dicle@alparslan.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 12.12.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 09.03.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.90532

Dicle Y, Yazgi H, Coşkun MV, Topalcengiz Z. Synergistic antibacterial effect of ciprofloxacin and green tea extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical cases. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 3 - 12

between 8 and 256 µg/ml. The synergetic effect of green tea extract on ciprofloxacin for 54 MRSA isolates were determined as ineffective for 18 (33.3%), additive for 17 (31.5%), and synergic for 19 (35.2%) strains based on fractional inhibitory concentration values.

Conclusion: The results of this study showed that green tea extract and ciprofloxacin had a synergetic antibacterial effect on MRSA strains isolated from various clinical specimens.

Key Words: Checkerboard dilution method, MRSA, synergistic effect, ciprofloxacin, green tea, *Camellia sinensis*

MIK değerleri 8-256 µg/ml arasında belirlenmiştir. Yeşil çay ekstraktının siprofloksasin üzerine sinerjik etkisi, kombinasyonunun fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu indeksi değerlerine göre 54 MRSA izolatında için 18 suş (%33,3) için etkisiz, 17 suş (%31,5) için aditif, 19 suş (%35,2) için sinerjik etki olarak saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışma sonucunda göre yeşil çay ekstraktı ve siprofloksasin kombinasyonunun klinik örneklerden izole edilen MRSA suşları üzerinde sinerjik antibakteriyel etkisi olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Dama tahtası duyarlılık yöntemi, MRSA, sinerjik etki, siprofloksasin, yeşil çay, *Camellia sinensis*

INTRODUCTION

MRSA has been found with high prevalence in hospitals and intensive care units since the first isolate was recovered in the early 1960s in Denmark (1). Community-acquired MRSA isolates were also started to be reported towards the end of the twentieth century (2, 3). MRSA isolates have been identified even in countries where the use of antibiotics is not common, suggesting that this form of resistance have existed in staphylococci for a long time (4). When MRSA bacteria are isolated due to nosocomial infection, both the difficulties in the eradication of disease factors and the resistance of strains to antibiotics lead to serious therapeutic problems and high care costs (5, 6).

Antibiotics are the gold standard for treatment of MRSA infections. However, long-term antibiotic treatments can cause numerous side effects and bacterial resistance. Ciprofloxacin is a broad-spectrum synthetic antibiotic (chemotherapeutic agent) of the fluoroquinolone class used orally or intravenously in the clinical treatment of severe and

life-threatening infections. Ciprofloxacin interferes with DNA replication by inhibiting DNA gyrase in both Gram-positive and Gram-negative bacteria (7). To avoid development of resistance, ciprofloxacin should be combined with a suitable antibiotic (8). For example, quinolones combined with rifampicin helps eradicate MRSA strains completely (9). Therefore, researchers seek alternative treatments to conventional antibiotic therapy.

Antimicrobial effects of some herbal extracts on MRSA have been reported previously (10, 11). Green tea (*Camellia sinensis*) leaves are known for their antibacterial activity against various pathogens, including MRSA (12, 13). Research also focuses on the synergistic effect of antibiotics with plant extracts as green tea on numerous types of microorganisms (14-18). Green tea extracts combined with other antibiotics (chloramphenicol, gentamicin, methicillin, and nalidixic) have been resulted in a synergistic effect on enteropathogenic bacteria with in vitro assays (18). Any in vitro susceptibility procedure designed to understand the antibacterial activity of combined antibiotics is referred to as synergy

testing. Two-dimensional dilution (checkerboard, checkerboard dilution method), time-kill kinetic assays, and Epsilon test (E-test) are some of common methodologies used in synergy testing (19, 20). The aim of this study was to determine the in-vitro synergistic effect of ciprofloxacin + green tea extract on MRSA strains isolated from the clinical samples of patients in different units of the hospital.

MATERIAL and METHOD

Identification of Bacterial Isolates

Strains were isolated from clinical samples (wounds, blood, and urine) obtained from clinics of different hospitals between 01 January 2010 and 12 December 2014. This study was approved by the Atatürk University Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee at 08 December 2016 with meeting number 7 and decision number 10. Isolation was conducted at the research and application center medical bacteriology laboratory of the microbiology department of the faculty of medicine at Atatürk University. Stock MRSA strains (-80 °C) were cultured on nutrient agar (Merck, Germany) and incubated at 35 ± 2 °C for activation. A series of preliminary identification tests (Gram staining, motility, oxidase, catalase, and coagulase) were conducted on the activated cultures. Cefoxitin-resistant isolates were also evaluated for further identification. These isolates were identified at the species level using an automated bacterial identification system (VITEK 2®, BioMérieux, USA). The identified MRSA isolates were kept at -80 °C until study in a nutrient broth medium (Merck, Germany) containing 16% glycerol. *S. aureus* (ATCC 43300) was used as control.

Determination of Ciprofloxacin Resistance of Isolates

Resistance to ciprofloxacin was determined using Kirby-Bauer disk diffusion test. For activation, frozen isolates were streaked on 5% sheep blood agar (Merck, Germany) and incubated overnight at 35 ± 2 °C. After

incubation, one colony was suspended in a Nutrient Broth (Merck, Germany) with a 0.5 McFarland turbidity (10⁸ CFU/ml). A lawn of bacteria was cultured on a Mueller Hinton Agar (MHA; Merck, Germany, 4-mm thickness) plate by spreading the suspension. Afterwards, ciprofloxacin (CIP, 0.5 µg; Oxoid, UK) disks were placed and incubated at 35 ± 2 °C for 18-24 h. After incubation, disk diffusion susceptibility was interpreted based on zone diameters (mm) according to the CLSI M100-S24 breakpoint guidelines. Disk diffusion susceptibility was considered as sensitive (≥ 21 mm), moderately sensitive (16-20 mm), and resistant (≤ 15 mm). Fifty-four ciprofloxacin-resistant MRSA strains were included in the study for minimum inhibitory concentration values of ciprofloxacin, green tea extracts and ciprofloxacin + green tea extract synergy testing.

Preparation of Green Tea Extract

In-season, green tea with 2.5 leaves was collected in Rize and dried at room temperature in a sun-free environment. A 100 gram of powdered green tea was then extracted using a Soxhlet extractor (Sigma-Aldrich, 322415) in a liter of methanol for 72 h at a temperature below the boiling point. The extracts were filtered through Whatman filter No.1 (Dassel, Germany) and then concentrated using a rotary evaporator under vacuum at 40 °C. The extract was lyophilized and kept at + 4 °C until testing.

Determination of MIC Values of Ciprofloxacin-Resistant Isolates

A ciprofloxacin (Sigma Aldrich, USA) stock solution with a final concentration of 1024 µg/ml was prepared using sterile distilled water as recommended by CLSI. Green tea stock solution with a final concentration of 1024 µg/ml was prepared using saline (physiological serum) of tea extract previously dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, USA). A cation-adjusted (containing 20-25 mg/l Ca⁺⁺ and 10-12.5 mg/l Mg⁺⁺) Mueller Hinton Broth (CAMHB; Merck, Germany) medium was prepared for liquid microdilution (21). 100 µl

of CAMHB medium was placed to sterile 96 well round bottom (U-base) plates. 100 µl of the solution with the initial concentration of the test antibiotic (1024 µg/ml) was placed in the first wells. Two-fold ciprofloxacin concentrations were prepared for testing (dilution range: 1-512 µg/ml). The last two wells on the plate were used for reproduction and broth control. Bacterial suspensions with 0.5 McFarland turbidity were diluted 1:10 in CAMHB, and 10 µl of the final bacteria with an inoculum concentration of 5×10^5 CFU/ml was added to each well, including the reproduction control well. After 18-24 hours of incubation at $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, the minimum inhibitory concentration (MIC) values of the isolates were determined for ciprofloxacin and green tea extracts depending on the growth in the wells.

Synergy Testing of Ciprofloxacin-Resistant Isolates

For 54 MRSA isolates, the synergistic effect of ciprofloxacin + green tea extracts (CIP + GTE) was determined using the checkerboard dilution method. A two-fold dilutions were performed in separate tubes for the stock green tea extract and ciprofloxacin solutions. Serially diluted tubes were prepared for ciprofloxacin and green tea extracts based on the MIC of each isolate. A separate 96 well round bottom (U-base) ELISA plate was then prepared for each MRSA isolate and test combination. Bacterial suspensions with 0.5 McFarland turbidity (1.5×10^8 CFU/ml) for the isolates were diluted 1:30 in CAMHB (5×10^6 CFU/ml). For MIC testing, 10 µl of the suspensions was inoculated to all wells, except for the sterility control well. The green tea extract and ciprofloxacin solutions were mixed and added to the serial wells from the serial dilution tubes according to the checkerboard dilution method in order to prepare 50 µl of solutions with desired concentrations. Dilution effect was also calculated. After the checkerboard panel was prepared, the lids of the ELISA plate were closed and incubated at $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 16-20 h. The plates were monitored for reproduction and medium sterility control.

Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC)

FIC index was used (equation below) to determine the synergistic effect of the combinations (21). FIC indices of the 54 MRSA clinical isolates were calculated, and interaction effects were recorded as synergistic, additive, ineffective, and antagonistic.

A: Antibiotic in the combination

B: Green tea extract in the combination

$$FIC_A = \frac{\text{MIC values of A in the presence of B}}{\text{MIC of A alone}}$$

$$FIC_B = \frac{\text{MIC values of B in the presence of A}}{\text{MIC of B alone}}$$

$$\Sigma \text{ FIC index} = FIC_A + FIC_B$$

Σ FIC index ≤ 0.5 : synergistic,
 >0.5 and <1 : additive,
 ≥ 1 and $4 \leq$: ineffective,
 >4 : antagonistic.

RESULTS

Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC)

The MRSA (n = 90) isolates were mostly isolated from patients in internal medicine, orthopedics and traumatology and neurosurgery clinics. Table 1 shows the distribution of the MRSA isolates by clinics. The MRSA isolates were isolated from three types of clinical samples; wounds (54.4%), blood (30%), and urine (15.6%). According to the antibiogram results, 54 MRSA isolates (60%) were ciprofloxacin-resistant, while the remainder were ciprofloxacin-susceptible.

MIC Values of Ciprofloxacin-Resistant Isolates

MIC values of the 54 MRSA isolates for ciprofloxacin resistance were determined by using disc diffusion and liquid microdilution methods, respectively. The MIC values of the MRSA isolates for ciprofloxacin were

256 µg/ml for 19 isolates, 128 µg/ml for 17 isolates, 64 µg/ml for eight isolates, 32 µg/ml for two isolates, 16 µg/ml for three isolates, and 8 µg/ml for five isolates (Figure 1). The ciprofloxacin-resistant MRSA isolates had a MIC value of 8 to 256 µg/ml. MIC₅₀ and MIC₉₀ were 128 and 256 µg/ml, respectively. Methicillin-resistant *S. aureus* (ATCC 43300, standard strain) had a ciprofloxacin MIC value of 128 µg/ml similar to tested isolates.

The MIC values of the ciprofloxacin-resistant MRSA isolates against GTE were 256 µg/ml for two isolates, 128 µg/ml for 10 isolates, 64 µg/ml for 27 isolates, 32 µg/ml for 12 isolates, and 16 µg/ml for three isolates (Figure 1). The MIC values of the ciprofloxacin-resistant MRSA isolates against GTE ranged from 16 to 256 µg/ml. MIC₅₀ and MIC₉₀ were 64 and 128 µg/ml, respectively. The MIC value of the MRSA (ATCC 43300) against GTE was 64 µg/ml.

Table 1. Clinical distribution of MRSA isolates (n = 90)

Unit	Number of Isolates	%
Internal Medicine	14	15.6
Orthopedics and Traumatology	14	15.6
Neurosurgery	12	13.3
Pediatrics	11	12.2
Anesthesia and Reanimation	10	11.1
Infectious Diseases	6	6.7
General Surgery	6	6.7
Neurology	5	5.6
Urology	5	5.6
Thoracic Surgery	3	3.3
Cardiology	2	2.2
Otorhinolaryngology	1	1.1
Plastic and Reconstructive Surgery	1	1.1
Total	90	100

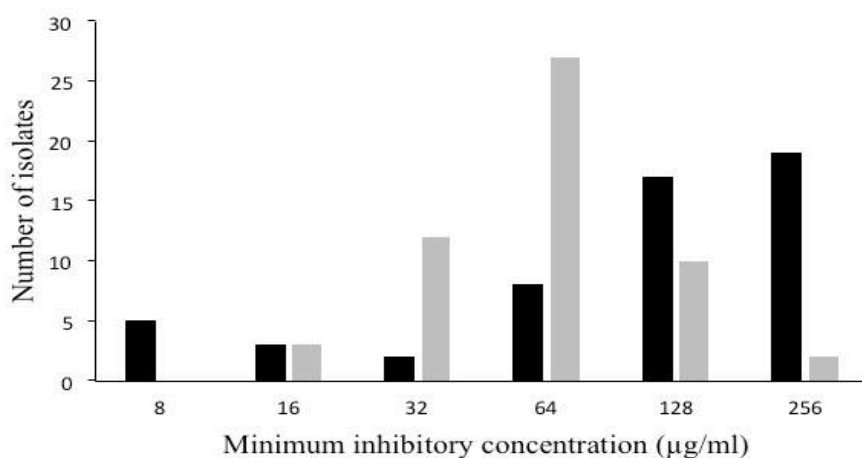


Figure 1. Minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin (■) and green tea extract (■) on isolated MRSA strains (n = 54)

CIP + GTE Synergy Testing of Ciprofloxacin-Resistant Isolates

Figure 2 shows the MIC values of CIP + GTE combinations for the ciprofloxacin-resistant MRSA isolates (checkerboard dilution method). The MIC values of the ciprofloxacin-resistant MRSA isolates against ciprofloxacin and GTE combinations were 1 to 4 µg/ml, 1 to 8 µg/ml, and 16 to 64 µg/ml for one isolate each, 2 to 8 µg/ml for five isolates, 4 to 6 µg/ml for nine isolates, 8 to 32 µg/ml for 22 isolates, 32

to 64 µg/ml for 13 isolates, and 64 to 128 µg/ml for two isolates (Figure 2).

According to the FIC values, ciprofloxacin and green tea extract combinations had no effect on 18 MRSA isolates (33.3%), an additive effect on MRSA isolates (31.5%), and a synergistic effect on 19 MRSA isolates (35.2%) (Table 2). According to the mean Σ FIC value (0.74), green tea extract had an additive ciprofloxacin effect on the isolates.

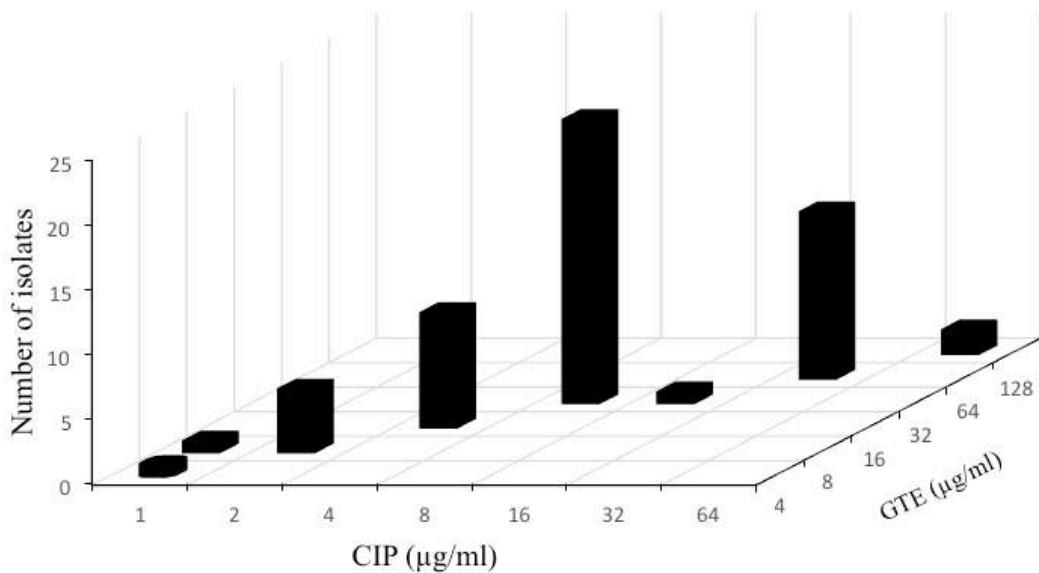


Figure 2. Minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin (CIP) and green tea extract (GTE) combinations on isolated MRSA strains (n = 54)

Table 2. Antimicrobial effect of ciprofloxacin and green tea extract combination on MRSA strains based on calculated sum of fractional inhibitory concentration indices

Interaction	Isolate Number	Total
Ineffective	4, 10, 11, 12, 16, 22, 26, 32, 33, 38, 65, 66, 69, 71, 73, 74, 75, 86	18 (33.3%)
Additive	1, 13, 14, 17, 19, 25, 29, 36, 39, 40, 41, 61, 67, 70, 77, 81, 84	17 (31.5%)
Synergistic	2, 6, 7, 8, 18, 27, 28, 35, 37, 42, 43, 58, 60, 68, 72, 80, 83, 87, 88	19 (35.2%)

DISCUSSION and CONCLUSION

Ciprofloxacin has an antibacterial effect on some MRSA strains, however, resistance can be developed over time. MRSA strains isolated from some regions of Mexico had almost 100% ciprofloxacin-resistance (22, 23). Altoparlak et al. (24) reported a 48% ciprofloxacin-resistance of 83 MRSA strains isolated from the Eastern Anatolia region of Turkey. In this study, samples had a 60% of ciprofloxacin-resistant MRSA isolates, indicating a clear increase in ciprofloxacin resistance. This may be because ciprofloxacin has a broad spectrum and is available both orally and intravenously.

Studies have focused on the antimicrobial activity of green tea extract alone or in combination with various antibiotics against MRSA isolates. Abaza et al. (25) isolated 81 MRSA strains from nasal carriers and investigated the antimicrobial activity of green tea extract with the disc diffusion method. Green tea extract was reported as strongly effective (55% with a zone diameter > 20mm) or moderately effective (45 % with a zone diameter > 16-20mm) on the isolates. Mahmoud et al. (26) looked into the synergistic effect of green tea catechins + antibiotics on MRSA isolates. 57 (83%) out of 90 MRSA isolates resulted in MIC values of 64 to 256 µg/ml for epigallocatechin-3-gallate (EGCG). Mahmoud et al. (26), therefore, concluded that ciprofloxacin and EGCG had a synergistic effect on MRSA isolates. Radji et al. (12) used the disk diffusion method and the broth microdilution (BMD) method to investigate the effect of green tea extract on an MRSA isolate and a methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) standard isolate. Two isolates showed similar green tea extract zone diameters and MIC values. In this study, the MIC values of the MRSA isolates were analyzed using BMD method, and MIC₅₀, MIC₉₀ were found to be 64 mg/ml and 128 mg/ml, respectively. Abascal and Yarnell (27) reported that green tea exposed potential benefits and synergistic effect in terms of antimicrobial activity against many pathogenic microorganisms, including MRSA

when combined with β-lactam antibiotics. In this study, the synergistic effect of green tea extract and ciprofloxacin on MRSA isolates was tested by using the checkerboard dilution method. According to the MIC values, green tea extract had no synergistic effect on 18 MRSA isolates (33.3%), whereas it had an additive effect on MRSA isolates (31.5%), and a synergistic effect on 19 MRSA isolates (35.2%). According to the mean ΣFIC value (0.74), green tea extract had an additive ciprofloxacin effect on the isolates.

Green tea has an anti-staphylococcal effect by inhibiting the PBP2 synthesis and beta lactamase release in anti-staphylococcal effect. Green tea can also be regarded as a new approach in the treatment of MRSA (28). Peng et al. (29) measured the amount of catechin in green tea using high-performance liquid chromatography (HPLC) to detect the development of resistance of catechin against β-lactam antibiotics in staphylococci. They focused on the antibacterial effect of combined with tea extract. They found that tea extract combined with tested antibiotics (ampicillin, cefazolin, and oxacillin) had a synergistic effect on MRSA with the exception of amoxicillin. In fact, amoxicillin, when combined with tea extract, had higher MIC values. Therefore, Peng et al. (29) recommended that patients who are on amoxicillin treatment not consume green tea. Research in general shows that green tea causes a decrease in the MIC values of beta lactam antibiotics in MRSA isolates. Cho et al. (30) observed that green tea polyphenols resulted in a reduction in the MIC value of oxacillin on MRSA isolates oxacillin. They analyzed the susceptibility of 13 strains of MRSA with green tea extract and oxacillin combination and found that the combination lowered MIC values at ratios between 1/8 and 1/128. Polyphenols stimulated the expression of various proteins in the bacterium was concluded as reason for a synergistic effect on the bactericidal activity of oxacillin.

Many studies explain the reasons for the differences in synergy rates. For example, although the checkerboard dilution method may seem like

a standard method, limit values for determining the interaction type after selecting the wells and calculating FIC values index differ. Most researchers in Turkey use the E-test because of its easy use (31). Few researchers using the checkerboard dilution method do not clearly explain which method is used to interpret the checkerboard plate despite limited values used for synergy identification. Synergistic activity rates depend not only on the existing methods but also on the isolates to be tested. Combinations of antibiotics with green tea extracts recommended by earlier in-vitro studies can be empirically used to treat *S. aureus* infections in patients with multiple drug resistance. However, isolates with high resistance or susceptibility to an antimicrobial agent may alter synergistic activity. Paramount importance of synergy testing is to determine the activity of a potential combination against strains isolated from a patient. In addition, in vitro studies do not always represent actual in vivo interactions.

In conclusion, the results of present study indicated that ciprofloxacin is a common antibacterial agent used to treat infections caused by MRSA strains. Green tea has reportedly good antibacterial activity against numerous microorganisms with a synergistic effect in combination with antibiotics. Rates of resistance in MRSA vary, and therefore, researchers focus on developing new treatment protocols, new antibiotics, and new combination therapies. Antimicrobial drug combinations are used to achieve a broad spectrum, to prevent the development of resistant isolates, to minimize toxicity, and to increase the synergistic effect between two drugs. Green tea extract alone and in combination with antibiotics (green tea extract + ciprofloxacin) has a synergetic effect in the treatment of MRSA infections and may also help to reduce potential ciprofloxacin-related side effects. Further research should be performed on more strains and different antibiotic combinations for the treatment of MRSA infections.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Atatürk University Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: 08.12.2016 and Number: Meeting number 7 and decision Number 10).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Jevons MP, Coe A, Parker M. Methicillin resistance in staphylococci. *The Lancet*, 1963; 281: 904-907.
2. Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Stefani S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evolution: the multiple facets of an old pathogen. *Eur Infec Dis*, 2010; 4: 70-76.
3. Stefani S, Goglio A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *Int J Infect Dis*, 2010; 14: 19-22.
4. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 2008.
5. Balows A, Hausler WJ, Herman KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. *Manual of clinical microbiology*. Washington, DC: ASM Press, 1991.
6. Öztürk R, Midilli K, Ergin S, Aygün GCT. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde yatan hastalardan izole edilen stafilocokların antimikrobik maddelere duyarlılıkları. *Ankem Derg*, 1996; 10: 48-51.
7. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997; 61: 377-392.
8. Gündeş SG, Karadenizli A, Willke A. Hastane infeksiyonu olarak izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında çoğul antibiyotik direncinin değerlendirilmesi. *İnfek Derg*, 2000; 15: 303-6.
9. Günel E, Erdem H. Kinolonlar. *İç Hastalıkları Derg*, 2014; 21: 69-85.
10. Nitta T, Arai T, Takamatsu H. Antibacterial activity of extracts prepared from tropical and subtropical plants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Health Sci*, 2002; 48: 273-276.
11. Rios J, Recio M. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*, 2005; 100: 80-4.
12. Radji M, Agustama RA, Elya B, Tjampakasari CR. Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2013; 3: 663-7.
13. Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci*, 2006; 78: 2073-80.
14. Kim S, Ruengwilysup C, Fung D. Antibacterial effect of water-soluble tea extracts on foodborne pathogens in laboratory medium and in a food model. *J Food Prot*, 2004; 67: 2608-12.
15. Lee YS, Han CH, Kang SH, Lee SJ, Kim SV, Shin OR, et al. Synergistic effect between catechin and ciprofloxacin on chronic bacterial prostatitis rat model. *Int J Urol*, 2005; 12: 383-9.
16. Shibata H, Kondo K, Katsuyama R, Kawazoe K, Sato Y, Murakami K, et al. Alkyl gallates, intensifiers of β -lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005; 49: 549-55.
17. Taguri T, Tanaka T, Kouno I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol Pharm Bull*, 2004; 27: 1965-9.
18. Tiwari R, Bharti S, Kaur H, Dikshit R, Hoondal G. Synergistic antimicrobial activity of tea & antibiotics. *Indian J Med Res*, 2005; 122: 80-4.
19. Haddad F, Horn K, Carbonaro C, Aguero-Rosenfeld M, Wormser G. Evaluation of antibiotic combinations against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* using the E-test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2005; 24: 577-9.
20. Leber A. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 4th ed. Washington, DC: ASM Press, 2016: 1-23.
21. Kloos W, Bannerman T. *Staphylococci and Micrococcus*. In: *Manual of Clinical Microbiology*: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. Washington, DC: ASM Press, 1999: 264-82.
22. Delgado A, Riordan JT, Lamichhane-Khadka R, Winnet DC, Jimenez J, Robinson K, et al. Heterovancomycin-intermediate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a medical center in Las Cruces, New Mexico. *J Clin Microbiol*, 2007; 45: 1325-9.

23. O'Brien FG, Lim TT, Winnett DC, Combs GW, Pearson JC, Delgado A, et al. Survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from two hospitals in El Paso, Texas. *J Clin Microbiol*, 2005; 43: 2969-72.
24. Altoparlak Ü, Uslu H, Kireççi E, Aktaş F. Klinik örneklerden izole edilen stafilocoklarda antibiyotik direnci. *Ankem Derg*, 2002; 16: 69-72.
25. Abaza AF, Mohamed ON, El-Fiky FK, Ahmed KA. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the effect of tea extracts on isolates. *J Egypt Public Health Assoc*, 2016; 91: 135-43.
26. Mahmoud M, Alkhaleefah F, Sherif DM. Antimicrobial effects of epigallocatechin gallate and epicatechins of green tea on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus aureus*, including MRSA. *Nat Sci*, 2013; 11: 70-9.
27. Abascal K, Yarnell E. Herbs and drug resistance: part 1—Herbs and microbial resistance to antibiotics. *Altern Complement Ther*, 2002; 8: 237-41.
28. Yam TS, Hamilton-Miller JMT, Shah S. The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2 ' synthesis, and beta-lactamase production in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 1998; 42: 211-6.
29. Peng Q, Huang YC, Hou B, Hua DX, Yao F, Qian YS. Green tea extract weakens the antibacterial effect of amoxicillin in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infected mice. *Phytother Res*, 2010; 24: 141-5.
30. Cho Y. S, Schiller NL, Oh KH. Antibacterial effects of green tea polyphenols on clinical isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*, 2008; 57: 542-6.
31. ÖzsevenAG, Sesli ÇE, ÖzsevenL. Dama tahtası sinerji testi sonuçlarının farklı yöntemlerle yorumlanması sonuçlarımızı etkiliyor mu? *Mikrobiyol Bult*, 2012; 46: 410-20.

SARS-CoV-2 pozitif sağlık çalışanlarının gerçek zamanlı PCR döngü eşik değeri, klinik ve epidemiyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi

Evaluation of real-time PCR cycle threshold value, clinical and epidemiological characteristics of SARS-CoV-2 positive healthcare workers

Gül BAYRAM¹ (ID), Harun GÜLBUDAK² (ID), Aslıhan BEKÇİ² (ID), Seda TEZCAN ÜLGER² (ID), Gülçin YAPICI³ (ID), Gönül ASLAN² (ID)

ÖZET

Amaç: Sağlık çalışanları, yeni tip koronavirüs hastalığı (COVID-19) pandemisi sürecinde SARS-CoV-2'den en fazla etkilenen meslek grubudur. Sağlık çalışanlarının SARS-CoV-2 ile enfekte olması, diğer sağlık çalışanları, hastalar ve aileleri için enfeksiyon riski oluşturmaktadır. RT-qPCR yöntemi ile örnekteki viral yük ölçüsü döngü eşik değeri "cycle threshold (Ct)" olarak saptanmaktadır. RT-qPCR Ct değerinin, enfeksiyonun şiddeti ve bulaştırıcılığı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada SARS-CoV-2 RT-qPCR testi pozitif bulunan sağlık çalışanlarında sosyo-demografik faktörler, COVID-19 semptomları ve Ct değeri arasındaki ilişkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya SARS-CoV-2 RT-qPCR testi pozitif bulunan 300 sağlık çalışanı dahil edilmiştir. SARS-CoV-2 RT-qPCR testi, nazofarengeal ve orofarengeal sürüntü örneklerinden Bio-speedy SARS-CoV-2 RT-qPCR (Bioeksen, Türkiye) kiti ile yapılmıştır. Sağlık çalışanlarının RT-qPCR Ct değeri sonuçları düşük, orta ve yüksek olarak sınıflandırılarak viral yayılım riski ve sosyo-demografik özellikleri değerlendirilmiştir.

ABSTRACT

Objective: During the new coronavirus infectious disease (COVID-19) pandemic, healthcare workers are the occupational group most affected by SARS-CoV-2. Infection of healthcare workers with SARS-CoV-2 poses a potential risk of infection for other healthcare workers, patients and their families. The viral load measure in the sample is determined as the cycle threshold (Ct) with the RT-qPCR method. It has been reported that the RT-qPCR Ct value may be related to the severity and potential contagiousness of the infection. In this study, it was aimed to evaluate the relationships between socio-demographic factors, COVID-19 symptoms and Ct value in SARS-CoV-2 RT-qPCR positive healthcare workers.

Methods: In this study, 300 healthcare workers with positive SARS-CoV-2 RT-qPCR test were included. SARS-CoV-2 RT-qPCR test was performed from nasopharyngeal and oropharyngeal swab samples with Bio-speedy SARS-CoV-2 RT-qPCR (Bioeksen, Turkey) kit. The RT-qPCR Ct value results of healthcare staff patients were classified as low, medium and high, socio-demographic characteristics and the risk of viral spread was evaluated.

¹Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Mersin
²Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin
³Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Mersin



İletişim / Corresponding Author : Gönül ASLAN

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Çiftlikköy, Mersin - Türkiye
E-posta / E-mail : drgaslan@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 02.08.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 03.09.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.59913

Bayram G, Gülbudak H, Bekçi A, Tezcan Ülger S, Yapıcı G, Aslan G. SARS-CoV-2 pozitif sağlık çalışanlarının gerçek zamanlı PCR döngü eşik değeri, klinik ve epidemiyolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 13 - 24

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 300 sağlık çalışanında en az bir semptom gösterenlerin oranı %88,3 (n=265)'tür ve en sık görülen semptomlar kas-eklem ağrısı %39,7, halsizlik %33 ve boğaz ağrısı %30,7 olarak saptanmıştır. RT-qPCR Ct değeri medyanı 23,17 (19,3-29,4) olarak tespit edilmiştir ve sağlık çalışanlarının %59'unda Ct değeri düşük (<24,0) bulunmuştur. Ayrıca idari birimlerde çalışan personelin Ct değeri COVID-19 poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitesinde çalışanlardan daha düşük bulunmuştur (p=0,020). Ateşi olanlar ve COVID-19 semptom (ateş, öksürük, solunum sıkıntısı) grubundan en az birine sahip olanların olmayanlara göre Ct değeri daha düşük saptanmıştır (sırasıyla p=0,008, p=0,019). Olası bulaş kaynağı değerlendirildiğinde; sağlık çalışanlarının %22'sine hasta bakımı sırasında, %21'ine diğer sağlık çalışanlarından ve %23,3'üne hastane dışı bir kaynaktan bulaştığı belirlenmiştir.

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgular sağlık çalışanlarında görülen SARS-CoV-2 bulaşının büyük bir bölümünün hastane içerisinde gerçekleştiğini ancak hastane dışı temaslarda daha fazla viral yüke maruz kaldığını göstermiştir. Ayrıca hastalar ile fazla teması olmayan idari ve teknik personelin de potansiyel bulaş kaynağı olabileceği görülmüştür. Bu durum, sağlık personelinde bulaş riskini azaltmak için Kişisel Koruyucu Ekipman (KKE) kullanım kurallarına uyulması gerektiğini ve klinik dışında çalışan personelin de iş arkadaşlarıyla temasları sırasında maske ve mesafe kurallarına uyması gerektiğini yeniden ortaya koymuştur. Sağlık çalışanlarında ateş, öksürük, solunum sıkıntısı ve halsizlik belirtilerinden herhangi birisinin varlığında Ct değerinin daha düşük (viral yükün daha yüksek) olduğu belirlenmiştir. Bu belirtilerin varlığında sağlık çalışanlarına PCR testi yapılması ve test sonucu çıkıncaya kadar gerekli izolasyon önlemlerinin alınması bulaş olasılığını azaltacaktır.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, COVID-19, sağlık çalışanları, viral yük, eşik değeri (Ct)

Results: The rate of those who showed at least one symptom among the 300 health personnel included in the study was 88.3% (n=265) and the most common symptoms were muscle-joint pain 39.7%, fatigue 33% and sore throat 30.7%. The median RT-qPCR Ct value was determined as 23.17(19.3-29.4) and Ct value was found to be low (<24.0) in 59% of healthcare personnel. In addition, the Ct value of the personnel working in the administrative units was found to be lower than those working in the COVID-19 polyclinic, service and intensive care unit (p=0.020). Those who had fever and at least one of the COVID-19 symptom (fever, cough, respiratory distress) group had a lower Ct value than those who did not (p=0.008, p=0.019, respectively). When the possible source of transmission was evaluated, it was determined that 22% of the health personnel were infected during patient care, 21% from other health personnel and 23.3% from non-hospital sources.

Conclusion: Our results have shown that most of the SARS-CoV-2 transmission seen in healthcare workers occurs within the hospital, but more viral load is exposed in out-of-hospital contacts. In addition, it has been observed that administrative personnel who do not have contact with patients can be a potential source of transmission. This situation has reaffirmed that Personal Protective Equipment (PPE) usage rules should be followed in order to reduce the risk of transmission in healthcare personnel and that personnel working outside the clinic should follow the mask and distance rules during their contact with their colleagues. It was determined that the Ct value was lower (higher viral load) in the presence of any of the symptoms of fever, cough, respiratory distress and fatigue in healthcare workers. In the presence of these symptoms, PCR testing of healthcare workers and taking necessary isolation measures until the test result is obtained will reduce the possibility of transmission.

Key Words: SARS-CoV-2, COVID-19, healthcare workers, viral load, cycle threshold (Ct)

GİRİŞ

Aralık 2019’da Çin’de ortaya çıkan ve bütün dünyaya yayılarak pandemiye neden olan koronavirüs enfeksiyon hastalığı-2019 (COVID-19)’un etkeni şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) virüsü pozitif polariteli, helikal kapsidli ve tek sarmallı bir RNA virüsüdür (1). SARS-CoV-2 ile enfekte hastalar COVID-19’u asemptomatik geçirebildiği gibi, hafif semptomatikten yoğun bakım tedavisi gerektiren ciddi enfeksiyona kadar değişen geniş bir prognoz aralığı göstermektedir (2). COVID-19 hastalığında ileri yaş, hipertansiyon, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek yetmezliği, kronik akciğer hastalıkları, kanser ve obezite önemli risk faktörleri arasında sıralanmaktadır (3).

Çin’de deniz ürünleri pazarından çıktığı düşünülen COVID-19 hastalığı için ilk risk altındaki meslek grubu bu pazarda çalışan kişiler olmuştur (4). Ancak COVID-19 pandemi sürecinde hastaların tanı, tedavi ve takibinde rol oynayan sağlık çalışanları SARS-CoV-2’den en fazla etkilenen meslek grubu olmuştur (4,5). Dünya genelinde SARS-CoV-2 yayılımını önlemek ve hastalığa yakalanma riskini azaltmak için normal popülasyona izolasyon ve karantina önlemleri uygulanırken sağlık personeli çalışmaya devam etmiştir (5). Bunun sonucunda COVID-19 vakalarının %14-35’inin sağlık çalışanlarında görüldüğü ve COVID-19 riskinin topluma göre 12 kat daha fazla olduğu raporlanmıştır (6,7). Ülkemizde, 140.000’in üzerinde sağlık çalışanının enfekte olduğu ve 391 sağlık çalışanının hayatını kaybettiği bildirilmiştir (8). Sağlık çalışanlarının SARS-CoV-2 ile enfekte olması diğer sağlık çalışanları, hastalar ve aileleri için enfeksiyon riski oluşturmaktadır (9-11). Ancak sağlık çalışanlarında ev içi bulaş ya da nozokomiyal bulaş ile ilgili yapılan çalışma sayısı sınırlıdır (9,10,12-14). SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tanı, tarama ve sürveyansında kullanılan standart yöntem ters transkripsiyonlu (RT) gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR)’dur (15). RT-qPCR yöntemi ile örnekteki viral yük ölçüsü döngü eşik değeri “cycle

threshold (Ct)” olarak saptanır ve viral yük ile ters orantılıdır. Ct değeri ne kadar düşüğe örnekteki viral RNA miktarı o kadar yüksektir (16). RT-qPCR Ct değerinin, enfeksiyonun şiddeti ve bulaştırıcılığı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (17). Bu nedenle SARS-CoV-2 pozitifliğinde Ct değerlerinin yorumlanması da önemlidir. SARS-CoV-2 pozitif sağlık çalışanlarında RT-qPCR Ct değeri sonuçlarının takip edilmesi viral yayılımının kontrolünde önemli parametrelerden biridir. Bu çalışmada, SARS-CoV-2 RT-qPCR testi pozitif bulunan sağlık çalışanlarında sosyo-demografik faktörler, COVID-19 semptomları ve Ct değeri arasındaki ilişkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Bilimsel Çalışma Platformu’ndan izin alınmış (Tarih: 21.03.2021 ve Karar No: Gönül Aslan-2021-03-19T21_48_31) ve Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:28.04.2021 ve Karar No: 2021/345).

Bu çalışmada, 14 Nisan 2020-31 Mart 2021 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Hastanesi COVID-19 laboratuvarında SARS-CoV-2 RT-qPCR testi pozitif bulunan 378 sağlık çalışanının verileri değerlendirilmiştir. Klinik bilgilerine ulaşılamayan (72 kişi) ve tekrarlayan sonuçlar (6 kişi) dışlanarak, çalışma 300 sağlık çalışanının verileriyle gerçekleştirilmiştir. SARS-CoV-2 PCR test sonuçları hastane bilgi sisteminden elde edilmiştir. Sağlık çalışanlarının sosyo-demografik özellikleri (yaş, cinsiyet, medeni durum, kronik hastalık varlığı, sigara içme, evde yaşadığı kişi sayısı), mesleği, hastalandıkları sırada çalıştıkları birim, tanı konduğu andaki semptomları, hastalığı kendilerine bulaştıran olası kaynak, evde kendisi dışında COVID-19 hastası veya semptomu olan kişi bilgileri hasta dosyalarından yararlanılmıştır.

SARS-CoV-2 bulaş kaynağının kesin olarak belirlenmesi zordur. Bu nedenle çalışmada, hasta

olan sağlık çalışanlarının beyanı dikkate alınarak olası kaynak değerlendirmesi yapılmıştır. Buna göre; COVID-19 inkübasyon süresi ortalama 5-6 gün kabul edilerek, sağlık çalışanının PCR testi pozitif bulunduğu tarihten önceki altı gün içerisinde temasta bulunduğu kişiler ve bu kişilerin arasında COVID-19 tespit edilme durumu dikkate alınarak olası kaynak araştırması yapılmıştır.

SARS-CoV-2 RT-qPCR testi, viral transport besiyeri (VTM) veya viral nükleik asit tamponu (vNAT) içeren tüplere alınan nazofarengeal ve orofarengeal sürüntü örneklerinden Bio-speedy SARS-CoV-2 RT-qPCR (Bioeksen, Türkiye) kiti ile Qiagen Rotor-Gene Q5plex real time PCR cihazında yapılmıştır. RT-qPCR Ct değeri sonuçları düşük, orta ve yüksek viral yük olarak gruplandırılmıştır. Buna göre Ct değeri <24 olan hastalar yüksek viral yük, 24 ile ≤ 30,9 arasında olanlar orta viral yük, 31-38 arasında olanlar ise düşük viral yük grubu olarak sınıflandırılmıştır (18,19).

Çalışmada, hastaların semptomları ile Ct değerleri arasındaki ilişki her semptom için tek tek ve semptomlar gruplandırılarak değerlendirilmiştir. Gruplarda belirtilen semptomlardan en az birinin olması bu grupta yer almasını belirlemiştir. Semptom grupları; üst solunum yolu belirtileri (burun akıntısı, boğaz ağrısı ve konjonktivit), alt solunum yolu belirtileri (öksürük, solunum sıkıntısı, göğüs ağrısı), gastrointestinal sistem belirtileri (karın ağrısı, bulantı, kusma, ishal), kas-eklem belirtileri (kas-eklem ağrısı, baş ağrısı, halsizlik), COVID-19 semptom grubu (ateş, öksürük, nefes darlığı; COVID-19 vaka tanımındaki en önemli üç belirti) olarak sınıflandırılmıştır (20, 21).

İstatistik Analiz

Sürekli değişkenlerin normal dağılım uygunluğu Kolmogorov-Simironov testi ile değerlendirilmiştir. Verilerin özetlenmesinde sürekli değişkenler için ortalama±standart sapma (ort±SS), medyan, %25 ve %75 persentil değerleri (Q1 ve Q3), kategorik değişkenler için sayı ve yüzde kullanılmıştır. Normal dağılıma uyan değişkenlerin karşılaştırmalarında bağımsız gruplarda Student-t testi, ikiden fazla grup ortalamalarının karşılaştırılmasında tek yönlü

varyans analizi (ANOVA) ve Post Hoc test olarak Tukey testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uymayan değişkenlerin analizinde iki grup arasındaki farkın önemliliğinin değerlendirilmesinde, Mann-Whitney U testi yapılmıştır. İki sürekli değişken arasındaki ilişki Spearman korelasyon testi ile değerlendirilmiştir. Kategorik değişkenlerin analizi için Ki-Kare testi kullanılmıştır. İstatistik anlamlılık sınırı p=0,05 olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 300 sağlık çalışanının %54,3 (n=163)'ü kadın, %59,7 (n=157)'si evli olup medyan yaş 31.0 (26.0-40.0) yıl bulunmuştur. Çalışanlardan %15,4 (n=39)'ünün kronik bir hastalığı olup %17,8 (n=42)'i sigara içmektedir. Sağlık çalışanı ile aynı evi paylaşan medyan kişi sayısı 2,0 (1,0-3,0) ve SARS-CoV-2 PCR testi pozitif bulunduğu evde yaşadığı ve COVID-19 tanısı alan ya da semptomu olan medyan kişi sayısı 0,0 (0,0-1,0) olarak saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen sağlık çalışanlarının %34,3 (n=103)'ü hemşire, %24,7 (n=74)'si destek ve temizlik personeli, %17,0 (n=51)'si doktor olarak belirlenmiştir. Sağlık çalışanlarının SARS-CoV-2 testi pozitif bulunduğu %22,4 (n=67)'ünün dahili birimlerde, %20,3 (n=61)'ünün cerrahi birimlerde ve %16,0 (n=48)'sının çocuk sağlığı ve hastalıkları birimlerinde çalıştığı belirlenmiştir (Tablo 1).

Çalışma süresi içerisinde beş sağlık çalışanının iki kez SARS-CoV-2 ile enfekte olduğu belirlenmiş ve her iki enfeksiyon sırasında da semptomları olduğu tespit edilmiştir. Bu beş sağlık çalışanının hemşire olduğu ve COVID-19 tespit edildiği sırada birinin acilde, birinin anestezi ve reanimasyonda, birinin nörolojide, birinin kardiyolojide ve diğerinin primer enfeksiyon sırasında cerrahi serviste, ikinci kez enfekte olduğunda ise COVID-19 polikliniğinde çalıştığı saptanmıştır. Reenfeksiyon görülen çalışanlarda iki enfeksiyon arasındaki en kısa süre 15 hafta, en uzun süre 45 hafta olarak belirlenmiştir. Bu grubun primer enfeksiyon döneminde tespit edilen ortalama Ct

Tablo 1. SARS-CoV-2 pozitif sağlık personellerinin özellikleri

Cinsiyet (n=300)	n (%)
Kadın	163 (54,3)
Erkek	137 (45,7)
Medeni durum (n=263)	
Evli	157 (59,7)
Bekar	106 (40,3)
Kronik hastalık (n=254)	
Var	39 (15,4)
Yok	215 (84,6)
Sigara içme durumu (n=236)	
Evet	42 (17,8)
Hayır	194 (82,2)
Meslek (n=300)	
Doktor ve intern doktor	51 (17,0)
Hemşire	103 (34,3)
Destek ve temizlik personeli	74 (24,7)
Sağlık teknisyeni	19 (6,3)
Tıbbi sekreter	23 (7,7)
İdari ve teknik görevli	30 (10,0)
Hastalık tanısı bulunduğu birim (n=300)	
Dahili birimler	67 (22,4)
Cerrahi birimler	61 (20,3)
Çocuk sağlığı ve hastalıkları	48 (16,0)
COVID poliklinik, servis ve yoğun bakım	28 (9,3)
Acil servis	26 (8,7)
Teknik ve güvenlik birimi	22 (7,3)
Görüntüleme ve laboratuvarlar	19 (6,3)
Ameliyathane ve reanimasyon	17 (5,7)
İdari birimler	12 (4,0)
Toplam	300 (100)

değeri (32,41) reenfeksiyon dönemine göre (22,79) daha yüksek bulunmuştur.

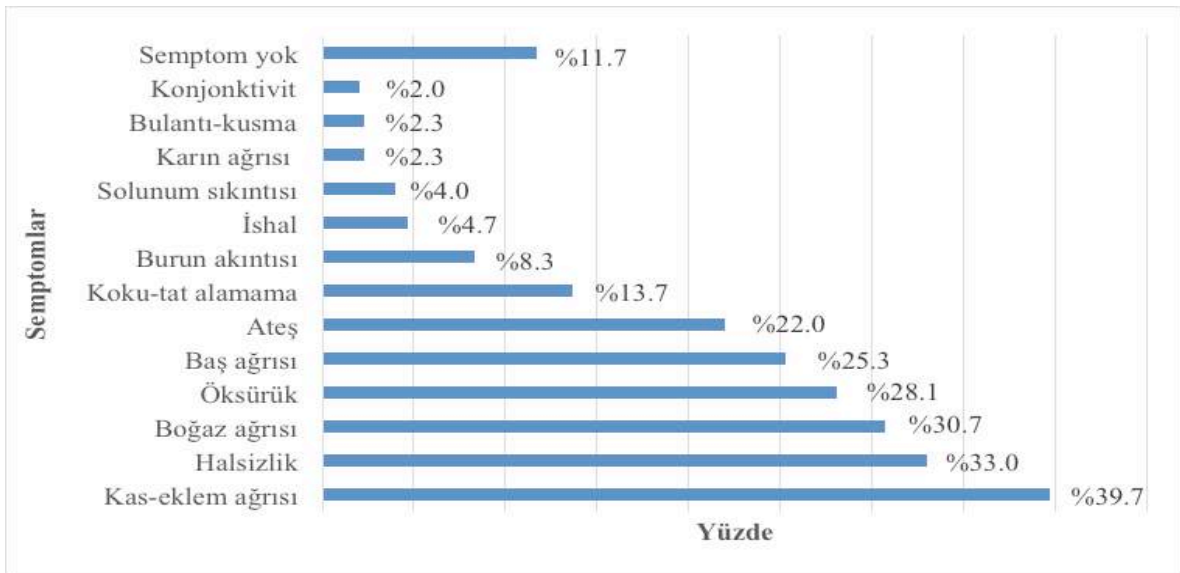
RT-qPCR Ct değeri medyanı 23,17 (19,3-29,4) olarak belirlenmiştir. Ct değeri kategorize edilerek gruplandırıldığında; sağlık çalışanlarının %59,0 (n=177)'unun Ct değeri <24,0, %26,3 (n=79)'ünün 24,0-30,9 arasında ve %14,7 (n=44)'sinin \geq 31,0 olarak saptanmıştır. Ayrıca %9,7 (n=29)'sinde Ct değeri \geq 34 bulunmuştur.

Çalışmada, sağlık çalışanlarının PCR testi pozitif bulunduğu tarihten önce temasta bulunduğu kişiler ve bunlar arasında COVID-19 pozitif olanlar dikkate alınarak olası bulaş kaynağı değerlendirildiğinde; %22 (n=66)'sine hasta bakımı ile ilişkili olarak bulaştığı, %21(n=63)'ine hastanede beraber çalıştığı diğer sağlık çalışanından ve %23,3 (n=70)'üne hastane dışı bir kaynaktan bulaştığı düşünülmüştür. Sağlık çalışanlarının %33,7 (n=101)'sinde ise herhangi bir bulaş kaynağı belirlenememiştir.

Çalışmamızda, SARS-CoV-2 pozitif bulunduğu anda en az bir semptom gösterenlerin oranı %88,3 (n=265) ve en sık görülen semptomlar kas-eklem ağrısı, halsizlik ve boğaz ağrısı (sırasıyla %39,7, %33,0, %30,7) olarak tespit edilmiştir (Şekil 1).

Semptomlar ile Ct değeri karşılaştırıldığında; ateşi olanların ve COVID-19 semptom (ateş, öksürük, solunum sıkıntısı) grubundan en az birine sahip olan çalışanların olmayanlara göre Ct değeri istatistiksel olarak daha düşük saptanmıştır (p=0,008, p=0,019).

Ct değeri ile sağlık çalışanlarının bazı özellikleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde; yaş, cinsiyet, medeni durum, kronik hastalık varlığı, sigara içme durumu, evde yaşayan kişi sayısı ve evde COVID-19 tanısı alan veya semptomu olan kişi sayısı ile Ct değeri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Ancak sağlık çalışanlarının mesleği ve COVID-19 tanısı aldıkları sırada çalıştıkları birim ile Ct değeri arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır. Sağlık teknisyenlerinin Ct değeri tıbbi sekreterlere göre; idari ve teknik personellerin Ct değeri ise tıbbi sekreterler ve hemşirelere göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (p=0,001). Ayrıca, idari birimlerde çalışanların Ct değeri COVID-19 poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitesinde çalışan personellerden anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır (p=0,020) (Tablo 2).



Şekil 1. Sağlık personellerinde görülen semptomlar

*Bir hastanın birden fazla semptomu bulunmaktadır.

Tablo 2. SARS-CoV-2 pozitif sağlık personellerinin sosyodemografik özellikleri ile Ct değeri arasındaki ilişki

Özellik	Ort±SD/Medyan(Q1-Q3)	p
Cinsiyet		
Kadın	23,06 (19,7-28,6)	0,071
Erkek	21,5 (18,7-26,7)	
Medeni durum		
Evli	22,9 (19,4-28,5)	0,589
Bekar	22,6 (18,8-28,8)	
Kronik hastalık		
Var	22,5 (20,4-29,3)	0,275
Yok	22,7 (18,8-28,5)	
Sigara içme		
Evet	22,0 (18,2-31,3)	0,712
Hayır	22,9 (19,4-28,5)	
Meslek		
Tıbbi sekreter	27,4±7,2 ^{1,2}	0,001
Hemşire	24,6±6,6 ³	
Destek ve temizlik personeli	23,7±6,1	
Doktor ve intern doktor	22,9±6,3	
Sağlık teknisyeni	20,8±3,8 ¹	
İdari ve teknik görevli	20,6±4,0 ^{2,3}	
Çalıştığı birim		
COVID poliklinik, servis ve yoğun bakım	26,1±7,6 ¹	0,020
Cerrahi birimler	25,1±6,9	
Dahili birimler	24,0±6,4	
Ameliyathane ve reanimasyon	23,7±4,9	
Çocuk sağlığı ve hastalıkları	23,5±6,8	
Görüntüleme ve laboratuvarlar	22,5±4,2	
Teknik ve güvenlik birimi	21,9±5,3	
Acil servis	21,6±4,3	
İdari birimler	19,3±2,7 ¹	

Ort±SD=Ortalama±Standart sapma

^{1,2,3}:Farkı oluşturan gruplar

Ct değeri (<24 olan hastalar yüksek viral yük, 24-30,9 arasında olanlar orta viral yük, 31-38 arasında olanlar düşük viral yük) sınıflandırılarak semptomlarla ilişkisi değerlendirildiğinde; halsizliği olanların (%7,1) olmayanlara göre (%18,4), en az bir semptomu olanların (%12,8) semptomu olmayanlara (%28,6) göre düşük viral yük sıklığı daha az tespit edilmiştir ($p=0,005$, $p=0,014$). Yani halsizlik şikayeti olanlar ve herhangi bir semptomu olanların viral yükleri büyük oranda orta veya yüksek olarak saptanmıştır.

Olası SARS-CoV-2 enfeksiyon kaynağı olarak işyeri dışı (%10) ve kaynağın belirlenemediği gruplarda (%7,9) düşük viral yük sıklığı, kaynağı hasta (%18,7) ve işyerindeki arkadaşı (%27,0) olan gruplara göre daha az saptanmıştır ($p=0,012$). Diğer bir ifadeyle olası SARS-CoV-2 enfeksiyon kaynağı işyeri dışında olanlar ve kaynağı belirlenemeyenlerin viral yükleri büyük oranda orta veya yüksek bulunmuştur.

TARTIŞMA ve SONUÇ

COVID-19 pandemisinde, ön safta çalışan sağlık çalışanları, enfekte olmaları halinde birlikte çalıştıkları diğer sağlık çalışanları, hastalar ve aileleri için bulaş riski oluşturmaktadırlar (22). Sağlık çalışanlarının SARS-CoV-2 ile enfekte olmasına neden olan risk faktörleri, COVID-19 hastaları ile yakın temas, KKE eksikliği, uzun çalışma saatleri, yorgunluk, stres ve KKE'lerin doğru kullanılmaması olarak sıralanmaktadır (23, 24). COVID-19'lu hastalarda, yüksek viral yük ile bulaştırıcılık arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (16, 25, 26). RT-qPCR Ct değeri, SARS-CoV-2 bulaştırıcılık döneminin belirlenmesi, izolasyon ve karantina uygulamaları, personellerin işe dönüş zamanının belirlenmesi gibi hasta yönetiminde kullanılan parametrelerden biridir (16, 27). Şiddetli COVID-19 hastalarında Ct değerinin düşük olduğu bildirilmiştir (16, 28). Ancak semptomatik ve asemptomatik hastaların Ct değeri sonuçlarının benzer olduğunu ve asemptomatik kişilerin de enfeksiyonun yayılmasında semptomatik hastalar kadar rol oynadığını gösteren çalışmalar

raporlanmıştır (24,29). COVID-19 hastalarında PCR pozitifliği her zaman enfektif virüs varlığını göstermez ve bunun için viral kültür yöntemlerinin kullanılması gerekir (16). Yapılan çalışmalarda, Ct değeri ile SARS-CoV-2 kültür pozitifliğinin ilişkili olduğu bildirilmiştir (25). Buna göre Ct değerinin artışı ile kültür pozitifliği azalmaktadır. Yapılan bir çalışmada, Ct değerindeki her birimlik artışın, kültür pozitiflik olasılığını %32 azalttığı bildirilmiştir (26). Ct değeri 33 olduğunda kültür pozitifliğinin %12 olduğu ve Ct değeri >35 olduğunda ise enfeksiyöz virüs olasılığının %6,9-8,3'e düştüğü raporlanmıştır (19, 25, 30).

Çalışmamızda SARS-CoV-2 pozitif 300 sağlık çalışanının medyan Ct değeri 23,17 (19,3-29,4) bulunmuştur. Sağlık çalışanlarının yarısından fazlasının (%59,0) Ct değerinin 24'ün altında olduğu belirlenmiştir. Bir çalışmada, SARS-CoV-2 pozitif sağlık çalışanlarının medyan Ct değeri 23,2 (19,9-25,3) bulunmuş ve yatan hastaların medyan Ct değeri 34 (27,9-41,4) daha düşük olduğu bildirilmiştir (24). Bu nedenle sağlık çalışanlarına COVID-19 tanısı konduğunda temaslı olduğu aile bireylerinin de SARS-CoV-2 enfeksiyonu açısından taranması gerektiği belirtilmiştir (11, 12). Çalışmamızda sağlık çalışanlarının Ct değeri ile aynı evde yaşayan ve COVID-19 tanısı alan ya da semptomu olan kişi sayısı arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Bunun nedeni, çoğu sağlık çalışanının pozitif hasta ile temas ettiğinde ya da COVID-19 tanısı aldığı anda kendilerini aile üyelerinden izole ederek onları enfeksiyondan koruduğu şeklinde açıklanabilir. Ancak Sağlık Bakanlığı'nın uygulamasında temaslı olan aile bireyleri veya iş arkadaşlarının izleminde temasının semptomu yoksa PCR testi yapılmadığı için gerçekte aile bireylerindeki PCR pozitif sayısı bilinemediği de dikkate alınmalıdır.

COVID-19 hastalarında en sık görülen semptomlar; ateş, öksürük, yorgunluk ve dispne olarak bildirilmiştir (31, 32). Sağlık çalışanları ile yapılan bir çalışmada ise ateş ve anosmi semptomları, SARS-CoV-2 PCR pozitifliği ile ilişkili bulunmuştur (10). Çalışmamızda ise sağlık çalışanlarında en sık

görülen semptomların kas-eklem ağrısı, halsizlik, boğaz ağrısı, öksürük, baş ağrısı ve ateş olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, sağlık çalışanlarının semptomları ile Ct değeri karşılaştırıldığında ateşi olanların ve COVID-19 semptom (ateş, öksürük, solunum sıkıntısı) grubundaki semptomlardan en az birini gösterenlerin Ct değeri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Buna göre sağlık çalışanlarında ateş, öksürük, solunum sıkıntısı gibi COVID-19 için tanımlanan semptomlardan herhangi birisinin varlığında kişide virüs viral yükü daha fazla olabilir ve bu durumda sağlık çalışanın çevresine daha fazla virüs bulaştırabileceği düşünülebilir. Bu şikayetleri belirlenen SARS-CoV-2 pozitif sağlık çalışanı ile temas eden hastalar, iş arkadaşları ve aynı evde yaşayan kişilerin temas şekillerine göre uygun önlemlerin alınması hastalığın yayılmasını önlemede yararlı olacaktır.

Sağlık çalışanlarında, COVID-19 epidemiyolojisinin değerlendirildiği bir çalışmada, klinik dışında çalışan personellerde (idari personel, güvenlik, destek personeli, temizlik personeli, teknik personel vd.) SARS-CoV-2 pozitifliği klinikte çalışan personellerden (doktor, hemşire, diş hekimi, vd.) daha yüksek (sırasıyla; %26,8 ve %9,8) oranda bildirilmiştir (14). Çalışmamızda SARS-CoV-2 pozitif sağlık çalışanlarının mesleklerine göre dağılımı sırasıyla; hemşire, destek ve temizlik personeli, doktor, idari ve teknik personel, tıbbi sekreter ve sağlık teknisyenleri şeklindedir. Sağlık çalışanlarının COVID-19 tanısı aldığı dönemde genellikle dahili, cerrahi ve çocuk sağlığı ve hastalıkları birimlerinde çalıştığı belirlenmiştir. Çalışmada sağlık çalışanlarının mesleği ve COVID-19 tanısı aldıkları sırada çalıştıkları birim ile Ct değeri arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır. Sağlık teknisyenlerinin Ct değeri tıbbi sekreterlere göre; idari ve teknik personellerin Ct değeri ise tıbbi sekreterler ve hemşirelere göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, idari birimlerde çalışanların Ct değeri COVID-19 poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitesinde çalışan personellerden anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır. Bu

durumun klinik birimlerde çalışan personellerde KKE kullanımının klinik dışı birimlere göre daha yaygın ve bilinçli olması ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızdaki sağlık çalışanlarında SARS-CoV-2 enfeksiyonunun olası bulaş kaynağı değerlendirildiğinde; sağlık çalışanlarının yarıya yakın bir bölümünün (%43) hasta bakımı ile ilişkili veya hastanede beraber çalıştığı diğer sağlık çalışanı olmak üzere çalışma ortamı kaynaklı olduğu görülmüştür. Ancak, olası SARS-CoV-2 enfeksiyon kaynağı işyeri dışında olanlar ve kaynağı belirlenemeyenlerin viral yükleri büyük oranda orta veya yüksek bulunmuştur. Bu durum sağlık çalışanlarının hastane dışında maske, kişiler arası uygun fiziksel mesafe gibi hastalıktan korunmak için gerekli uygulamaları yeterince yapmadıklarını düşündürmektedir.

Bu çalışmada, sağlık çalışanlarının sosyo-demografik özellikleri, COVID-19 semptomları ve Ct değerleri arasındaki ilişkiler incelenmiş ve olası bulaş kaynağı araştırılmıştır. Ancak, RT-qPCR yönteminde kullanılan reaksiyon kiti, hedeflenen gen bölgesi, PCR cihazı, örneğin kalitesi gibi PCR reaksiyonunu etkileyen faktörler Ct değerini etkilemektedir (16, 33). Ayrıca sağlık çalışanlarının örneklerinden viral genom analizi yapılmadığı için bulaş kaynağını kesin olarak ortaya koymak zordur.

Sonuç olarak, SARS-CoV-2 pozitif sağlık çalışanlarının %59'unda Ct değeri düşük bulunmuştur. Olası bulaş kaynağı olarak, %22'sinin hasta bakımı ile ilişkili, %21'inin hastane içi sosyal ilişkiler ve %23,3'ünün hastane dışı bir kaynaktan bulaştığı belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular sağlık çalışanlarında görülen SARS-CoV-2 bulaşının büyük bir bölümünün hastane içerisinde gerçekleştiğini ancak hastane dışı temaslarda daha fazla viral yüke maruz kalındığını göstermiştir. Ayrıca hastalar ile fazla teması olmayan idari ve teknik personellerin de potansiyel bulaş kaynağı olabileceği görülmüştür. Bu durum, sağlık personellerinde bulaş riskini azaltmak için KKE kullanım kurallarına uyulması gerektiğini ve klinik dışında çalışan personellerin de iş arkadaşlarıyla temasları sırasında maske ve mesafe kurallarına

uyuması gerektiğini yeniden ortaya koymuştur. Sağlık çalışanlarında ateş, öksürük, solunum sıkıntısı ve halsizlik belirtilerinden herhangi birisinin varlığında Ct değerinin daha düşük (viral yükün daha yüksek)

olduğu belirlenmiştir. Bu belirtilerin varlığında sağlık çalışanlarına PCR testi yapılması ve test sonucu çıkıncaya kadar gerekli izolasyon önlemlerinin alınması bulaş olasılığını azaltacaktır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:28.04.2021 ve Karar No: 2021/345).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, Groot RJ, Drosten CD, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*, 2020;5:536-4.
2. Bulut C, Kato Y. Epidemiology of COVID-19. *Turk J Med Sci*, 2020;50(SI-1):563-70.
3. Kuşçu F, Taşova Y. COVID-19 Kliniği ve yönetimi. *Arşv Kay Tar Derg*, 2020;29:24-30.
4. Nienhaus A, Hod R. COVID-19 among health workers in Germany and Malaysia. *Int J Environ Res Public Health*, 2020;17: 4881.
5. Barranco R, Ventura F. Covid-19 and infection in health-care workers: an emerging problem. *Med Leg J*, 2020;88(2): 65-6.
6. Keep health workers safe to keep patients safe: WHO. <https://www.who.int/news/item/17-09-2020-keep-healthworkers-safe-to-keep-patients-safe-who> World Health Organization, Erişim Tarihi:17.09. 2020.
7. Nguyen LH, Drew DA, Joshi AD, Guo CG, Ma W, Mehta RS, et al. Risk of COVID-19 among frontline healthcare workers and the general community: a prospective cohort study. *Lancet Public Health*, 2020;5: 475-83.
8. COVID-19 nedeniyle kaybettiğimiz sağlık çalışanları Türkiye'nin her yerinde anıldı. *Türk Tabipleri Birliği*. https://www.ttb.org.tr/kollar/COVID19/haber_goster.php?Guid=97bfa578-92f1-11eb-9b30-af7a56403e78, Erişim Tarihi: 01.04.2021.
9. McDade TW, McNally EM, Zelikovich AS, D'Aquila R, Mustanski B, Miller A, et al. High seroprevalence for SARS-CoV-2 among household members of essential workers detected using a dried blood spot assay. *Plos One*, 2020;15(8):1-8.
10. Krastinova E, Garrait V, Lecam MT, Coste A, Varon E, Delacroix I, et al. Household transmission and incidence of positive SARS-CoV-2 RT-PCR in symptomatic healthcare workers, clinical course and outcome: a French hospital experience. *Occup Environ Med*, 2020;0:1-7.
11. Wang X, Zhou Q, He Y, Liu L, Ma X, Wei X, et al. Nosocomial outbreak of COVID-19 pneumonia in Wuhan, China. *Eur Respir J*, 2020;55.
12. Rivett L, Sridhar S, Sparkes D, Routledge M, Jones NK, Forrest S, et al. Screening of healthcare workers for SARS-CoV-2 highlights the role of asymptomatic carriage in COVID-19 transmission. *Elife*, 2020;9:1-20.
13. Yapıcı G, Kurt AÖ, Solmaz ET, Tunç AY, Bozdağ F, Yalçın BNB, et al. Bir üniversite hastanesindeki sağlık çalışanlarının COVID-19 riskli temas durumlarının değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 2021;55(2):161-79.
14. Al-Kuwari MG, AbdulMalik MA, Al-Nuaimi AA, Abdulmajeed J, Al-Romaihi HE, Semaan S, et al. Epidemiology characteristics of COVID-19 infection amongst primary health care workers in Qatar: March-October 2020. *Front Public Health*, 2021;9:679254.
15. Drame M, Tabue TM, Proye E, Hequet F, Hentzien M, Kanagaratnam L, et al. Should RT-PCR be considered a gold standard in the diagnosis of COVID-19? *J Med Virol*, 2020;92(11):2312-13.
16. Rao SN, Manissero D, Steele VR, Pareja J. A narrative systematic review of the clinical utility of cycle threshold values in the context of COVID-19. *Infect Dis Ther*, 2020; 9:573-86.
17. Tom MR, Mina MJ. To Interpret the SARS-CoV-2 test, consider the cycle threshold value. *Clin Infect Dis*, 2020;71(16):2252-54.
18. Sarkar B, Sinha RN, Sarkar K. Initial viral load of a COVID19-infected case indicated by its cycle threshold value of polymerase chain reaction could be used as a predictor of its transmissibility - an experience from Gujarat, India. *Indian J Community Med*, 2020;45(3):278-282.
19. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C, Colson P, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2020;39:1059-61.

20. Symptoms of COVID-19. Centers for Disease Control and Prevention. Symptoms of COVID-19 <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>, Erişim Tarihi: 14.06.2021.
21. Salvatore PP, Dawson P, Wadhwa A, Rabold EM, Buono S, Dietrich EA, et al. Epidemiological correlates of polymerase chain reaction cycle threshold values in the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis*, 2020;72(11):761-7.
22. Chersich MF, Gray G, Fairlie L, Eichbaum Q, Mayhew S, Allwood B. COVID-19 in Africa: care and protection for frontline healthcare workers. *Glob Health*, 2020;16(1):46-56.
23. Shreffler J, Petrey J, Huecker M. The Impact of COVID-19 on healthcare worker wellness: A scoping review. *West J Emerg Med*, 2020;21(5):1059-66.
24. McEllistrem MC, Clancy CJ, Buehrle DJ, Singh N, Lucas A, Sirianni V, et al. SARS-CoV-2 is associated with high viral loads in asymptomatic and recently symptomatic healthcare workers. *PLoS One*, 2021;16(3):1-9.
25. Singanayagam A, Patel M, Charlett A, Bernal JL, Saliba V, Ellis J, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill*, 2020;25(32):1-5.
26. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, et al. Predicting infectious severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis*, 2020;71(10):2663-6.
27. Binnicker MJ. Can the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 polymerase chain reaction cycle threshold value and time from symptom onset to testing predict infectivity? *Clin Infect Dis*, 2020;71(10):2667-68.
28. Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis*, 2020;20(6):656-7.
29. Cereda D, Tirani M, Rovida F, Demicheli V, Ajelli M, Poletti P, et al. The early phase of the COVID-19 outbreak in Lombardy, Italy. *arXiv*, 2020:2003.09320
30. Yamada S, Fukushi S, Kinoshita H, Ohnishi M, Suzuki T, Fujimoto T, et al. Assessment of SARS-CoV-2 infectivity of upper respiratory specimens from COVID-19 patients by virus isolation using VeroE6/TMPRSS2 cells. *BMJ Open Respir Res*, 2021;8(1):1-5.
31. Yang J, Zheng Y, Gou X, Pu K, Chen Z, Guo Q, et al. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*, 2020;94:91-5.
32. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis*, 2020;34:101623.
33. Gülbudak H, Karvar Ş, Soydan G, Tezcan Ülger S, Kandemir Ö, Tamer L, et al. Comparison of real time pcr cycle threshold values in symptomatic and asymptomatic covid-19. Patients. *Mikrobiyol Bul*, 2021;55(3):435-44.

Kronik hastalığı olan erişkinlerin 2015-2017 yılları arasında influenzaya karşı aşılama durumları

Influenza vaccination status in adults with chronic diseases between 2015-2017

Halil EKİNCİ¹ (ID), Turan BUZGAN² (ID), Banu EKİNCİ³ (ID), Fatih KARA³ (ID),
Bekir KESKİNKILIÇ³ (ID), Hasan IRMAK³ (ID)

ÖZET

Amaç: Türkiye’de kronik hastalığı olanlarda cinsiyet ve yaş grubu faktörleri de göz önünde bulundurularak influenza aşısı yapılma oranlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 2011 yılında Türkiye Kronik Hastalıklar ve Risk Faktörleri Çalışması için verileri toplanan 18477 kişinin, elektronik sağlık kayıtlarından hastalık bilgileri alınmıştır. Erişkin aşılama oranlarında önerilen tüm aşılar arasında, 2015-2017 yılları arasında yeterli verisi bulunan kişilerin; sosyodemografik özellikler, kronik hastalık varlığı, yaş ve cinsiyete göre influenza aşılama oranları incelenmiştir.

Bulgular: Cinsiyete göre erkeklerde influenza aşılama oranı (yüzbinde 391) ile kadınların aşılama oranı (yüzbinde 367) arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. ($\chi^2 = 0,729$, $sd = 1$, $p=0,207$). Yaş grubuna göre (45-54, 55-64, 65-74 ve 75+ yaş grupları arasında) aşılama oranları anlamlı fark göstermiştir. ($\chi^2 = 183,012$, $sd = 3$, $p<0,001$). En yüksek oran 65-74 yaş grubundadır (yüzbinde 1525). Yaşla birlikte erişkin aşılama oranında yükselme eğilimi gözlenmiştir.

ABSTRACT

Objective: In Turkey, it was aimed to investigate the rate of influenza vaccination in patients with chronic diseases, taking into account the factors of gender and age group.

Methods: Disease information was obtained from the electronic health records of 18477 people whose data were collected for the Turkey Chronic Diseases and Risk Factors Study in 2011. Among all vaccines recommended in adult vaccination, for influenza vaccine with sufficient data in 2015-2017; Influenza vaccination rates according to sociodemographic characteristics, presence of chronic diseases, age and gender were examined.

Results: There was no significant difference between the influenza vaccination rate in men (391 per hundred thousand) and the vaccination rate of women (367 per hundred thousand) according to gender. ($\chi^2 = 0,729$, $sd = 1$, $p=0,207$). Vaccination rates by (in between 45-54, 55-64, 65-74 ve 75+) age group showed a significant difference ($\chi^2 = 183,012$, $sd = 3$, $p<0,001$). The highest rate is in the 65-74 age group (1,525 per hundred thousand). A tendency to increase in adult vaccination rate was observed with

¹Türk Kızılayı Genel Müdürlüğü Etimesgut Yerleşkesi, Ankara

²Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

³T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Halil EKİNCİ

Türk Kızılayı Gen. Müd. Etimesgut Yer., Türkkızılayı Cd. No:6, Etimesgut- Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 25.10.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 22.03.2022

NUTS bölgeleri bazında influenza aşılama oranları arasında da anlamlı farklılıklar olduğu gözlenmiştir ($\chi^2 = 115,832$, $sd = 11$, $p < 0,001$). En yüksek influenza aşılama oranı Ege Bölgesi'nde (yüzbinde 615) görülürken, en düşük aşılama oranının ise Kuzey Doğu Anadolu'da (yüzbinde 57) olduğu gözlenmiştir. Kronik hastalığı olanlar arasında influenza aşılamasının koroner kalp hastalarında en yüksek (binde 207) olduğu görülmektedir. En az aşılama oranının (binde 94) multimorbiditesi olan hasta grubunda olduğu gözlenmiştir. Hastalık bazında değerlendirildiğinde ise hipertansiyon tanısı olanlarda influenza aşılama oranının en düşük düzeyde (binde 104) olduğu görülmüştür. Örneklemde yer alan kişilerden ($n=18477$) 699'unun en az bir kere influenza aşısı yaptırdığı, 409 kişinin sadece 1 kere aşı yaptırdığı, 7 kişinin ise 4 kere aşı yaptırdığı belirlenmiştir.

Sonuç: Üç yıllık aşılama hızı ise yüzbinde 378 olarak hesaplanmıştır. Ülkemizde erişkin aşılama tartışmalarının tamamlanması ve erişkin aşılama programının aktif desteklenmesi önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: İnfluenza, kronik hastalık, koroner kalp hastalığı, erişkin bağışıklama

age. It was also observed that there were significant differences between influenza vaccination rates on the basis of NUTS regions ($\chi^2 = 115,832$, $sd = 11$, $p < 0,001$). The highest influenza vaccination rate was observed in the Aegean Region (615 per hundred thousand), while the lowest vaccination rate was observed in North East Anatolia (57 per hundred thousand). Among those with chronic diseases, influenza vaccination seems to be the highest in coronary heart patients (207 per thousand). It was observed that the lowest vaccination rate (94 per thousand) was in the patient group with multimorbidity. When evaluated on the basis of disease, it was observed that the rate of influenza vaccination was at the lowest level (104 per thousand) in those with a diagnosis of hypertension. It was determined that 699 of the people in the sample ($n=18477$) had influenza vaccination at least once, 409 individuals had only one vaccination, and 7 persons had been vaccinated 4 times.

Conclusion: The three-year vaccination rate was calculated as 378 per hundred thousand. In our country, it is important to complete the discussions on adult vaccination and to actively support the adult vaccination program.

Key Words: Influenza, chronic disease, coronary heart disease, adult immunization

GİRİŞ

Dünya nüfusu sürekli artmaktadır. Nüfusu belirleyen iki önemli faktör doğumlar ve ölümlerdir. Tüm ölümlerde hastalıkların rolü zaman içinde değişir ki bu bir epidemiyolojik geçiş teorisinin ortaya çıkışına yol açmıştır. Buna göre;

1. Ölümcül/Salgın Hastalık ve Kıtılık Evresi: Bu dönem, yüksek ve değişken ölümlülük hızları, düşük ortalama yaşam süresi ile değişken yaşam beklentisi

(20-40 yaş arasında) ve sürdürülemeyen nüfus artışı dönemleriyle nitelendirilir. Bu evrede yerleşik hayat yeni bir ekolojik dengesizlik oluşturarak insan ve hayvan atıkları, kirlenen sular ve insanlar ile hayvanlar arasında mikroorganizmaların tek taraflı yada karşılıklı aktarılmasına bağlı olarak bulaşıcı hastalıklarda artışa yol açmıştır (1).

2. Salgın Hastalıkların (Pandemiler) Gerileme Evresi: Erken modern dönemde ortaya çıkan bu evre, başlıca bulaşıcı hastalıklardan kronik denilen

hastalıklara doğru hastalık örüntüleri ve ölüm hızlarında bir değişimle karakterize edilmektedir. Bu evrede ölüm oranları kademeli olarak düşer; kontrolden çıkmış ve çok yayılmış salgın hastalıkların zirveye ulaşmasından sonra düşüş hızlanır, hastalık sıklığı azalır ve ortadan kaybolur. Nüfus katlanarak artmaya başlar. Teori, bulaşıcı hastalıktan ölümlerin azalması ile kronik ve dejeneratif hastalıkların artmasından kaynaklanan değişikliğe, nüfusun yaş dağılımında bir değişikliğin eşlik ettiğini (doğuşta yaşam beklentisi 30'dan 50 yıla yükselmiştir), bunun da endüstriyel kalkınmanın ve kentsel yaşamın oluşturduğu yeni gelişmeler sonucu olduğunu ileri sürmektedir (1).

3. Dejeneratif ve İnsan Kaynaklı Hastalıklar Evresi: Bu evrede teori, başlıca ölüm nedeni olarak bulaşıcı salgın hastalıkların bozulmaya bağlı (dejeneratif) hastalıklarla yer değiştirdiğini, ölüm ve hasta sayılarına en fazla katkıyı yapan bulaşıcı etmenlerin üstesinden geldiğini söylemektedir. Ölüm oranları düşmeye devam etmiş ve sonunda nispeten düşük bir düzeyde durağanlaşmıştır. Bu evrede nüfus artışında doğurganlık, kritik faktör halini almış, doğuşta yaşam beklentisi, 21. yüzyıl başında 75 yaşa ulaşmıştır (1).

Omran'ın çalışmasına sonradan dördüncü ve beşinci evre eklenmiştir (2).

Kavramsal olarak epidemiyolojik geçiş teorisi, sağlık ve hastalık süreçlerindeki karmaşık değişime, bu ilişkinin demografik, ekonomik, sosyal belirleyicilerine ve sonuçlarına odaklanır.

Pek çok ülke, sosyal değişim (Batı'da Endüstri Devrimi) ile tıbbi gelişme (II. Dünya Savaşı sonrasında ortaya çıkan antibiyotikler, böcek ilaçları, sağlık hizmetleri ve diğer tıbbi teknolojiler) kombinasyonunun eşliğinde, yüksek ölümlülükten düşük ölümlülüğe doğru önemli bir değişim veya dönüşüm yaşadı. Buradaki ortak nokta, ülkelerin hastalık türleri ve ölüm nedenleri bakımından açık bir değişim yaşamasıdır. Bu değişim, epidemiyolojik bir geçiştir. Geçiş, hastalık ve ölümlerin başlıca nedeni olarak neredeyse kontrolden çıkmak üzere ve

çok yayılmış olan salgın bulaşıcı hastalıkların yerini; doku ve organ yapılarının bozulmasına ve strese bağlı ya da insan-kaynaklı ve çevresel değişimin/bozulmanın ardından gelen hastalıkların almasını ifade eder.

Epidemiyolojik geçiş, dünyanın gelişmiş ülkelerindeki demografik ve teknolojik geçişlere paralel gerçekleşmiş ve bugün az gelişmiş toplumlarda da işleyen bir süreçtir (2).

Epidemiyolojik geçişin standart gidişine uymayan bir diğer gelişme, yeni viral ve bakteriyel hastalıklardaki artıştır. Geçmiş 30-35 yıl boyunca dünyada önceden bilinmeyen ve önemli sonuçlar doğuran en az 20'den fazla hastalık ortaya çıkmıştır: Rotavirus, parvovirus, ebola, hanta virus, SARS, MERS ve COVID-19 gibi virüs kaynaklı olanlar yanında, legionella, pneumophila, campylobacter, helicobacter gibi bakteriyel hastalıklar sayılabilir. Bu yüzden şimdi, daha önce kontrol altına alındığı düşünülen bulaşıcı hastalıkların yeniden belirmesi ve bir dizi yeni hastalığın hızla ortaya çıkışı ile karakterize edilen yeni bir epidemiyolojik geçişe girildiği ileri sürülmektedir (2).

Yirminci yüzyılda dünyada eğitim ve gelir düzeyindeki yükselme, beslenme alışkanlıklarının değişmesi, bulaşıcı hastalıkların kontrolü gibi etkenler beklenen yaşam süresinin artmasına neden olmuştur. Yaşlı nüfusun çocuk nüfusa oranla artış içinde olması, toplumdaki sağlık sorunlarının çocukluk çağı hastalıklarından yaşlı nüfusta görülen bulaşıcı olmayan hastalıklara doğru kaymasına yol açmıştır (3).

İnsan ölüm sebeplerinin önemli bir kısmı bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalıklar tarafından ayrı ayrı ya da birlikte oluşturulmaktadır. Bulaşıcı olmayan hastalığı olan bireyler aynı zamanda influenza ve gribe bağlı mortalite açısından da riskli gruplardır (4). Aynı zamanda bulaşıcı olmayan hastalıklar (kalp hastalıkları, kanser, diyabet ve kronik hava yolu hastalıkları) tüm dünyadaki ölümlerin yaklaşık %70'inden sorumludur (5).

Influenza, dünya çapında her yıl tahminen

444.000-553.000 ölüme neden olmaktadır (6). Bu ölümlerin çoğu 65 ve üstü yaş grubu ve kronik kardiyopulmoner hastalığı olanlar arasında meydana gelmektedir (7).

İnfluenza, her sene mevsimsel salgınlara sebep olmakta ve bu salgınlar hem dolaylı ekonomik sonuçlarla (sağlık kurumlarında artan iş yükü, hastane yatışlarındaki artışlar, iş ve okul günü kaybı vb.) karışımıza çıkmakta hem de riskli gruplarda görülen ölümlerden belli oranlarda sorumlu tutulmaktadır. Yeni mutasyonlarla meydana gelen pandemi ve bazen daha ağır geçen mevsimsel epidemiler toplu ölümlere neden olabildiği için influenza güncelliğini korumaya devam etmektedir (8).

İnfluenzadan korunmanın en iyi yolu ve en önemli adımı her yıl influenza aşısı yaptırmaktır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), savunmasız popülasyon diyebileceğimiz, diğer kişilere göre gribin ciddi sağlık sonuçlarının ortaya çıkması riski olan; hamile bayanlar, sağlık çalışanları, kronik sağlık sorunu olan kişiler (diyabet, HIV, astım, kalp veya akciğer hastalığı v.b), 65 yaşın üzerindeki kişiler ve 6 aydan 5 yaşına kadar çocuklara her yıl influenza aşısı yaptırmalarını önermektedir (5, 9, 10, 11).

Aşının, influenza mevsimi başlamadan, 1-2 ay önce yapılması optimum fayda sağlamak için tercih edilmelidir. Ülkelerin epidemiyolojik influenza örüntüsüne göre değişmekle birlikte çoğu kez Ekim-Aralık ayları arasında aşı yaptırılması doğru zamanlama olacaktır. Yaşlılarda hastalıktan korunmada aşı daha az etkili olabilirse de hastalığın şiddetini, komplikasyonlarını ve ölüm oranlarını azalttığı ortaya konmuştur. Aşı; ciddi komplikasyonlar açısından yüksek risk grubunda yer alan kişiler ile bu insanların bakımıyla ilgilenen veya birlikte yaşayan insanlar için özellikle önemlidir (5,12).

Yapılan bir çalışmada influenza mevsiminde tüm nedenlere bağlı ölümlere karşı aşı etkililiği %4,6 bulunmuştur (%95 GA: %0,7-%8,3). Aşılama, 65-79 yaşlarında (%5,3) daha büyük yaşlara (%3,9) göre daha etkili görünmektedir. Ek olarak,

aşının diğer nedenlerden kaynaklanan ölümlere (%0,1) göre kardiyovasküler ve solunum nedeni ölümlerde (%8,5) daha etkili olduğu görülmektedir (13).

İnfluenza aşısı, influenza hastalığını, doktor ziyaretlerini ve influenza nedeniyle kaybedilen iş ve okul günlerini azaltmanın yanı sıra influenza ile ilgili hastaneye yatışları önleyebilir (7, 12, 14).

İnfluenza aşısı, ölümleri azaltmanın yanında, ölümcül olabilecek kardiyak olayları azaltmada da etkili olduğu, akut miyokard infarktüsüne karşı %19 ile %45 arasında koruyucu olduğu gösterilmiştir (15,16,17).

Yüksek riskli hastalarda influenza aşılması ile kardiyovasküler sonuçlar arasındaki birlikteliği inceleyen bir metaanalizde influenza aşısının kullanımı, daha düşük majör kardiyovasküler olay riski ile ilişkilendirilmiştir. En büyük tedavi etkisi, daha aktif koroner hastalığı olan en yüksek riskli hastalarda görülmüştür (18).

Amerika Birleşik Devletleri'nde bir örneklemde 19 yaş ve üzeri yetişkinlerde 2017-2018 influenza sezonunda yer alan 21.675 kişiden 9970'ine (%46,1) influenza aşısı yapıldığı belirlenmiştir. Aynı zamanda yüksek riskli olarak tanımlanan kişilerin ise %60'ına influenza aşısı yapılmıştır (19).

İnfluenza aşılama oranları incelendiğinde Çin'de 40 yaş ve üzeri bireylerde yapılan bir çalışmada tüm yaş gruplarında influenza aşılama oranı %2,4 (GA %95;1,4-3,3) iken, 40-59 yaş arasında %1,7 (GA %95;1,2-2,2) ve 60 yaş ve üstünde ise %3,8 (GA %95; 1,6-5,9) olduğu belirlenmiştir (20).

Polonya'da yapılan başka bir çalışmada ise genel popülasyonda yaptırılan influenza aşısı kapsama oranının çok düşük (%3,4) olduğu ve yüksek riskli hastalar arasındaki kapsama oranı hakkında çok az şey bilindiği belirtilmiştir (21).

Birçok Avrupa ülkesindeki bağışıklama ise olması gerekenin altında (yaşlılarda %45,5; sağlık çalışanlarında %24; kronik tıbbi rahatsızlıkları olan hastalarda %49,8; hamile kadınlarda medyan %23,6) kalmaktadır (22).

Bu çalışmayla Türkiye’de kronik hastalığı olan bireylerde, cinsiyet ve yaş grubuna göre influenza aşısı ile aşılanma oranlarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, 2011 yılında Türkiye Kronik Hastalıklar ve Risk Faktörleri Çalışması için verileri toplanan 18.477 kişi esas alınmış ve aynı kişilere ait 2011-2018 yılları arasındaki elektronik sağlık kayıtlarından hastalık bilgileri toplanarak kullanılmıştır.

Sağlık Bakanlığı veri tabanında Dağıtık SQL Sorgulama Motoru “Impala” kullanılarak 2011-2018 yılları arasında erişkin aşılamada önerilen tüm aşılardan (ATC kodlarına göre hemofilus influenza, influenza, pnömokok, meningokok, tetanoz, hepatit B ve varisella aşısı) yapıp yapılmadığı sorgulanmış, 2015-2017 yılları arasında influenza aşısı için analiz yapılabilecek düzeyde veri bulunmuş ve hesaplamalar sadece influenza aşılamaya verileri kullanılarak yapılmıştır.

Örnekleme yer alan kişilerin;

- 2015-2017 yıllarında koroner kalp hastalığı (I20-I25), inme (I60-I69), kanser (C00-C97), hipertansiyon (I10-I15) ve diyabet (E10-E14) tanısına göre influenza aşısı yapıma oranı incelenmiştir.
- 15-24 yaş grubundan başlanarak 75 yaş üstüne kadar 10’arlık dilimler halinde yaş gruplaması yapılmıştır.
- Cinsiyet faktörü ve aşı etkileşimi de incelenmiştir.
- Mezun olunan en üst düzeye göre öğrenim düzeyleri gruplandırılmıştır.
- Araştırmada nüfusu 20.000’in altında olan yerler kır, 20.000 ve üzerinde nüfusu olan yerler ise kent olarak seçilip ikamet edilen bölge tanımlaması yapılmıştır.
- TÜİK tarafından il kodları kullanılarak Türkiye’yi 12 istatistiksel bölgeye ayıran NUTS1 bölgeleri tanımlanmıştır. NUTS1 (İstatistikî Bölge

Birimleri Sınıflaması)’e göre Türkiye 12 bölgeye ayrılmıştır (TÜİK, 2016). Bunlar, İstanbul (1), Batı Marmara (2), Ege (3), Doğu Marmara (4), Batı Anadolu (5), Akdeniz (6), Orta Anadolu (7), Batı Karadeniz (8), Doğu Karadeniz (9), Kuzeydoğu Anadolu (10), Orta Kuzey Anadolu (11) ve Güney Doğu Anadolu (12)’dur.

- Eğitim bilgisine erişilemeyen 58 kişi ile kır kent tanımı bulunmayan 295 kişi hesaplamalara dâhil edilmemiştir. Sosyodemografik analizde tekil kişi sayısı kullanılmış olup, kişilerin 2015-2017 aralığında en az bir kere aşı yapılmış olma durumu üzerinden hesaplama yapılmıştır.

- Sağlık Bakanlığı’ndan erişkin aşılamaya verileri temin edilmiştir. Bu veriler ORACLE 10g veri tabanında eşleştirilerek kişilerin hangi aşılardan ne sıklıkla yaptırmış olduğu tespit edilerek kişi bazlı aşılamaya listeleri oluşturulmuştur. Aynı gün ve aynı ay gibi yakın tarihlerde aynı aşı adına rastlandığı görülmüş, güncel olan aşı bilgisi esas alınarak verinin tekilleştirilmesi sağlanmış, ayrıntılı sorgu hazırlanarak kişisel verilere bireysel bazda erişmeden ve veriler anonimleştirilerek analiz için tarafımıza iletilmiştir.

- SPSS programında veriler için her bir değişkenin en küçük ve en büyük değerleri saptanarak uç değer belirlenmiş ve tanımlayıcı istatistikleri incelenmiştir. Çalışmada 2015-2017 yılları itibarıyla koroner kalp hastalığı, inme, hipertansiyon, kanser, diyabet ve ölüm sayıları ile 2015-2017 tarihleri arasında yapılmış aşılardan ve bazı sosyal belirleyicilerle ilişkisi (cinsiyet, yaş, eğitim düzeyi, ikamet edilen bölge, NUTS-1 Bölgeleri) incelenmiştir. Tek değişkenli analizlerde ki-kare testi kullanılmış, %95 güven aralığı ve p değeri <0,05 anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Tüm analizler SPSS 17.0 bilgisayar istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma, Ankara Şehir Hastanesi 1 No’lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı’nın onayı alınarak yapılmıştır (Tarih: 09.12.2020 ve Karar No: E1-20-1377).

BULGULAR

Sosyodemografik özelliklere göre erişkin influenza aşılaması

Örnekleme yer alan kişilerin (n=18.477) 2015-2017 tarihleri arasındaki influenza aşılama verileri

incelendiğinde 699 kişinin en az bir kere influenza aşısı yaptırdığı tespit edilmiştir.

Bu durumda analize konu 18.477 kişi içinden 17.778'inin hiç aşı yaptırmamış olduğu gözlemlenmiştir. Kalan 699 kişi ise üç yıl içinde en az bir kere, toplamda ise 1079 kez influenza aşısı yaptırmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. İnfluenza aşısı yapılma sayısı (n), 2015-2017

Aşı Tekrarlama Sayısı	Aşı Yapılan Kişi Sayısı (n)	Toplam Yapılan Aşı Sayısı
1	409	409
2	207	414
3	76	228
4	7	28
Toplam	699	1079

Erkeklerin influenza aşılama oranı (yüzbinde 391) ile kadınların influenza aşılama oranı (yüzbinde 367) arasında anlamlı bir fark görülmemektedir (Tablo 2).

Örneklemin tamamı incelendiğinde, yaş grubuna bağlı erişkin aşılama oranlarındaki farklılıklar gözlenmiştir. En yüksek aşılama oranı 65-74 yaş grubundadır (yüzbinde 1525) (Tablo 2). Yaşla birlikte erişkin aşılama oranının yükselme seyri izlediği gözlenmiştir. Üç yıllık aşılama hızı ise yüzbinde 378 olarak hesaplanmıştır.

NUTS bölgeleri bazında influenza aşılama oranları arasında da önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir (p<0,001). En yüksek influenza aşılama oranı Ege'de (yüzbinde 615) görülmüştür. En düşük aşılama oranının ise Kuzey Doğu Anadolu'da (yüzbinde 57) olduğu gözlenmiştir (Tablo 2).

Eğitim durumunun yükselmesiyle birlikte özellikle eğitim durumu yüksek (lise ve üniversite mezunu) olanların aşılama oranlarının düşük olması önemli bir nokta olup üzerinde çalışılmasına ihtiyaç olduğu görülmektedir (Tablo 2).

Bu çalışma Türkiye geneli için influenza

aşısından bir ilk olup influenza aşılama durumunun ülkemiz genelinde değerlendirilmesinde ciddi katkı sağlayacaktır.

Kronik hastalık varlığı, cinsiyet ve yaş grubuna göre influenza aşılama oranları

Örneklemedeki 11.610 kişide seçilmiş kronik hastalıklardan (koroner kalp hastalığı, inme, kanser, diyabet, hipertansiyon) hiçbirinin olmadığı gözlemlenmiştir. Örnekleme 6867 kişide en az bir seçilmiş kronik hastalık varlığı belirlenmiştir (Tablo 3).

Hastalık grupları incelendiğinde, kişilerin farklı aşılama oranlarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4). Her kronik hastalık ayrı ayrı değerlendirildiğinde influenza aşılamasının koroner kalp hastalarında en yüksek oranda (binde 207) olduğu görülmektedir.

Hastalık bazında değerlendirildiğinde, Hipertansiyon tanısı olan bireylerde ise influenza aşılama oranının düşük düzeyde (binde 104) gerçekleştiği görülmüştür. Bununla birlikte en düşük aşılama oranının (binde 94) multimorbiditesi olan hasta grubunda olduğu gözlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 2. Sosyodemografik özelliklere ve yerleşim yerine göre influenza aşılama oranları, (yüzbinde), 2015-2017

	Risk Altındaki Kişi		İnfluenza Aşılama Oranı		p
	Sayı	Sayı	Yüzbinde (Min-Max)		
Cinsiyet n=18.477					
Erkek	8748	342	391 (350 - 432)		0,207
Kadın	9729	357	367 (330 - 404)		
Yaş Grubu n=18.477					
15-24	3563	9	25 (9 - 42)		<0,001
25-34	3791	9	24 (8 - 39)		
35-44	3562	52	146 (107 - 185)		
45-54	3191	119	373 (307 - 439)		
55-64	2277	229	1006 (882 - 1129)		
65-74	1279	195	1525 (1328 - 1722)		
75+	814	86	1057 (845 - 1268)		
Öğrenim durumu n=18.419					
Okuryazar Değil	2083	104	499 (406 - 593)		<0,001
Okuryazar	976	67	686 (528 - 845)		
İlkokul	7371	359	487 (438 - 536)		
Ortaokul	2999	52	173 (127 - 220)		
Lise	3351	65	194 (147 - 241)		
Üniversite	1639	49	299 (217 - 381)		
NUTS 1 Bölgeleri n=18.477					
İstanbul	2635	68	258 (198 - 319)		<0,001
Batı Marmara	970	57	588 (440 - 736)		
Ege	3107	191	615 (530 - 699)		
Doğu Marmara	1964	82	418 (329 - 506)		
Batı Anadolu	1376	57	414 (309 - 520)		
Akdeniz	2641	111	420 (344 - 497)		
Orta Anadolu	1172	28	239 (151 - 326)		
Batı Karadeniz	1435	42	293 (205 - 380)		
Doğu Karadeniz	712	23	323 (193 - 453)		
Kuzeydoğu Anadolu	525	3	57 (0 - 122)		
Ortadoğu Anadolu	577	11	191 (79 - 302)		
Güneydoğu Anadolu	1363	26	191 (118 - 263)		
Yerleşim yeri n=18.182					
Kırsal	5895	207	351 (304 - 398)		0,107
Kent	12.287	479	390 (356 - 424)		
Üç yıllık aşılama hızı	18.477	699	378 (351 - 406)		

Tablo 3. Seçilmiş kronik hastalık varlığı ve kronik hastalığı olan kişi sayısı (n)

Hastalık sayısı (n)	Kişi sayısı (n)
0	11610
1	4231
2	1966
3	614
4	56
Genel Toplam	18477

Tablo 4. Kronik hastalık tanısı olan bireyler içinde influenza aşılama oranı (binde), 2015-2017

	Hasta Kişi Sayısı (n)	Aşılanan Kişi Sayısı (n)	Aşılama oranı (binde) (Min-Max)	p
KKH	1122	232	207 (187 - 231)	<0,001
İnme	439	49	112 (101 - 161)	
Kanser	381	49	129 (128 - 198)	
HT	4864	507	104 (118 - 136)	
DM	1714	273	159 (165 - 199)	
Multimorbidite	6277	590	94 (109 - 124)	

Örnekleme yer alan bireylerin birden fazla kronik hastalığı olabileceği ve değişkenlerin birbirinden bağımsız ele alınması mümkün olmadığı için çok gözlü ki-kare analizi veya post-hoc analizi yapılamamıştır.

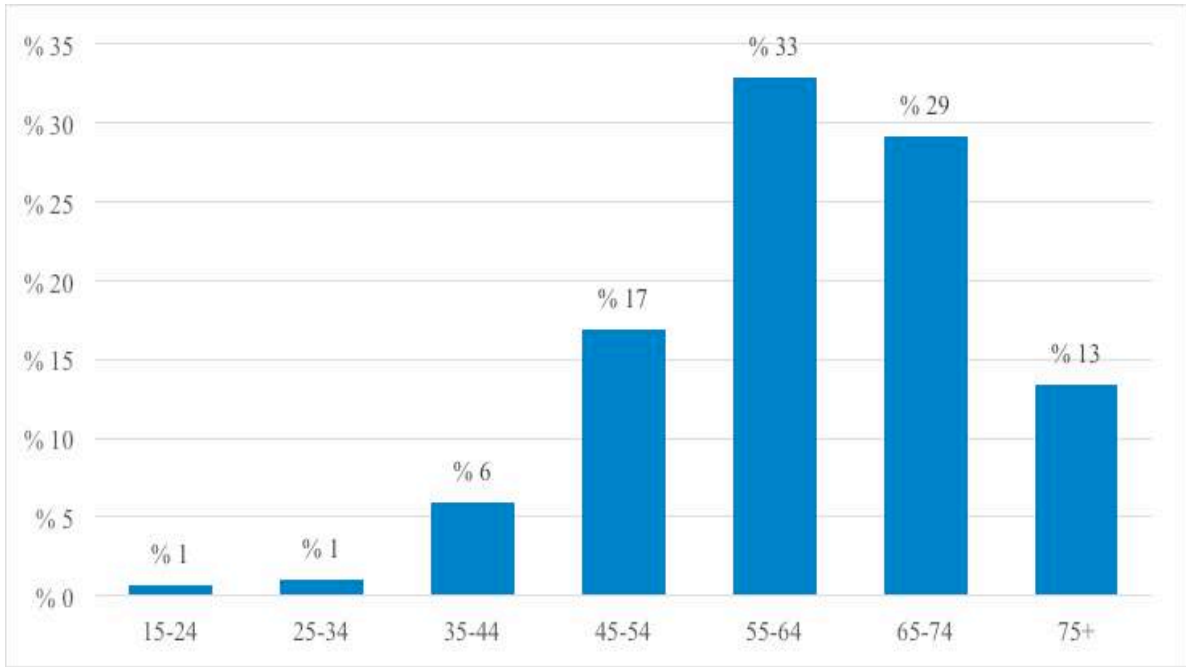
İnfluenza aşılması cinsiyet açısından incelendiğinde; örneklem genelinde influenza aşısı yapılma oranlarının cinsiyete göre anlamlı olarak değişmediği görülmüştür. Ancak örneklem en az bir kronik hastalığı olan bireyler için daraltıldığında influenza aşısı yapılma oranının hastalık sayısına ve cinsiyete göre farklıklar gösterdiği gözlenmiştir. En az bir kronik hastalığı olan kişilerde 2015-2017 yılları arasında erkeklerin kadınlardan 1,25 kat daha fazla influenza aşısı yaptırdığı gözlenmiştir.

Örnekleme en az bir kronik hastalığı olan kişilerden influenza aşısı yaptırmış olanlar 10'lu yaş

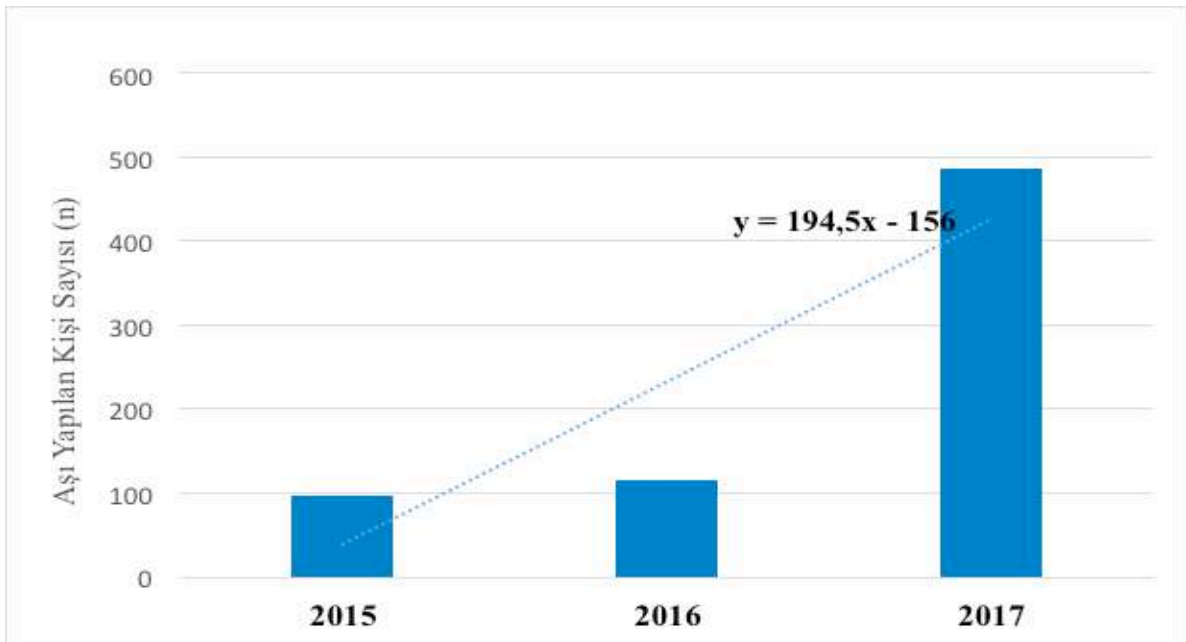
grupları halinde incelenmiştir. En az bir kronik hastalığı olan kişilerin influenza aşısı yaptırmaya oranlarının yaşa göre farklılaştığı, aşılama oranının 55-64 yaş grubuna kadar yükselmeye devam ettiği, 65 yaşından itibaren de oranın düşüşe geçtiği gözlenmiştir (Şekil 1).

İnfluenza aşılama sayıları bakımından analize konu 3 yıl incelendiğinde; daha önceki yıllardan günümüze doğru gelindikçe bağışıklamanın da toplum genelinde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 2).

Verileri incelenen bu 3 yıl baz alınarak projeksiyon yapıldığında her yıl ortalama 194 kişiye daha aşı yapıldığı tespit edilmiştir. 3 yıllık periyod incelendiğinde her yıl aşı yaptıran kişi sayısının arttığı, her ne kadar düzenli bir artış gözlemlenmese de bir önceki yıla kıyasla yaklaşık 200 kişinin (194,5 ortalama) daha aşı yaptıranlar arasına katıldığı gözlenmiştir.



Şekil 1. En az bir kronik hastalığı olan bireylerde yaş gruplarına göre influenza aşısı olma oranları (%)



Şekil 2. Yıllar içinde influenza aşısı yaptıranların sayısal artışı

TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsan bağışıklaması çocukluk ve erişkin dönem olarak temelde iki dönemde yapılmaktadır. Çocukluk dönemi bağışıklama uygulamaları çeşitli toplumlarda yüzyıllardır yapılmaktadır. Ancak erişkin bağışıklaması çocukluk dönemindeki kadar çeşitlilik arz etmemektedir.

Tarihsel olarak, influenza aşılama programları esas olarak yüksek gelirli ülkelerde uygulanmıştır. Ancak son yıllarda bazı orta gelirli ülkeler influenza aşılama programlarını başlatmış olup düşük ve orta gelirli ülkelerdeki politika yapıcılar yeni influenza aşılama programlarının nasıl uygulanacağını giderek daha fazla değerlendirmektedirler (5).

Bu çalışmada Türkiye’de kronik hastalığı olan bireylerde, cinsiyet ve yaş grubuna göre influenza aşısı yapılma oranları incelendiğinde cinsiyete göre aşılama oranında fark olmadığı, en yüksek aşılanma oranlarının 65-74 yaş grubunda (yüzbinde 1525) olduğu ve yaşla birlikte erişkin aşılama oranında yükselme eğilimi olduğu gözlenmiştir. Bu aşılama oranları Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerine göre oldukça düşüktür (12, 19).

İnfluenza genellikle bir ila iki hafta içinde tedavisiz iyileşmekle beraber, çok küçük yaşta kişiler, yaşlılar ve altta yatan kronik hastalığı olanlarda hastane yatışlarında artışa ve ölüme neden olmaktadır. İnfluenza aşısı, mevsimsel salgın sırasında hastane yatışlarını ve ölüm oranlarını azaltmaktadır (23, 24).

Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda, influenza aşısının influenza ve sekonder pnömoni (25), kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) (26) ve akut astım atakları (27) dâhil olmak üzere solunum yolu hastalıklarında önemli bir azalma ile ilişkili olduğu gösterilirken, son yıllarda ise influenza aşısının inme (28), akut koroner sendrom (ACS) (29), kalp yetmezliği ve miyokard enfarktüsü gibi kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk azalmasıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (28).

İnfluenza aşısının etkililiğine (influenza hastalığına bağlı hastaneye yatış ve ölümlere etkisi)

dair çalışmalar 25 yıl öncesinden günümüze kadar gelmekte ve influenza aşısının, 65 yaş ve üstü kişilerin bakımının vazgeçilmez bir parçası olduğu, yıllık influenza aşısı uygulamasının önemi, tüm hekimlerin ve halk sağlığı kuruluşlarının dikkat etmesi gerektiğini hatırlatmaktadır (23, 24, 30).

2018 yılında yapılan bir analizde Amerika’da 65 yaş üstü bireylerin %68,8’inin aşılama programına dahil olduğu bildirilmiştir (19). Amerika Birleşik Devletleri’nde 2010 yılında influenza aşılama oranı %40’tan az iken 2018 yılında %46,1’e yükselmiştir (19).

Çalışmamızda da en yüksek aşılama oranı 65-74 yaş grubunda (yüzbinde 1525) olduğu, yaşla birlikte erişkin aşılama oranının yükselme eğilimi gösterdiği, yıllık influenza aşılama artış oranının %1 olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde 2014-2015 influenza sezonunda yapılan diğer bir çalışmada influenza aşısı kapsama oranının %4,2 (%95 GA: 3,5 ila 5,0) olduğu, bu oranın da influenza yükünü kontrol etmek için yeterli olmadığı ifade edilmiştir (31).

Çalışmamızda influenza aşılama oranının koroner kalp hastalarında en yüksek oranda (binde 207) olduğu görülmektedir. Aynı zamanda gruptaki birey sayısının yüksek olması nedeniyle en az aşılama oranının (binde 94) multimorbiditesi olan hasta grubunda olduğu gözlenmiştir. Hastalık bazında değerlendirildiğinde ise hipertansiyon tanısı olan bireylerde influenza aşılama oranının düşük düzeyde (binde 104) gerçekleştiği görülmüştür. Bunun, hipertansiyon tanısının toplumda çok yaygın görülmesi ve aşılamanın aynı oranda yaygın olmamasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Birçok ülkede erişkin bağışıklama stratejilerinin özellikle sağlıklı çocukların aşılanma programıyla uyumlaştırılmadığı görülmektedir. Oysa ABD’de bağışıklama stratejileri eyaletler arasında daha iyi standartlaştırılmıştır ve aşı kapsamı ortalama olarak Avrupa Birliği ülkelerinde bildirilenlerden daha yüksektir (22).

Amerikan Kardiyoloji Derneği ve Dünya Kalp Vakfı tarafından yapılan bir çalışmada etkili aşılama

konusu ele alınmış, influenza aşılama kararında %50-90 doktorların kararının, %10-50 oranında hastaların kararının etkili olduğu belirtilmiştir (32). Doktorların kararlarında bilgi eksikliği, güvensizlik/kayıtsızlık ve kaçırılmış fırsatların olumsuz etkisinin olduğu, devamlı tıp eğitimi, güncel kılavuzlar ve koruyucu stratejilere uygun tavırların da olumlu katkısının olduğu ifade edilmiştir. Hastaların kararlarında yalan haberler, aşı karşıtı gruplar, tereddüt ve güvensizliğin olumsuz etkisinin olduğu; basit ve dürüst kampanyalar ve güvenilir bilgilendirmenin ise olumlu etkisi olduğu belirtilmektedir. Aynı zamanda eğitim, gelir durumu ve aşıya erişim sorunları süreci olumsuz etkilerken, ücretsiz aşılama, düzenli aşı takvimi önerileri ve epidemiyolojik çalışmaların ise olumlu etkilediğine dikkat çekilmiştir (32).

Influenza aşısının kapsayıcılığını artırmak için kronik hastalık yönetimi ve aşı stratejilerinin entegrasyonunun çok önemli olduğunu öngörebiliriz. Buna halk sağlığı yetkilileri ve sağlık çalışanlarının yıllık influenza aşılmasının teşviki ve hedef gruplardaki kişilere mevsimsel influenza aşısının önerilmesinin sağlanmasını dahil edebiliriz. Ayrıca influenza konusunda yapılandırılmış iletişim kampanyalarının süreçte etkili olacağı da öngörülebilir. Özellikle sağlık çalışanları ve riskli gruplara yönelik influenza aşı temini için yeterli ve sürdürülebilir bir finansman kaynağının oluşturulması da yüksek aşılama oranlarına ulaşmak için önemli faktörler arasında yer alır (32).

Grip aşısı olan diğer sağlık çalışanlarının yanı sıra hekimin kişisel deneyimi de hastalara yönelik gelecekteki tavsiyelerde belirleyici bir faktör olarak görülmektedir. Aşısız hastalarda 'kaçırılan fırsatlar' incelendiğinde, ana neden olarak tıbbi ziyaretler sırasında tavsiye edilmemesi olduğu tespit edilmiştir. Başka bir deyişle, doktorlar olumlu bir tutuma sahip olduğunda ve aşıyı önerdiğinde, bağışıklama oranı önemli ölçüde artmakta ve farklı serilerdeki vakaların %50 ila %93'ü arasında etkili bir aşılama sağlamaktadır (33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40).

Uzman doktorlar birincil önleme müdahalelerini gerçekleştirme konusunda isteksiz olabilirler (40).

Etkili aşılamadaki diğer bir büyük sınırlama, hastaların psikolojik yönleriyle ilgili karmaşık davranışsal özellikleri içerir (41, 42, 43). Aşı kararında yalpalamayı belirleyen davranışsal yönleri analiz eden yaklaşık 500 makale bulunmaktadır. Davranışsal yönler incelendiğinde; kişinin halinden memnun olması (örnek: hasta olma, ciddi komplikasyonlar gösterme riskinin düşük algılanması veya hasta olmama oranının yüksek algılanması), aşı uygulamasının kişiye külfet getirmesi (öz-etkililik, maliyet, davranışsal yönler), aşıya güven eksikliği (çevreye güvensizlik gibi yönler, etkinlik, olumsuz etkiler, yetkililerle bağlantı ve belirtilerle ilgili psikolojik yönler, olumsuz mitlerin daha fazla kabul edilmesi) ve aşıyla ilgili farklı durumları hesaplama (bireysel ve sosyal risk-fayda oranı) olarak gruplandırılmıştır (43).

Türkiye'de çocukluk çağı için 13 antijenli genişletilmiş bağışıklama programı başarıyla uygulanmaktadır. Ülkemizde aşı uygulaması özellikle çocukluk döneminde bir program dâhilinde devam etmekte ve belirli sağlık kurum ve çalışanları ilgili hedef grupların aşılama için bir görev çerçevesinde çalışmaktadırlar (44). Ülkemizde çocukluk dönemi aşılama oranları son on yıldır %90'ların üzerinde seyrederken erişkin aşılama (Hemofilus influenza b, influenza b, pnömokok, meningokok, tetanoz, hepatit B ve varisella aşısı) oranlarının bu denli düşük olması, üzerinde çalışılması gerekli olan bir alandır (45). Erişkin aşılması için ülke genelinde yapılandırılmış bir uygulama yoktur ve çocukluk çağı bağışıklama programındaki başarının erişkin aşılamaya henüz yansımadağı görülmektedir.

Birçok influenza araştırmasında prospektif olarak aşı olan ve olmayan gruplar için influenza enfeksiyonuna bağlı hastane yatışları, kalp yetmezliği veya KOAH gibi hastalıklar açısından enfeksiyondan hastaneye yatış ve ölümlerin gerçekleşme durumu incelenmiştir. Çalışmamızda ise örneklemde yer alan kişilerde bulaşıcı olmayan hastalık varlığı ile aşı olma durumu arasındaki ilişki retrospektif olarak incelenmiş olup aşı sonrası enfeksiyon gelişmesine yönelik bir bulgu mevcut değildir.

Sonuç olarak; influenza aşısının etkililiğinin izlenmesi, aşılama stratejilerini belirlemenin anahtarıdır. Birçok çalışmada influenza aşılama olumlu etkilerine dair deliller yer almaktadır. Ülkemizde influenza için özellikle risk grubunda yer alan ve bulaşıcı olmayan hastalığı olan bireylerin etkin aşılama programlarına dahil edilerek aşılama oranlarının artırılmasına ihtiyaç olduğu belirlenmiştir. Erişkin aşılama yönelik çalışmalar bir taraftan bilimsel deliller ışığında sürdürülürken,

diğer taraftanda erişkin aşılama programının aktif desteklenmesi önem arz etmektedir.

Ülkemizde bebek ve çocukluk döneminde yapılan bağışıklama programına benzer şekilde erişkinlere yönelik bir bağışıklama programı üzerinde çalışılarak özellikle risk grubunda yer alan kişilerde uygulanması ve bunun için sağlık çalışanlarının görevlendirilmesi üzerinde kamu ve ilgili diğer kurum ve kuruluşlarca bir çalışma yapılmasına ihtiyaç olduğu görülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Ankara Şehir Hastanesi 1 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nın onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:09.12.2020 ve Karar No: E1-20-1377).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. AR Omran. The epidemiologic transition: a theory of the epidemiology of population change. *Milbank Q*, 2005; 83(4): 731-57.
2. RE McKeown. The epidemiologic transition: changing patterns of mortality and population dynamics. *Am J Lifestyle Med*, 2009; 3(1 Suppl): 19S-26S.
3. Türkiye Kalp ve Damar Hastalıklarını Önleme ve Kontrol Programı Birincil, İkincil ve Üçüncül Korumaya Yönelik Stratejik Plan ve Eylem Planı. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı. 2010.
4. People at High Risk For Flu Complications. <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/index.htm>, Erişim Tarihi: 10 Mart 2021.
5. Evaluation of influenza vaccine effectiveness: a guide to the design and interpretation of observational studies. Geneva: World Health Organization. 2017. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255203>, Erişim Tarihi: 25 Mart 2021.
6. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 2012; 380 (9859): 2095-128.
7. Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley JA, Madhi AS, Simmerman JM, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2011; 378(9807): 1917-30.

8. Erişkin Bağışıklama Rehberi. <https://www.ekmud.org.tr/haber/264-turkiye-ekmud-eriskin-bagisiklama-rehberi>, Erişim Tarihi: 25 Mart 2021.
9. Seyahat Sağlığı 2021. <https://www.seyahatsagligi.gov.tr/site/HastalikDetay/Grip>, Erişim Tarihi: 10 Mart 2021.
10. Background paper on influenza vaccine and immunization. 2013, 1-48. http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2012/april/1_Background_Paper_Mar26_v13_cleaned.pdf?ua=1, Erişim Tarihi: 10 Mart 2021.
11. Grohskopf LA, Alyanak E, Broder KR, Blanton LH, Fry MA, Jernigan DB, et al., Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the advisory committee on immunization practices-United States, 2020-21 influenza season *MMWR Recomm Reports*, 2020; 69 (8):1-24.
12. Key Facts About Seasonal Flu Vaccine. <https://www.cdc.gov/flu/prevent/keyfacts.htm#benefits>, Erişim Tarihi: 10 Mart 2021.
13. Kwong JC, Schwartz KL, Campitelli MA, Chung H, Crowcroft NS, Karnauchow T, et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection. *N Engl J Med*, 2018; 378: 345-53.
14. Seasonal influenza vaccines: an overview for decision-makers. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/336951>, Erişim Tarihi: 20 Mart 2021.
15. MacIntyre CR et al., Ischaemic heart disease, influenza and influenza vaccination: a prospective case control study. *Heart*; 100(6): 517-8.
16. Siriwardena AN, Gwini SM, Coupland CAC. Influenza vaccination, pneumococcal vaccination and risk of acute myocardial infarction: Matched case - control study. *Cmaj*, 2010; 182 (15): 1617-23.
17. Hsu SY, Chen FL, Liaw YP, Huang JY, Nfor ON, Chao DY. A matched influenza vaccine strain was effective in reducing the risk of acute myocardial infarction in elderly persons: a population-based study. *Medicine*, 2016; 95 (10): 1-6.
18. Udell JA, Zawi R, Bhatt DL, Keshtkar-Jahromi M, Gaughran F, Ciszewski A. Association between influenza vaccination and cardiovascular outcomes in high-risk patients: a meta-analysis. *JAMA*, 2013; 310 (16): 1711-20.
19. Lu PJ, Hung MC, Srivastav A, Grohskopf La, Kobayashi M, Harris AM, et al. Surveillance of vaccination coverage among adult populations - United States, 2018. *MMWR Surveill Summ*, 2021; 70(3): 1-26.
20. Fan J, Cong S, Wang N, Bao H, Wang B, Feng Y, et al. Influenza vaccination rate and its association with chronic diseases in China: results of a national cross-sectional study. *Vaccine*, 2020;38(11):2503-11.
21. Nitsch-Osuch A, Gołębiak I, Wyszowska D, Rosińska R, Kargul L, Szuba B, et al. Influenza vaccination coverage among polish patients with chronic diseases. *Adv Exp Med Biol*, 2017; 968:19-34.
22. Rizzo C, Rezza G, Ricciardi W. Strategies in recommending influenza vaccination in Europe and US. *Hum Vaccin Immunother*, 2018;;14(3):693-8.
23. Gross PA, Hermogenes AW, Sacks HS, Lau J, Levandowski RA. The efficacy of influenza vaccine in elderly persons. a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med*, 1995;123(7):518-27.
24. Mouratidou E, Lambrou A, Andreopoulou A, Gioula G, Exindari M, Kossyvakis A, et al. Influenza vaccine effectiveness against hospitalization with laboratory-confirmed influenza in Greece: a pooled analysis across six seasons, 2013-2014 to 2018-2019. *Vaccine*, 2020; 38 (12): 2715-24.
25. Wang CS, Wang ST, Chou P. Efficacy and cost-effectiveness of influenza vaccination of the elderly in a densely populated and unvaccinated community. *Vaccine*, 2002; 20 (19-20): 2494-9.
26. Kopsaftis Z, Wood-Baker R, Poole P. Influenza vaccine for chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cochrane Database Syst Rev*. . 2018; 6(6): CD002733.
27. Vasileiou E, Sheikh A, Butler C, Ferkh KE, von Wissmann B, McMennamin J, et al. Effectiveness of influenza vaccines in asthma: a systematic review and meta-analysis . *Clin Infect Dise*, 2017, 65(8): 1388-95.

28. Christiansen CF, Thomsen RW, Schmidt M et al. Influenza vaccination and 1-year risk of myocardial infarction, stroke, heart failure, pneumonia, and mortality among intensive care unit survivors aged 65 years or older: a nationwide population-based cohort study. *Intensive Care Med* 45, 2019; 45: 957-67.
29. Sung LC, Chen CI, Fang YA, Lai CH, Hsu YP, Cheng TH, et al. Influenza vaccination reduces hospitalization for acute coronary syndrome in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease: a population-based cohort study. *Vaccine*, 2014; 32 (30): 3843-9.
30. Rivetti D, Jefferson T, Thomas R, Rudin M, Rivetti A, Pietranonj C Di, et al. Vaccines for preventing influenza in the elderly. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006;(3):CD004876.
31. Hekimoğlu CH, Emek M, Avcı E, Topal S, Demiröz M, Ergör G. Seasonal influenza vaccine effectiveness in preventing laboratory confirmed influenza in 2014-2015 season in Turkey: a test-negative case control study. *Balkan Med J*, 2018;35:77-83.
32. Liprandi ÁS, Liprandi MIS, Zaidel EJ, Aisenberg GM, Baranchuk A, bir yazar daha eklenecek, et al. Influenza vaccination for the prevention of cardiovascular disease in the americas: consensus document of the Inter-American society of cardiology and the world heart federation. *Glob Heart*, 2021;16(1):55.
33. Fica CA, Antunez RM, Cuevas AK, Rodriguez NA, Aravena RP. Prescripción de la vacuna anti influenza por médicos institucionales y estudiantes de especialidades médicas en un hospital docente. *Rev Chil Infectol*, 2001; 18(1): 20-27.
34. Hershey CO, Karuza J. Delivery of vaccines to adults: correlations with physician knowledge and patient variables. *Am J Med Qual*, 1997; 12(3): 143-50.
35. Olasupo OO, Brown J, Segal R. Missed opportunities for influenza and pneumococcal vaccinations in the elderly in the US - A cross-sectional analysis. *Value Health*, 2018; 21: S158.
36. Davis BM, Black D. Identifying the challenges to adult influenza vaccination in Latin America. *Value Health*, 2017; 20(9): A934.
37. Zimmerman RK, Santibanez TA, Janosky JE, Fine MJ, Raymund M, Wilson SA, et al. What affects influenza vaccination rates among older patients? an analysis from inner-city, suburban, rural, and Veterans Affairs practices. *Am J Med*, 2003; 114(1): 31-8.
38. Bovier PA, Chamot E, Bouvier Gallacchi M, Loutan L. Importance of patients' perceptions and general practitioners' recommendations in understanding missed opportunities for immunisations in Swiss adults. *Vaccine*, 2001; 19(32): 4760-7.
39. Srivanichakom W, Asavathitanonta K, Washirasaksiri C, Chaisathaphon T, Chouriyagune C, Phisalprapa P, et al. Prescribing rate of influenza vaccine among internal medicine residents for outpatient continuum care. *J Med Assoc Thai Chotmaihet Thangphaet*, 2014; 97(12): 1281-9.
40. Jaiyeoba O, Villers M, Soper DE, Korte J, Salgado CD. Association between health care workers' knowledge of influenza vaccine and vaccine uptake. *Am J Infect Control*, 2014; 42(1): 69-70.
41. Larson HJ, de Figueiredo A, Xiahong Z, Schulz WS, Verger P, Johnston IG, et al. The state of vaccine confidence 2016: global insights through a 67-country survey. *EBioMedicine*. 2016; 12: 295-301.
42. Bertoldo G, Pesce A, Pepe A, Pelullo CP, Di Giuseppe G. Collaborative Working Group. Seasonal influenza: Knowledge, attitude and vaccine uptake among adults with chronic conditions in Italy. *PLoS One*, 2019; 14(5): e0215978.
43. Schmid P, Rauber D, Betsch C, Lidolt G, Denker M-L. Barriers of influenza vaccination intention and behavior - a systematic review of influenza vaccine hesitancy, 2005 - 2016. *PLoS One*. 2017; 12(1): e0170550.
44. Aile Hekimliği Uygulama Yönetmeliği, Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı. 2013.
45. Bora Başara B, Soyutun Çağlar İ, Aygün A ve ark. Ankara: Sağlık Bilgi Sistemleri Genel Müdürlüğü. <https://sbsgm.saglik.gov.tr/Eklenti/40564/0/saglik-istatistikleri-yilligi-2019pdf.pdf>., Erişim Tarihi: 10 Mart 2021.

Prediction of treatment cost by artificial neural network of patients with COVID-19 in intensive care unit

Yoğun bakım ünitesindeki COVID-19 hastalarının yapay sinir ağı ile tedavi maliyetinin tahmini

Suna KOÇ¹ (ID), Mehmet DOKUR² (ID), Türkan ÖZER³ (ID), Betül BÖRKÜ UYSAL⁴ (ID), Mehmet Sami İSLAMOĞLU⁴ (ID), Nilgün AÇIKGÖZ⁵ (ID), İlke KÜPELİ¹ (ID), Sena Gül KOÇ⁶ (ID), Sema Nur DOKUR⁷ (ID), İsmail Tuncer DEGİM⁸ (ID)

ABSTRACT

Objective: Artificial neural networks (ANNs) are computer systems that are inspired by the biological neural networks that make up mammalian brains. An ANN is built from a network of linked units or nodes known as artificial neurons, which are roughly modeled after the neurons in the human brain. Each link, like synapses in a human brain, has the ability to send a signal to other neurons. The connections are referred to as edges. Neurons and edges usually have a weight that changes as learning progresses. The weight changes the intensity of the signal at a connection. Artificial neural networks have found applications in a wide range of fields due to their capacity to recreate and simulate nonlinear phenomena. System identification and control, medical diagnostics, data mining, visualization, machine translation, distinguishing highly invasive cancer cell lines from less invasive lines using simply cell shape information, and many more domains are examples

ÖZET

Amaç: Yapay sinir ağları (YSA), memeli beyinlerini oluşturan biyolojik sinir ağlarından esinlenen bilgi işlem sistemleridir. Bir YSA, biyolojik bir beyindeki nöronları kabaca modelleyen, yapay nöronlar adı verilen bağlantılı birimler veya düğümler koleksiyonuna dayanır. Her bağlantı, biyolojik bir beyindeki sinapslar gibi, diğer nöronlara bir sinyal iletebilir. Bağlantılara kenar denir. Nöronlar ve kenarlar tipik olarak öğrenme ilerledikçe ayarlanan bir ağırlığa sahiptir. Ağırlık, bir bağlantıdaki sinyalin gücünü artırır veya azaltır. Doğrusal olmayan süreçleri yeniden üretme ve modelleme yetenekleri nedeniyle yapay sinir ağları, birçok disiplinde uygulama bulmuştur. Uygulama alanları arasında sistem tanımlama ve kontrol, tıbbi teşhis, veri madenciliği, görselleştirme, makine çevirisi, yalnızca hücre şekli bilgilerini kullanarak yüksek düzeyde istilacı kanser hücre dizilerini daha az istilacı hücre dizilerinden ayırt etmek ve diğer birçok alan yer alır. Bu çalışmada, yoğun

¹Biruni University Medical Faculty, Department of Anesthesiology and Reanimation, İstanbul

²Biruni University Medical Faculty, Department of Emergency Medicine, İstanbul

³Beyşehir State Hospital, Department of Anesthesiology and Reanimation, Konya

⁴Biruni University Medical Faculty, Department of Internal Medicine, İstanbul

⁵Biruni University Medical Faculty, Department of Neurology, İstanbul

⁶Sakarya University Medical Faculty, Sakarya

⁷Biruni University Medical Faculty, İstanbul

⁸Biruni University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, İstanbul



İletişim / Corresponding Author : Suna KOÇ

Biruni Üni. Hast., Besyol Mah. Eski Londra Asfaltı No:10, Küçükçekmece / İstanbul - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 19.12.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 21.03.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.48642

Koç S, Dokur M, Özer T, Borkü Uysal B, İslamoğlu MS, Açıkgöz N, Küpelİ İ, Koç SG, Dokur SN, Degim İT. Prediction of treatment cost by artificial neural network of patients with COVID-19 in intensive care unit. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 39 - 46

of application areas. In this study, ANN analysis was utilized by us to forecast the total cost of therapy or the prognosis of severe COVID-19 the patients in the intensive care unit (ICU).

Methods: The parameters such as ages, and the other biochemical parameters that affect the staying periods (days) of COVID-19 infected patients in ICU were evaluated by using an ANN analysis. For this a computer program, Pythia®, was used to develop ANN models. Real data was used for that selected patients in this study.

Results: The real data obtained from the ICU and gave to the computer as initial parameters. The computer program gave 15 neurons for the first level, one neurons for the second level as the most suitable model for the prediction (SSD = 0.000995). This program predicts a total cost 144.930,94 Turkish Lira (27.300 USD) where the real cost 142.234,06 Turkish Lira (26.792 USD) for the real patient in 2019. This relation was found to be good to predict the possible affected parameters on staying times.

Conclusion: The ANN model developed and released in this research does not necessitate any experimental parameters. Besides, ANN has the ability to deliver helpful and exact prediction or information regarding the expense of COVID-19 patients in ICU.

Key Words: Covid-19, intensive care unit, artificial neural network, treatment, cost

bakım ünitesi (YBÜ)'nde COVID-19 hastasının toplam tedavi maliyetini veya prognozunu tahmin etmek için ANN'den yararlanması amaçlanmıştır.

Yöntem: COVID-19 ile enfekte ağır hastaların YBÜ'de kalış sürelerini (gün) etkileyen yaş gibi parametreler ve diğer biyokimyasal parametreler YSA analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, bir bilgisayar programı olan Pythia® YSA modellerini geliştirmek için seçilen hastalara ait veriler kullandık.

Bulgular: YBÜ'den elde edilen ve başlangıç parametreleri olarak bilgisayara verilen gerçek veriler elde edilmiştir. Bilgisayar programı tahmin için en uygun model olarak birinci seviye için 15 nöron, ikinci seviye için bir nöron vermiştir (SSD = 0,000995). Bu program, gerçek hasta için 2019 yılındaki gerçek maliyeti 142.234,06 TL iken toplam maliyeti 144.930,94 TL olarak tahmin edilmiştir. Bu ilişkinin, kalış süreleri üzerindeki olası etkilenen parametreleri tahmin etmede iyi olduğu görülmüştür.

Sonuç: Bu çalışmada, geliştirilen ve yayınlanan YSA modeli herhangi bir deneysel parametre gerektirmemektedir. Ayrıca YSA, YBÜ'deki COVID-19 hastalarının masraflarıyla ilgili yararlı ve kesin tahmin veya bilgi sağlama yeteneğine sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Covid-19, yoğun bakım ünitesi, yapay sinir ağı, tedavi, maliyet

INTRODUCTION

ANN models and many other models developed for prediction using artificial intelligence are becoming widespread and increasingly used in medical and pharmaceutical research to predict the nonlinear correlation between causal factors and response variables (1, 2). ANN is a computer algorithm inspired by biological systems and their working methodology. It is designed to learn from data in a way similar to the brain's learning processes. The vast majority of

ANNs are multidimensional, nonlinear information processing systems (3, 4). ANNs are data-analysis machines made up of hundreds of independent artificial neurons. Artificial neurons are connected together by coefficients (weights), which create the neural structure, and are organized in layers, which include the input layer, the output layer, and hidden layers in between. Neural networks learn by finding patterns and discovering correlations in data, and they are taught with appropriate learning instances through experience (5).

The purpose of this study is to calculate the costs of severe patients hospitalized in the isolated intensive care unit with the diagnosis of COVID-19, using artificial neural networks in the most realistic way and to make forward-looking cost-analytical estimates based on this.

Having input, hidden and output processes similar to those in biological neural systems, and because of their ability to reproduce and model nonlinear processes, ANN have found applications in many scientific fields such as to diagnose several types of cancers and to distinguish highly invasive cancer cell lines from less invasive lines using only cell shape information. ANN is also used successfully in electronic aviation fields system identification and control such as vehicle control, trajectory prediction, process control, natural resource management, quantum chemistry, general game playing, pattern recognition such as radar systems, face identification, signal classification, 3D reconstruction, object recognition and more, sensor data analysis, sequence recognition such as gesture, speech, handwritten and printed text recognition, medical diagnosis, finance, data mining, visualization, machine translation, social network filtering and e-mail spam filtering. Besides, ANNs have been used to accelerate reliability analysis of infrastructures subject to natural disasters and to predict foundation settlements (6).

In this study, we preferred Pythia® as a suitable ANN model to estimate the total cost for the treatment of COVID-19 patients in the University Hospital Intensive Care Unit (ICU).

MATERIAL and METHOD

Data collection and processing

Initial data was obtained from hospital data sources by retrospective searches. After data collection, all values were entered into the Excel program. All parameters were accepted as inputs and total cost of the treatments for each patient were entered as output. The computer program Pythia® accepts

copy/paste from Excel columns. After copying inputs and the output, the future function of the Pythia program called “Evolutionary optimisation” was chosen and program ran. Finally, the program gave the best neural network model indicating the number of neurons at layer by considering the least sum of squares of the deviations from the real data. The program was trained to use a given neural model for the real data. After the training program was ready for predictions. These predicted values were finally compared with the real data.

Development of ANN

The input layer neurons obtain data and the output neurons produce the ANN’s response. The parameters affecting the duration of stay (days) of COVID-19 infected patients in ICU were evaluated by using an ANN analysis. ANN models were developed using selected input parameters (age, co-morbidities, length of stay in ICU, cost of treatment per patient and the other biochemical parameters) determined after accepting them in ICU. A computer program, Pythia®, was used to develop ANN models (The Neural Network Designer version 1.0-Runtime Software LLC; Carson City, NV) (7). The software provided the best configurations and number of neurons at each level for predicting the total cost of the treatment of the COVID-19 patients. The superior fit was 16 neurons. A total of 19 inputs were used and the average SSD (sum of squared deviations) was calculated as 0.000995 after training. The best network model was developed using the optimizer and the ANN that achieved the lowest square deviations.

In this study, the most suitable ANN models were computed and developed for prediction of total cost of the treatment of 201 COVID-19 patients treated in ICU. The computer program run-Pythia®-uses back propagation networks to achieve the best model. The parameters of network (weights) were initially set to random values. During the training phase, the actual outputs compared with the desired (real) outputs and the error value propagated back toward the input of the network. A special feature of the

program called evolutionary optimizer automatically generates suitable networks and it is able to find the best one for given set of data. The program achieves the best network structure based upon lowest square deviations.

The study protocol was permitted by Biruni University Faculty of Medicine Ethics Committee (Date: 29.07.2020 and Number: 2020/42-05). The study was completed according to the mandates of the Helsinki.

RESULTS

The real data was obtained from the hospital unit and entered to the computer as initial parameters. The computer program gave 15 neurons where 19

inputs were used for the first level and one neuron for the second level as the most suitable model for the prediction. The average SSD was calculated as 0.000995 after training. The predicted treatment cost of patients is given in Figure 1.

The network output was plotted against two input descriptors to generate a functional dependency surface but this returned highly complex responses between the input variables yet there was no clear and easy-to-understand correlation. However, the real data and the predicted values were in the scope of predictability. As an example, program predicted a total cost of 144.930,94 Turkish Lira (27.300 USD) where the real cost was 142.234,06 Turkish Lira (26.792 USD) for the patients in 2019 (Figure 2).

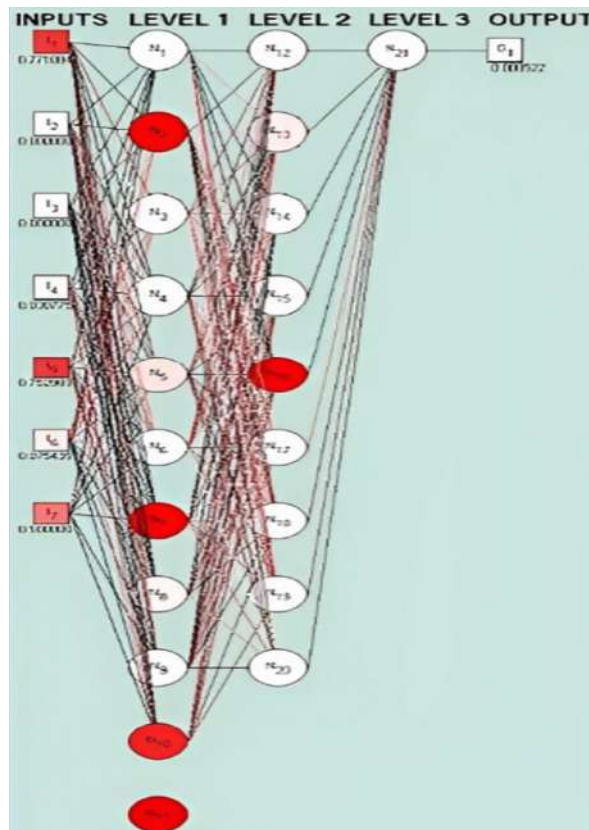


Figure 1. Prediction of total cost for the treatment (graphical scatter plot)

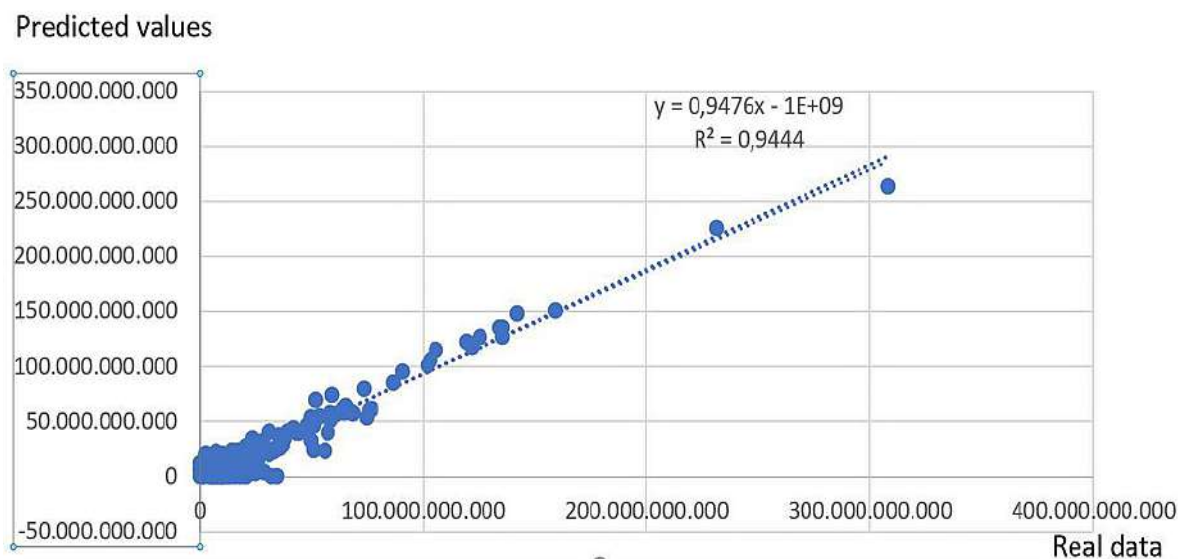


Figure 2. Prediction of total cost for the treatment (in Turkish Lira, based on 2019) (linear scatter plot)

DISCUSSION and CONCLUSION

The used computer program Pythia uses back propagation networks to achieve the best model (1, 3). The parameters of network (weights) were initially set to random values. During the training phase, the actual outputs were compared with the desired (real) outputs and the error value propagated back toward the input of the network. A special feature of the program called evolutionary optimizer automatically generates suitable networks and it is able to find the best one for given set of data. The program achieves the best network structure based upon lowest square deviations (8).

The ANN calculations have two phases. Initial phase referred as “training phase” and the final phase called “reproduction phase”. When training phase is completed, the network and each neuron get the exact value for fermi function and during the reproduction phase parameters are set and remain unchanged. In back propagation networks, each neuron has one

output and as many inputs as neurons in the previous level. Each network input is connected to every neuron in the first level. Each neuron output is connected to every neuron in the next level. The network’s output is the output of the last level neurons. The network is processed from left to right in the given model (9). The ANN findings showed that the computer program made predictions successfully and the correlation between parameters were found to be complex (10). These complex correlations were defined successfully by ANN and estimations were conducted rapidly after system training. The interpretation of the effects of each descriptor parameter is difficult since the model is multivariate and nonlinear. However, some insight into the degree of nonlinear behaviour of the descriptors has been assessed with a functional dependence to understand the relationships. The value of the input variables varied through a range, whereas some others were almost constant (11). It is also possible to predict a total cost for a hypothetical patient for whom the input parameters are known. In a study in

which Kulkarni A, et al. (12) evaluated the prolonged hospitalization periods of patients hospitalized in the coronary intensive care unit after angiography, it was shown that the longer the poor prognostic indicators increased, the longer the hospitalization periods get.

In recent years, parametric prediction studies have increased in clinical sciences using artificial neural networks to determine the accuracy of diagnosis and the prognosis of critically ill patients (13-18). Prediction studies using artificial neural networks can reflect cost-effectiveness analyzes in clinical sciences. It is especially important to be able to predict the actual cost of the medical treatment prior to the decision for especially physicians, hospital management and also for medical authorities. Beside that, the medical decision makers and doctors should also be aware of the actual costs before application of the therapy. These personnel should also be aware of what biomedical parameters can actually make the condition of the aforementioned patient worse. These biochemical markers or parameters are also predictive for the patient's medical conditions subsequently. This study may be the first study which searches for a relationship between biochemistry and the patient's conditions and finally predicts

the total cost of the future therapy. This beneficial prediction may help the medical personnel and indicates what biochemical factors are important for the rapid recovery of the Covid-19 patients and also may give a perspective on how to reduce total costs.

In conclusion, all results of our study showed that developed and trained ANN model is useful to predict the total treatment cost of the patients with COVID-19 and the correlations between parameters were found to be complex. Despite the presence of these complex relationships in parameters, it is more difficult to make predictions using other traditional methods; our estimations were found to be rapid and feasible after easy system training and parameter input. Besides, this illustration is good to predict the duration of stay of COVID-19 patients in ICUs. This is crucial since predicting the days of stay may help health professionals to reduce the cost of treatments. It may even be possible to order some necessary consumables and drugs prior to treatment. The ideology and the network or calculation method can be easily adapted to the other subjects.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Biruni University Faculty of Medicine Ethics Committee (Date: 29.07.2020 and Number: 2020/42-05).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Değim T, Hadgraft J, Ilbasım S, Ozkan Y. Prediction of skin penetration using artificial neural network (ANN) modeling. *J Pharm Sci*, 2003;92(3):656-64.
2. Aslan C, Çelebi N, Değim IT, Atak A, Özer Ç. Development of interleukin-2 loaded chitosan-based nanogels using artificial neural networks and investigating the effects on wound healing in rats. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2017;18(4):1019-30.
3. Tuncer Degim I. Understanding skin penetration: computer aided modeling and data interpretation. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2005;1(1):11-9.
4. Takayama K, Fujikawa M, Obata Y, Morishita M. Neural network based optimization of drug formulations. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003;55(9):1217-31.
5. Wan Z, Xu Y, Šavija B. On the use of machine learning models for prediction of compressive strength of concrete: influence of dimensionality reduction on the model performance. *Materials (Basel)*. 2021;14(4):713.
6. Artificial neural network. https://en.wikipedia.org/wiki/Artificial_neural_network#Applications, Date Accessed: 18.03.2022).
7. Patro R, Norel R, Prill RJ, Saez-Rodriguez J, Lorenz P, Steinbeck F, et al. A computational method for designing diverse linear epitopes including citrullinated peptides with desired binding affinities to intravenous immunoglobulin. *BMC Bioinform*, 2016;17:155.
8. Elhag AA, Aloafi TA, Jawa TM, Sayed-Ahmed N, Bayones FS, Bouslimi J. Artificial neural networks and statistical models for optimization studying COVID-19. *Results Phys*, 2021;25:104274.
9. Galata DL, Könyves Z, Nagy B, Novák M, Mészáros LA, Szabó E, et al. Real-time release testing of dissolution based on surrogate models developed by machine learning algorithms using NIR spectra, compression force and particle size distribution as input data. *Int J Pharm*, 2021;597:120338.
10. Larentzakis A, Lygeros N. Artificial intelligence (AI) in medicine as a strategic valuable tool. *Pan Afr Med J*, 2021;38:184.

11. Karnuta JM, Churchill JL, Haerberle HS, Nwachukwu BU, Taylor SA, Ricchetti ET, et al. The value of artificial neural networks for predicting length of stay, discharge disposition, and inpatient costs after anatomic and reverse shoulder arthroplasty. *J Shoulder Elbow Surg*, 2020;29(11):2385-94.
12. Kulkarni H, Thangam M, Amin AP. Artificial neural network-based prediction of prolonged length of stay and need for post-acute care in acute coronary syndrome patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Eur J Clin Invest*, 2021;51(3):e13406.
13. Zhao Z, Chen A, Hou W, Graham JM, Li H, Richman PS, et al. Prediction model and risk scores of ICU admission and mortality in COVID-19. *PLoS ONE*, 2020; 15(7): e0236618.
14. Rigo-Bonnin R, Gumucio-Sanguino VD, Pérez-Fernández XL, Corral-Ansa L, Fuset-Cabanes M, Pons-Serra M, et al. Individual outcome prediction models for patients with COVID-19 based on their first day of admission to the intensive care unit. *Clin Biochem*, 2022;100:13-21.
15. Corey KM, Kashyap S, Lorenzi E, Lagoo Deenadayalan SA, Heller K, Whalen K, et al. Development and validation of machine learning models to identify high-risk surgical patients using automatically curated electronic health record data (Pythia): a retrospective, single-site study. *PLoS Med*, 2018; 15(11): e1002701.
16. Arriaga-Pizano LA, Gonzalez-Olvera MA, Ferat-Osorio EA, Escobar J, Hernandez-Perez AL, Revilla-Monsalve C, et al. Accurate diagnosis of sepsis using a neural network: Pilot study using routine clinical variables. *Comput Methods Programs Biomed*, 2021;210:106366.
17. Chelazzi C, Villa G, Manno A, Ranfagni V, Gemmi E, Romagnoli S. The new SUMPOT to predict postoperative complications using an Artificial Neural Network. *Sci Rep*, 2021;11(1):22692.
18. Jiang X, Wang Y, Pan Y, Zhang W. Prediction Models for sepsis-associated thrombocytopenia risk in intensive care units based on a machine learning algorithm. *Front Med*, 2022; 9:837382.

Androctonus crassicauda antivenomunun *Leiurus abduhbayrami* venomuna karşı çapraz koruyuculuğunun değerlendirilmesi

Evaluation of cross-protection of *Androctonus crassicauda* antivenom against *Leiurus abduhbayrami* venom

Mehmet Ali KANAT¹ (ID), Derya ALTUN¹ (ID), Kübra KILIÇ² (ID), Edibe Nurzen NAMLI BOZKURT¹ (ID), Ertuğrul TURAN³ (ID), Gökhan CENGİZ³ (ID), İlhan BOZYİĞİT³ (ID)

ÖZET

Amaç: Akrep antivenomu hazırlanması, akrep zehirinin uygun bir hayvana, çoğunlukla atlara enjekte edilmesi sonrası uygun bir süre sonra uygulama yapılan hayvanların serumundan spesifik antikorların elde edilmesi gibi titizlikle gerçekleştirilmesi gereken bir süreçtir. Venom enjekte edilen hayvanlarda venomun kalitesi, miktarı ve uygulama yerine bağlı olarak birçok fizyolojik ve patolojik bulgu görülmektedir. *Androctonus crassicauda* venomu ulusal akrep antivenomu üretiminde kullanılmaktadır. *A. crassicauda* Türkiye’de Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde (Elazığ, Diyarbakır, Şanlıurfa, Mardin, Adana, Hatay, Malatya, Mersin) *Leiurus abduhbayrami* ise Güneydoğu Anadolu bölgesinde (Gaziantep, Adıyaman, Kilis, Şanlıurfa, Mardin) sıklıkla görülen türlerdir. Bu çalışmanın amacı, *A. crassicauda* zehiriyle elde edilen ulusal akrep antivenomunun; *L. abduhbayrami* türlerine karşı etkinliğini değerlendirmektir.

Yöntem: Çalışmada, *A. crassicauda* venomu ile immunize edilen atlardan elde edilen ulusal akrep antivenomu kullanıldı. *A. crassicauda* ve *L.*

ABSTRACT

Objective: The preparation of the scorpion antivenom is a process that must be meticulously performed, such as obtaining specific antibodies from the serum of the injected animal after a suitable period of time after the relevant venom has been administered to a suitable animal, mostly horses. Many physiological and pathological symptoms occur in the treated animal, depending on the quality, quantity and application of the venom injected. *Androctonus crassicauda* venom is used in the production of national scorpion antivenom. *A. crassicauda* is a common species in Eastern and Southeastern Anatolia (Elazığ, Diyarbakır, Şanlıurfa, Mardin, Adana, Hatay, Malatya, Mersin) and *Leiurus abduhbayrami* is a common species in Southeastern Anatolia (Gaziantep, Adıyaman, Kilis, Şanlıurfa, Mardin). The aim of this study is that the national scorpion antivenom obtained with *A. crassicauda* venom; to evaluate its effectiveness against *L. abduhbayrami*.

Methods: National scorpion antivenom obtained from horses immunized with *A. crassicauda* venom was used in the study. The venoms of *A. crassicauda* and *L.*

¹Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı, Ankara

²Albula Serum Biyolojik Ürünler, Eskişehir

³Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Derya ALTUN

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 Refik Saydam Yerleşkesi J Blok Sıhhye - Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 15.10.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 25.01.2022

abdullahbayrami türü akreplerin zehirleri elektriksel uyarı ile elde edildi. Her iki türün zehirleri 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Her iki türün zehiri için farelerde letal doz 50 (LD₅₀) değerleri belirlendi. *A. crassicauda* akrep antivenomunun iki katlı dilüsyonları hazırlandı ve *A. crassicauda* ve *L. abdullahbayrami* venomlarına karşı farelerde etkili doz 50 (ED₅₀) değerleri hesaplanarak nötralizasyon ünitesi (NU) belirlendi. Nötralizasyon testi ile *A. crassicauda* antivenomunun potens değeri ve *L. abdullahbayrami* venomuna karşı antivenomun çapraz koruyuculuğu hesaplandı.

Bulgular: *A. crassicauda* venomunun LD₅₀'si 5,761 µg/fare, *L. abdullahbayrami* venomunun LD₅₀'si 5,265 µg/fare bulundu. ED₅₀, *A. crassicauda*'da 0,1767 bulunurken, *L. abdullahbayrami*'de 0,25 tespit edildi. *A. crassicauda* antivenomuna karşı potens değerleri ise *A. crassicauda* ve *L. abdullahbayrami* için sırasıyla 90,5488 NU/ml ve 64 NU/ml olarak elde edildi.

Sonuç: Çalışmamız, *A. crassicauda* antivenomunun *L. abdullahbayrami* akrep sokmalarında da güvenle kullanılabileceğini göstermiş olup *A. crassicauda* antivenomunun *L. abdullahbayrami* akrep sokmalarının tedavisinde kullanılabilceğini gösteren ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Akrep, zehir, panzehir, *Androctonus crassicauda*, *Leirus abdullahbayrami*

abdullahbayrami scorpions was obtained by electrical stimulation. The venoms of both species were prepared at 1 mg/ml. Lethal dose 50 (LD₅₀) values were determined in mice for venoms of both species. Two-fold dilutions of *A. crassicauda* scorpion antivenom were prepared and the neutralization unit (NU) was determined by calculating the effective dose 50 (ED₅₀) values in mice against *A. crassicauda* and *L. abdullahbayrami* venoms. Potency value of *A. crassicauda* antivenom and cross-protection of antivenom against *L. abdullahbayrami* venom were calculated by neutralization test.

Results: The LD₅₀ of *A. crassicauda* venom was 5.761 µg/mouse and the LD₅₀ of *L. abdullahbayrami* venom was 5.265 µg/mouse. ED₅₀ was found 0.1767 in *A. crassicauda* and 0.25 in *L. abdullahbayrami*. Potency values against *A. crassicauda* antivenom were obtained as 90.5488 NU/ml and 64 NU/ml for *A. crassicauda* and *L. abdullahbayrami*, respectively.

Conclusion: Our study showed that *A. crassicauda* antivenom can also be used safely in *L. abdullahbayrami* scorpion stings and our study is the first study showing that *A. crassicauda* antivenom can be used in the treatment of *L. abdullahbayrami* scorpion stings.

Key Words: Scorpion, venom, antivenom, *Androctonus crassicauda*, *Leirus abdullahbayrami*

GİRİŞ

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı (RSHMB) akrep zehiri çalışma laboratuvarında Türkiye'de bulunan akreplere özgü ulusal akrep antivenomu üretimi 1942 yılında yapılmaya başlandı. Türkiye'de görülen tüm akrep sokması vakalarında ulusal akrep antivenomu kullanılmakta olup günümüzde de Serum Üretim Laboratuvarında ulusal akrep antivenomu üretimi devam etmektedir.

Antijenik özelliğinden dolayı *Androctonus crassicauda* (kara akrep) venomu ulusal akrep antivenomu üretiminde kullanılmaktadır. *A. crassicauda* venomunun atlara enjekte edilmesinden uygun bir süre sonra uygulama yapılan hayvanların serumundan spesifik antikörlerin elde edilmesi ile antivenom elde edilmektedir. Uygulama yapılan hayvanlarda enjekte edilen zehirin kalitesi, miktarı ve uygulama yerine bağlı olarak birçok fizyolojik ve patolojik bulgu görülmektedir.



Şekil 1a. *Androctonus crassicauda* (Kara akrep) HSGM Serum Üretim Laboratuvarı (Şanlıurfa)



Şekil 1b. *Leiurus abduallahbayrami* (Sarı akrep) HSGM Serum Üretim Laboratuvarı (Adıyaman)

A. crassicauda'nın Türkiye'de varlığı ilk kez Vachon (1951) tarafından saptanmıştır. *A. crassicauda*; Orta Asya ve Türkiye'de tıbbi yönden en önemli türdür (1, 2). *A. crassicauda* zehirinin tipik etkileri; sokulan sahada şiddetli ağrı ve his kaybının yanı sıra şiddetli nörolojik etkilerle birlikte hipertansiyondur. *A. crassicauda* türünden elde edilen venom, antivenom üretiminde antijen olarak kullanılmaktadır (2, 3). Üretim yönünden monovalan karakterde üretilen *A. crassicauda* kaynaklı ulusal akrep antivenomu; farklı akrep türlerinin venomlarına karşı etkili olması nedeniyle de polivalan özellik gösteren bir antiserumdur (2-4). *A. crassicauda*'nın Türkiye'de daha çok Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde özellikle Elazığ (Palu), Diyarbakır, Şanlıurfa (Harran-Akçakale), Mardin, Adana, Hatay, Malatya, Mersin illerinde bulunduğu bildirilmiştir (5). Türkiye'de görülen *Leiurus* türü akrepler 2009 yılına kadar *L. quinquestriatus* türü olarak bilinmekteydi. *L. quinquestriatus*, Türkiye'de ilk kez Tulga tarafından 1959 yılında Adıyaman'da tespit edilmiş olup tür tayini Shulov tarafından yapılmıştır (1,2). *L. quinquestriatus* dünyanın en zehirli akreplerinden biridir, tıbbi önemi oldukça fazladır. Bol miktarda kardiyotoksin içeren zehiri esas olarak nörotoksiktir; ölümler kardiyovasküler etkiler ve solunum disfonksiyonu sonucudur. Ancak zehiri antijenik yönden antivenom

üretimine elverişli değildir (2). Farelerde 0,16-0,50 mg/kg olarak bildirilen LD₅₀ toksisite seviyeleri, bu türün akreplerde tanımlanan en toksik zehirlerden birine sahip olduğunu göstermektedir. Akrep sokmalarının klinik çerçevede kardiyojenik şok ve/veya pulmoner ödem, akut kalp yetmezliği ya da ölümlerle sonuçlandığı bildirilmektedir. Akrep venom toksinlerinin hipertansiyon ya da hipotansiyon, hipotermi, taşikardi, hipersalivasyon, miyokardit, pankreatit, hiperglisemi, hiperamilazemi, anksiyete, nörotoksisite ve koagülasyon bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir (6). *L. quinquestriatus*, ilk olarak Ehrenberg tarafından 1828'de *A. quinquestriatus* olarak tanımlanmıştır. 1949'da Max Vachon, *Leiurus*'u, *L. quinquestriatus quinquestriatus* (Ehrenberg, 1828) ve *L. quinquestriatus hebraeus* (Birula, 1908) alt türlerini içeren *L. quinquestriatus*'tan (Ehrenberg, 1828) oluşan monotipik bir cins olarak tanımlamıştır. Afrika'da daha çok *L. quinquestriatus quinquestriatus* görülürken, Asya'da *L. quinquestriatus hebraeus* populasyonlarının bulunduğu bildirilmiştir (7). Ürdün'den *L. jordanensis* (8), Kamerun'dan *L. savanicola* (7), Yemen'den *L. nasheri* (9) ve Türkiye'den bildirilen *L. abduallahbayrami* ile *Leiurus* cinsinin tür sayısı beşe çıkmıştır. Yagmur ve ark. (10), *Leiurus* cinsinin bilinen tüm Türk populasyonlarını incelemiş ve

hepsinin yeni tür yani *L. abduhbayrami*'yi temsil ettiğini saptamış, Türkiye'de görülen tüm *Leiurus* cinsi akreplerin *L. abduhbayrami* türü olduğu kabul edilmiştir. Daha sonra 2010'da Suriye'den de *L. abduhbayrami* bildirim yapılmıştır (11). *L. abduhbayrami* türü akrep Türkiye'ye endemik bir türdür ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde Gaziantep, Adıyaman, Kilis, Şanlıurfa, Mardin illeri ve çevresinde dağılım göstermektedir. Yapılan çalışmalar, *L. abduhbayrami*'nin *L. quinquestriatus*'tan tür düzeyinde farklılıklar içerdiğini göstermiştir (10). Bu tür ayrıca Filistin, Suriye ve Kuzey Afrika'da da bulunmuştur (12). *L. abduhbayrami* 2009 yılına kadar *L. quinquestriatus* olarak tanımlandığı için *L. abduhbayrami* türü ile yapılan çalışmalar çok yeni ve az sayıdadır. Protein sekanslama çalışmalarında BLAST benzerlik analizi ile *L. abduhbayrami* zehrinin peptid dizilimine en yakın dizilim %98'lik oranla *L. quinquestriatus* habraeus'tan saflaştırılan Lqh6 peptidi olarak belirlenmiştir (13). Birçok çalışmada, ham akrep venomları elektriksel uyarı ile çeşitli akreplerden elde edilmiş ve kullanılan antivenomların etkinliği Letal Doz 50 (LD₅₀), Etkili Doz 50 (ED₅₀) değerleri hesaplanarak antivenomların potensleri değerlendirilmiştir (32-36).

Bu çalışmanın amacı, *A. crassicauda* zehiriyle elde edilen ulusal akrep antivenomunun; *L. abduhbayrami* türlerine karşı etkinliğini değerlendirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Akrepler ve zehirleri

A. crassicauda akrepleri (Şanlıurfa) ve *L. abduhbayrami* akrepleri (Adıyaman) Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu bölgesinden toplanmış; Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü (HSGM) Serum Üretim Laboratuvarında beslenen akreplerdir. Akreplere günlük olarak su verilmekte ve her sağımdan sonra çekirge ile beslenmektedirler. Ham venomun eldesi elektrostimülasyon sağım yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elektrostimülatör ile 20 V, 10

Hertz' lik elektrik akımı pens yardımı ile tutulan akreplerin telsonuna anot ve katot uç olmak üzere iki adet elektrot kullanılarak uygulanmıştır (14).

Venomun eldesi ve peptid miktarının belirlenmesi

1,5 ml'lik tüp içerisine toplanan venomlar deiyonize su ile çözülerek 4 °C'de, 15 dakika, 14.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı yeni bir tüpe alınarak soğutmalı vakum kurutucuda kurutulmuştur. Elde edilen liofilize venomlar etiketlenerek daha sonraki deney aşamalarında kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır (15). Elde edilen ham venomun venom konsantrasyonu hesaplanmıştır. Spektrofotometrik ölçümler 280 nm (A280) dalga boyunda gerçekleştirilmiştir (16). Venom konsantrasyonları 1mg/ml olacak şekilde NanoDrop spektrofotometre ile belirlenmiştir.

Antivenom

Ulusal akrep antivenomu; üretim yönünden monovalan, farklı akrep türlerinin venomlarına karşı etkili olması nedeniyle de polivalan özellik gösteren, *A. crassicauda* zehrinin atlara enjeksiyonu ile hazırlanan bir antiserumdur. Uygun bir süre sonra aşılınmış hayvanların serumundan spesifik antikörlerin toplanması ile elde edilmekte; uygulama yapılan atların serumlarının eş-volümetrik havuzlarından oluşturulmaktadır.

Deney Hayvanları

Letal doz 50 (LD₅₀), Etkili doz 50 (ED₅₀), nötralizasyon ünitesi (NU) ve potens değerlerini belirlemek için 18-20 g laboratuvarda yetiştirilmiş dişi Swiss Albino fareler kullanılmıştır (17). Tüm fare deneyleri, HSGM Deney hayvanları laboratuvarlarında Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu'na uygun olarak gerçekleştirilmiştir (4). Deney hayvanları %60 ± 10 nem ile laboratuvar ortam sıcaklığında tutulmuş ve ticari kemirgen peletleri ve yeteri kadar su ile beslenmiştir.

Letal Doz 50 (LD₅₀) Tayini

A. crassicauda ve *L. abduhbayrami* zehirlerinin farklı dozları, geleneksel tekniklere ve akrep serum monografına göre farelere intravenöz olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 48 saat sonra ölümlerin

sayısı kaydedildi ve LD₅₀ değerleri (%50 istatistiksel ölüme neden olan zehir dozu) µg/fare cinsinden hesaplanmıştır. Hesaplama işlemi Spearman-Kärber metodu ile yapılmıştır (17,18).

Letalite nötralizasyonu

A. crassicauda ve *L. abduhbayrami* venomları 5 LD₅₀/0,25ml olacak şekilde test venomu (Tv) solüsyonu hazırlanmıştır. HSGM Serum Üretim Laboratuvarı tarafından üretilen *A. crassicauda* akrep antivenomunun iki katlı dilüsyonları hazırlanmıştır. Farklı antivenom dilüsyonları, *A. crassicauda* ve *L. abduhbayrami* venomlarının Tv solüsyonları ile 30 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, örnekler farelere (n=6) kuyruk veninden intravenöz (i.v.) olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 48 saat sonra ölümlerin sayısı kaydedilmiştir. Antivenomun *A. crassicauda* ve *L. abduhbayrami* venomlarına karşı farelerde Etkili Doz 50 (ED₅₀) değeri Reed&Muench metodu ile hesaplanarak nötralizasyon ünitesi (NU) değerleri belirlenmiştir. Antivenomun potens değerleri NU/ml cinsinden her iki akrep venomu için hesaplanmıştır (17).

Akrep zehirlerinin jel elektroforezi (SDS-PAGE)

L. abduhbayrami venomunun protein profilinin belirlenmesi için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır (19). Tris Tricine yürütme çözeltisi kullanılmıştır. İndirgenmemiş metot ile %12 ayırma jeli, %4 yükleme jeli oranlarına sahip jeller hazırlanarak yürütme yapılmıştır. Düşük moleküler ağırlığa sahip küçük proteinlerin analizi için de %16 ayırma jeli, %4 yükleme jeli oranlarına sahip jeller hazırlanmış ve hem indirgenmiş hem de indirgenmemiş metot ile çalışma yapılmıştır. Proteinlerin moleküler ağırlıklarını hesaplamak için Ultra Low Range Marker (SİGMA 1,060-26,600 Da) ve Wide Range Marker (SİGMA 6,500- 200,00 Da) paralel olarak çalıştırılmıştır. SDS-PAGE çalışması oda sıcaklığında 120 V'da yaklaşık 2,5-3 saat yürütülerek yapılmıştır. Yürütmenin sonunda jeller Coomassie brilliant blue ile boyanmıştır.

Etik Kurulu Onayı

Bu çalışma, Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz kurumu Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'nun onayından sonra Biyolojik Ürünler ve Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda yapılmıştır (Onay numarası: E.39634851-1121844, Onay tarihi: 29.09.2021).

Bu çalışmada, gerçekleştirilen tüm işlemler Helsinki Deklarasyonu'nun (2008) etik standartlarına uygun olarak yapılmıştır. Hayvanları ilgilendiren tüm prosedürler, benimsenen hayvan araştırmaları etik ilkelerine uygundur.

BULGULAR

Letal Doz 50 (LD₅₀) Tayini

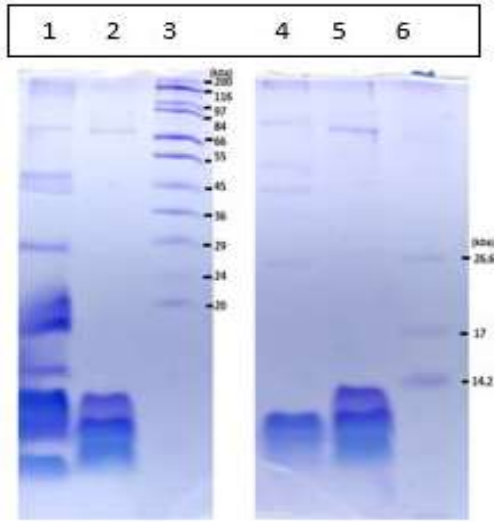
A. crassicauda ve *L. abduhbayrami* zehirlerinin farklı dozları ile LD₅₀ değerleri sırasıyla 5,265 µg/fare ve 5,761 µg/fare olarak hesaplanmıştır.

Letalite nötralizasyonu

A. crassicauda antivenomunun *A. crassicauda* ve *L. abduhbayrami* venomlarına karşı farelerde ED₅₀ değerleri sırasıyla 0,25 ve 0,1767 olarak belirlenmiştir. Spesifik nötralizasyon potensi, *A. crassicauda* zehirinden 90,5488 NU/ml iken, *L. abduhbayrami* zehirinden 64 NU/ml bulunmuştur. Bu sonuç; 1 ml ulusal akrep antivenomu, 90,5488 LD₅₀ gücünde *A. crassicauda* venomunu nötralize etmekte iken, 64 LD₅₀ gücünde *L. abduhbayrami* venomunu nötralize etmektedir şeklinde yorumlanmaktadır.

Akrep venomlarının jel elektroforezi (SDS-PAGE)

L. abduhbayrami venomuna ait indirgenmemiş %12 SDS-PAGE çalışması'nda (Şekil 2) 84-66 kDa aralığında yaklaşık 70 kDa'da çok yoğun olmayan bir protein bandı görülmüştür. *L. abduhbayrami*'de asıl bant yoğunlukları 14,2 kDa altında olduğu tespit edilmiştir. 70 kDa ile 14,2 kDa aralığında herhangi bir bant görülemedi. Diğer akrep venomlarına ait profiller protein bantları açısından çok daha zengin olduğu belirlenmiştir. *L. quinquestriatus* *quinquestriatus*'a ait profillerde 84 kDa ile 24 kDa aralığında dört temel protein bandı bulunmuştur. 14,2 kDa ile 6,5 kDa aralığında da düşük moleküler



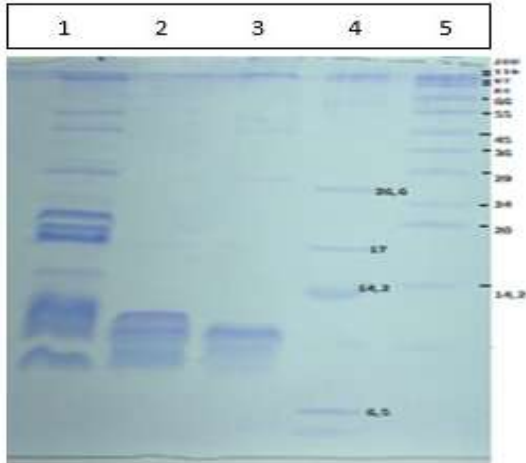
Şekil 2. İndirgenmemiş %12 SDS-PAGE çalışması

ağırlığa sahip yoğun bir protein bant profili görülmüştür. *A. crassicauda*'ya ait profillerde 84 kDa - 66 kDa aralığında yoğun olmayan bir bant, 55 kDa - 36 kDa aralığında iki protein bandı ve 29 kDa - 6,5 kDa aralığında beş yoğun protein bandı belirlenmiştir.

L. abduallahbayrami venomu karakteristik olarak geniş bir protein profiline sahip olmadığı ve daha yoğun olarak düşük moleküler ağırlıklı peptitleri içerdiği belirlenmiştir. *L. abduallahbayrami* ve *L. quinquestriatus quinquestriatus* venomunun düşük

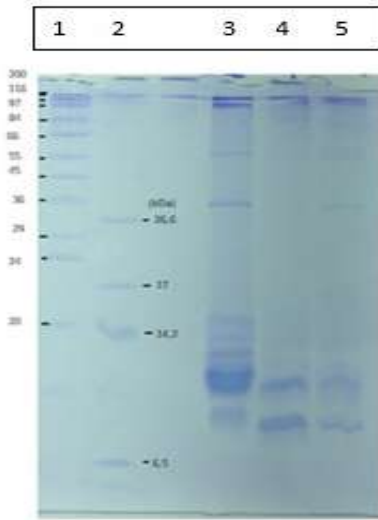
moleküler ağırlıklı profillerinin ayırımını sağlamak için %16'lık jelde hem indirgenmiş hem de indirgenmemiş Tris-Tricine SDS-PAGE yöntemi (Şekil 3 ve Şekil 4) çalışılmıştır. *L. abduallahbayrami* ve *L. quinquestriatus quinquestriatus* venomunda 14,2 kDa altında bulunan yoğun bant profilinin peptit içeriği ayırımı net olarak sağlanamamıştır. Bu ayırımı sağlamak için daha ayrıntılı moleküler, biyokimyasal ve proteomik analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

1-*Androctonus crassicauda*
2-*Leiurus abduallahbayrami*
3-Wide Range Marker
4-*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*
5-*Leiurus abduallahbayrami*
6-Low Range Marker



Şekil 3. İndirgenmemiş %16 SDS-PAGE çalışması

1-*Androctonus crassicauda*
2-*Leiurus abduallahbayrami*
3-*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*
4- Low Range Marker
5- Wide Range Marker



Şekil 4. İndirgenmemiş %16 SDS-PAGE çalışması

1-Wide Range Marker
 2-Low Range Marker
 3-*Androctonus crassicauda*
 4-*Leiurus abduallahbayrami*
 5-*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*

Deney Hayvanlarının Klinik Gözlemi

Farelerin venom enjeksiyonundan sonra aşırı uyanılma, ajitasyon, agresif davranış, gıcırta ve kavga, taşipne, konvülsiyonlar, halsizlik, felç, koma gibi zehirlenme semptomları sonrası öldüğü gözlenmiştir. Ayrıca farelerde hipersalivasyon veya lakrimasyon saptanmamıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Akrep sokma vakalarının çoğunda akrep ne görülebilmekte ne de tanımlanabilmektedir. Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde meydana gelen akrep sokmalarında en çok *A. crassicauda* ve *L. abduallahbayrami*'nin görüldüğü, geri kalan vakalara ise tanımlanamayan akreplerin neden olduğu bilinmektedir. Her iki akrep türü de *Buthidae* familyasında yer almaktadır (10). Akrep sokma vakalarının yarısından fazlasının Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde olduğu ve daha çok yaz aylarında görüldüğü rapor edilmektedir (20, 21). Tüm akrep türlerinin zehirli olduğu ve akrep sokmalarında, kişinin yaşına, kilosuna, sokulan bölgeye ve vücuda giren doz miktarına bağlı olarak hayati tehlike oluşturabilecek komplikasyonların gelişebileceği bildirilmektedir.

Akrep sokması sonucu; sokulan bölgede şiddetli lokal ağrılar, yüksek ateş ve kızarma, yoğun terleme, ağız suyu akıntısı, karın bölgesinde kramp, hipotermi ve hipertansiyon gibi rahatsızlıklar oluşabilmektedir. Ölümle sonuçlanan vakalar genellikle çocuklarda ve bağışıklığı zayıf yaşlı bireylerde görülmektedir. Akrep sokmalarında ilk 24 saatteki antiserum uygulamasının hayati tehlikeyi büyük ölçüde azalttığı bildirilmektedir (20, 22-24). Bir çalışmada, *L. abduallahbayrami* zehirlenmesinin özellikle çocuklarda akreple ilişkili kardiyomiyopati ve akut akciğer ödemine neden olabileceğini gösterilmiştir (25). Altınkaynak ve ark. (26) Türk antivenomunun (*A. crassicauda* antivenomu) *Mesobuthus gibbosus* türü akrep sokma vakalarının %91,6'sında etkili olduğu için akrep sokması tedavisinde kullanılmasını önermişlerdir. Soker ve Haspolat (27) ise Güneydoğu Anadolu'da akreple ilgili tüm vakaların %90,3'ünde Türk antivenomunun etkili olduğunu doğrulamışlardır. Günümüzde de ulusal akrep antivenomu tedavide başarıyla kullanılmaktadır (23, 24). Ozkan ve Alcigir (28), tavşan modelleme çalışması ile *L. abduallahbayrami* ve *A. crassicauda* zehirlerinin patomorfolojik bulgularını inceledikleri çalışmalarında, yeni tanımlanan *L. abduallahbayrami* venomunun, *A. crassicauda* venomundan daha zehirli olduğunu

ve vücut ağırlıklarının daha düşük olması nedeniyle özellikle bebekler için *L. abduhbayrami*'nin ciddi tehdit oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Akrep sokmasının ardından türe özgü antivenom ile tedavinin mümkün olmadığı durumlarda, *A. crassicauda*'ya karşı kullanılan antivenom diğer akrep türlerinin sokmaları için kullanılabilir (29). Türkiye'de monovalan *A. crassicauda* antivenomu 1942'den beri tüm akrep sokmalarında kullanılmaktadır (20). Bu nedenle, ulusal akrep antivenomunun diğer akrep zehirlerine karşı da etkililiği araştırılmalıdır. Akrep zehirlerinin kalitesi; akreplerin cins, tür, cinsiyet, vücut ağırlığı, coğrafi kökeni, yapı ve zehir miktarına göre değişiklik gösterebilir. Zehir çıkarma prosedürleri ve LD₅₀ belirleme yöntemine bağlı olarak da toksisiteyi değiştirir. Antivenom üretimi sırasında zehir toksisitesi ve kalitesindeki değişiklik de dikkate alınmalıdır (29, 30). Çeşitli ülkelerdeki potens analizleri incelendiğinde en kabul edilebilir testin standart murin letalite testi (zehirin LD₅₀ ve antivenomun ED₅₀'sinin belirlenmesi) olduğu fark edilmiştir. Bunun yanı sıra testin gerçekleştirilme şekli, enjekte edilen hacimler, venom/antivenom karışımlarının enjekte edilme yolları, LD₅₀ değeri, kullanılan fare cinsi ve hayvanların ağırlıkları gibi önemli farklılıkların potens etkilediği de bildirilmiştir (29). Hayvanların %50'sini öldürmek için gerekli zehir miktarı olan LD₅₀, standart bir toksin potens ölçüsü olmasına rağmen, akrep zehirinin değişikliği nedeniyle yapılan çalışmalarda farklı gözlemlenen bir gösterge olmuştur (20, 31, 34-37). Ozkan ve ark. (31)'nin farelerde subkutan enjeksiyonla *L. abduhbayrami* zehrinin medyan letal dozunu (MLD) 0,19 mg/kg olarak buldukları çalışmaları *L. abduhbayrami*'nin letal dozu hakkındaki ilk rapor olmuştur (31). Çalışmamızda *A. crassicauda* ve *L. abduhbayrami* LD₅₀ değerleri sırasıyla 5,265 µg/fare ve 5,761 µg/fare olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda, LD₅₀ ve ED₅₀ değerleri kullanılarak *A. crassicauda* ve *L. abduhbayrami* zehirlerinin LD₅₀'sini nötralize etmek için gerekli olan ulusal akrep antivenom miktarları hesaplanmıştır. Sonuçlarımıza göre, 1 ml

ulusal akrep antivenomu, 90,5488 LD₅₀ gücünde *A. crassicauda* venomunu nötralize etmekte iken, 64 LD₅₀ gücünde *L. abduhbayrami* venomunu nötralize etmiştir. Ozkan ve ark. (31), çalışmalarında *L. abduhbayrami* venom protein içeriğini 0,513 mg/ml olarak bulmuşlardır. SDS-PAGE ile 4 ile 6 kDa da daha güçlü olmak üzere 4, 6, 31 ve 46 kDa dört farklı protein bandı tespit etmişler. *L. abduhbayrami* akrep venomunun, elektroforetik protein modellerine göre hem kısa hem de uzun zincirli nörotoksinlere sahip olduğunu göstermişlerdir (31).

Çalışmamızda, *L. abduhbayrami* venomuna ait SDS-PAGE çalışmasında (Şekil 2) 84-66 kDa aralığında yaklaşık 70kDa'da çok yoğun olmayan bir protein bandı tespit edilmiştir. *L. abduhbayrami*'de asıl bant yoğunluklarının 14,2 kDa altında olduğu saptanmıştır. 70 kDa ile 14,2 kDa aralığında ise herhangi bir bant tespit edilememiştir. *L. abduhbayrami* venomunda 4 ila 6 kDa'lık moleküler ağırlıklara karşılık gelmesi beklenen uzun zincirli ve kısa zincirli peptid toksinleri ayrılanamamıştır. Bu ayrımın sağlanabilmesi için daha ayrıntılı moleküler, biyokimyasal ve proteomik analizler yapılması gerekmektedir.

Akrep sokması tedavisinde antivenomlar hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Çok sayıda epidemiyolojik ve klinik çalışma, antivenomun akrep sokması vakalarında başarıyla kullanıldığını göstermektedir (2, 20, 22-24, 31-36). Tulga (2), *L. quinquestratus* venomundan ürettiği antivenom ile 150 g ağırlığındaki sıçanlarda nötralizasyon testi yapmış ve 200 µl *L. quinquestratus* antivenomunun, sadece 2 MLD *L. quinquestratus* venomunu nötralize ettiğini, ancak 2.5 MLD *A. crassicauda* venomunu nötralize etmediğini bulmuştur. Bununla birlikte, eşit miktarda (0.2 ml) *A. crassicauda* antivenomunun, 2 MLD *L. quinquestratus* venomunu nötralize ettiğini de bildirmiştir. Ayrıca, *L. quinquestratus* zehirinin *A. crassicauda* zehirinden dört ila beş kat daha toksik olduğunu vurgulamıştır. Fakat antijenitesinin düşüklüğünden dolayı *L. quinquestratus* venomu antivenom üretiminde etkin kullanılamamaktadır. Tulga'nın (2) tespitlerine göre akrep venomlarında,

zehirlilik ile antijenite arasında bir ilişki olamayacağı, venomlarda türe özgü ayrı bir antijen bileşenin varlığını düşünmenin gerektiği belirtilmiştir. *A. crassicauda* ve *L. abduhbayrami*'ye karşı iki ayrı spesifik monovalan antivenom elde edildikten sonra, laboratuvar hayvanlarında nötralizasyon deneylerinden alınan sonuçlara göre, *A. crassicauda* antivenomunun 2 ml'lik miktarı beş akrebin homolog venomunu nötralize edebiliyorken aynı miktarda *L. abduhbayrami* antivenomunun ancak bir akrebe karşılık gelen homolog venomu nötralize edebildiği görülmüştür. Bu sonuç, *A. crassicauda* venomunun *L. abduhbayrami* akrebinin venomuna göre daha üstün bir antijenik nitelik taşıdığını ortaya koymaktadır. Bu nötralizasyon deneylerine paralel olarak yapılan çapraz koruma deneylerinden alınan sonuçlara göre ise, *A. crassicauda* antivenomunun aynı ölçüler içinde *L. abduhbayrami* venomunu da nötralize ettiği, fakat aksinin mümkün olmadığı tespit edilmiştir. Türkiye'nin her yerinde güvenle kullanılacak akrep antivenomunun, çok zehirli *L. abduhbayrami* venomuna karşı hazırlanmış antivenom değil, bundan 4-5 kez daha az zehirli *A. crassicauda*'ya karşı hazırlanmış monovalan serum olabileceği ortaya konulmuştur (12). Tulga (3) 1964'de İsrail'de yapılan çalışmada, *A. crassicauda* zehirine karşı hazırlanan Türk antivenomunun *L. quinquestriatus* zehirini nötralize edebildiğini gözlemlediklerini bildirmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yürütülen bir çalışmada, Türkiye'de Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'nde hazırlanan Türk antivenomunun kendi homolog venomunu uygun seviyede nötralize ettiği gözlenmiştir. Birbirinden farklı sekiz monovalan antivenom (Cezayir, Brezilya, Güney Afrika ve Meksika gibi ülkelerde üretilen) denenmiş ve Türk antivenomunun Cezayir'deki *A. australis* akrebinin venomunu kendi antivenomundan daha etkili nötralize ettiği bulunmuştur. Türk antivenomunun ayrıca, Güney Avrupa ile Kuzey Afrika'da bulunan *Buthus occitanus* ile Güney Amerika türü olan *Tityus serrulatus* türlerinin venomlarını da kendi antivenomlarıyla eşit seviyede nötralize ettiği bildirilmiştir. Türkiye'nin ürettiği

antivenomun Kuzey Amerika akrep türleri *Centruoides sculpturatus* ve *C. vittatus*'un venomlarıyla, Güney Afrika akrep türü olan *Parabuthus* spp.'nin venomunu ise homolog antivenom derecesinde olmasa da, onlara yakın bir seviyede nötralize ettiği gösterilmiştir (32). DSÖ'nün çalışmasında, Türkiye'de *A. crassicauda*'dan üretilen antivenomun bilinen antivenomlardan daha iyi sonuç verdiği görülmüştür (12, 32). Günümüzde, *A. crassicauda* antivenomunun, diğer akrep türlerinin sokmalarına karşı koruyuculuğunu bildiren başka çalışmalar da mevcuttur. Ozkan ve ark. (33) çalışmalarında *A. crassicauda* antivenomunun, hem *A. crassicauda* hem de *M. gibbosus* zehirlerini nötralize ettiğini bildirmiştir. *A. crassicauda* antivenomunun farelerde 20 MLD (MLD'nin 20 katı) *M. gibbosus* venomunu nötralize edebildiğini belirtmişlerdir. Ozkan ve Carhan (34), *A. crassicauda* antivenomunun Türkiye'deki *Mesobuthus eupeus* akrep sokmalarının tedavisinde de kullanılabileceğini göstermişlerdir. *A. crassicauda* antivenomunun *M. eupeus* ve *A. crassicauda* akrep zehirlerine karşı nötralizasyonunu araştırdıkları çalışmalarında LD₅₀ değerlerini sırasıyla 0,18 mg/kg, 15,45 µg/kg olarak bulmuşlardır. Bir ml *A. crassicauda* antivenomunun farelerde 464 LD₅₀ *M. eupeus* zehirini ve 940 LD₅₀ *A. crassicauda* zehirini nötralize ettiğini ve monovalan *A. crassicauda* antivenomunun, *M. eupeus* akrep zehirine karşı da immünoaktiviteye ve nötralize etme kapasitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ozkan ve ark. (35) *A. crassicauda* antivenomunun *L. quinquestriatus* zehirine etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, farelerde 0,4 ml *A. crassicauda* antivenomunun 10 MLD *L. quinquestriatus* zehirini nötralize ettiğini göstermişlerdir. Ozkan ve Yagmur (36), ulusal akrep antivenomunun *M. eupeus eupeus*, *M. gibbosus* akrepleri üzerindeki etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında *M. eupeus eupeus*, *M. gibbosus* ve *A. crassicauda* akrep zehirleri için sırasıyla 1,92 mg/kg (i.v.), 0,67 mg/kg (s.c.) ve 0,24 mg/kg (s.c.) LD₅₀ değerlerini bulmuşlardır. Bir ml ulusal akrep antivenomunun farelerde 23 LD₅₀ *M. e. eupeus*, 32 LD₅₀ *M. gibbosus* ve 42 LD₅₀ *A. crassicauda* zehirini nötralize ettiğini tespit etmişlerdir. Ulusal akrep antivenomunun

hem spesifik zehir ile hem de *Mesobuthus* türü zehirleri ile güçlü bir şekilde reaksiyona girdiği gösterilmiş ve *M. eupeus eupeus* ve *M. gibbosus* akrep sokmaları tarafından zehirlenmelerin tedavisinde kullanılabilceği bildirilmiştir.

Akrep sokmalarının sıklıkla yaşandığı ülkelerde polivalan ve monovalan karakterde akrep antiserumu üretimi yapılmaktadır (37,38). VACSERA polivalan at kaynaklı akrep antiserumunun Mısır ve Yemen akrepleri üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, Mısır kaynaklı *L. quinquestriatus*, *A. crassicauda*, *A. amorexi* ve *A. australis* türleri için LD₅₀ değerleri sırasıyla 6,9, 8,3, 12,5 ve 6,94 LD₅₀/fare bulunurken, Yemen kaynaklı *L. quinquestriatus*, *Buthus* spp. ve *A. australis* türleri için 6,4 ± 6, 20,7 ve 7,0 LD₅₀/fare bulunmuştur. *L. quinquestriatus* ve *A. crassicauda* zehirlerinin atlara enjeksiyonu ile elde edilen polivalan akrep antiserumunun Mısır kaynaklı *L. quinquestriatus*, *A. crassicauda*, *A. amorexi* ve *A. australis* türlerinin sırasıyla 70, 35, 45 ve 60 LD₅₀/fare potens değerleri ile nötralize etmede etkili olduğu saptanmıştır. Yemen kaynaklı *L. quinquestriatus*, *Buthus* spp. ve *A. australis* türleri için ise 70, 20 ve 60 LD₅₀/fare potens değerleri tespit edilmiştir (37). Farelerde *L. quinquestriatus* quinquestriatus akrep zehirinin öldürücü ve patofizyolojik değişikliklerine karşı polivalan iki antivenomun (Suudi Arabistan ve Mısır) etkinliğinin karşılaştırıldığı çalışmada, Mısır antivenomunun protein konsantrasyonunun Suudi Arabistan antivenomunun üç katı olduğu ve her iki antivenomun beklenen nötralizasyon kapasitelerini (60-70 LD₅₀) sağladıkları bildirilmiştir (38).

Sonuç olarak; çalışmamız *L. abduhbayrami* zehirlenmelerine karşı *A. crassicauda* antivenomunun etkinliğinin *invitro* ve *invivo* gözlemlendiği ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz sonuç, *A. crassicauda* antivenomunun *L. abduhbayrami* akrep sokmalarında kullanıldığında akrep zehirlenmesinin önlenmesindeki etkinliğini göstermektedir. *A. crassicauda* antivenomunun klinik yararlarını belirlemek için diğer tür akrep sokmaları üzerinde de çalışmalar yapılmalıdır. *A. crassicauda* antivenomunun akrep sokmaları üzerindeki etkileri epidemiyolojik ve klinik çalışmalarla daha iyi tespit edilmelidir. Çalışmamız, *A. crassicauda* antivenomunun *L. abduhbayrami* ile akrep sokmalarında antivenom dozunda yapılacak ayarlama ile güvenle kullanılabilceğini göstermiştir. Türkiye'nin bugün için bilinen en zehirli akrebi *L. abduhbayrami* olmasına rağmen Türkiye'de antivenom üretimi bakımından en uygun antijen *A. crassicauda*'nın venomudur. Bu venomla hayvanların bağışıklanması çok kolay olduğu gibi, zehirlenmeler nedeniyle antivenom üretim hayvanı kaybı da yok denecek kadar az olmaktadır. Ayrıca *A. crassicauda* akrep türüne karşı hazırlanmış antivenomun oldukça geniş bir paraspesifik etki alanı olduğu ve bu antivenomun hem Türkiye'nin hem de Dünya'nın birçok bölgesinde bulunan *L. abduhbayrami* akrep sokmalarında tam bir güvenle uygulanabileceği gözlenmiştir. Diğer ülkelerde görülen *A. crassicauda* ve *L. abduhbayrami* türü akrep sokmalarına bağlı zehirlenmelerde de ulusal akrep antivenomunun rahatlıkla ve etkili bir şekilde kullanılabilceği bu çalışma ile ilk kez ortaya konulmuştur.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz kurumu Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:29.09.2021 ve Karar No: E.39634851-1121844).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Oytun HŞ. Tıbbi Entomoloji. Ankara Ü Tıp Fak. Yayınları Sayı: 218. 1969.
2. Tulga T. Türkiye’de varlığı ilk defa tespit edilen bir akrep türü (*Buthus quinquestriatus*) ile *Prionurus crassicauda*’ya karşı hazırladığımız akrep serumları arasında çapraz proteksiyon deneyleri. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 1960; 20:191-203.
3. Tulga T. Türkiye’deki akrep serumu üretimindeki gelişmeler. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 1964; 24: 147-55.
4. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington DC: National Academy Press. Eighth Edition. 2011.
5. Ozkan O., Karaer K.Z. Türkiye Akrepleri. *Türk Hij Den Biyol Derg* 2003; Cilt 60, No 2, S: 55-62.
6. Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. *Toxicon*, 2015;93:125-35.
7. Lourenço WR, Qi JX, Cloudsley-Thompson JL. The African species of the genus *Leiurus* Ehrenberg, 1828 (Scorpiones: Buthidae) with the description of a new species. *Bol Soc Entomol Aragonesa*, 2006;39:97-101.
8. Lourenço WR, Modry D, Amr Z. Description of a new species of *Leiurus* Ehrenberg, 1828 (Scorpiones, Buthidae) from the South of Jordan. *Revue Suisse de Zoologie*, 2002;109(3):635-42.
9. Kovarik F. *Leiurus nasheri* sp. nov. from Yemen (Scorpiones, Buthidae). *Acta Soc Zool Bohem*, 2007;71:137-41.
10. Yagmur EA, Koç H, Kunt KB. Description of a new species of *Leiurus* Ehrenberg, 1828 (Scorpiones: Buthidae) from Southeastern Turkey. *Euscorpius*, 2009;85(85):1-20.
11. Khalil N, Yagmur EA. *Leiurus abdullahbayrami* (Scorpiones: Buthidae), a new species for the scorpion fauna of Syria. *Serket*, 2010;12(1):1-6.
12. Filazi A, Ozkan O. The history of scorpion serum in Turkey. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2021;78(1): 107-116.
13. Ulutaş V. *Leiurus abdullahbayrami* türü akrep venomunun proteomik analizi. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2017.
14. Corzo G, Escoubas P, Villegas E, Barnham KJ, He W, Norton RS, Nakajima T. Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion *Pandinus imperator*. *Biochem J*, 2001;359(Pt 1):35-45.
15. Caliskan F, Quintero-Hernandez V, Restano-Cassulini R, Batista CVF, Zarnudio F Z, Coronas FI, et al. Turkish scorpion *Buthacus macrocentrus*: general characterization of the venom and description of Bu1, a potent mammalian N-channel α -toxin.. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology, 2012; 59(3): 408-15.
16. Götze S, Saborowski R. NanoDrop fluorometry adopted for microassays of proteasomal enzyme activities. *Anal Biochem*, 2011;413(2):203-5.
17. Ozkan O. Scorpion antivenom production. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2008; 65(2): 97-108.
18. Bozyigit I, Koç F, Katili F, Ozkan O, Filazi A. Scorpion serum monograph. *Türk Pharmacopoeia Derg*, 2018; 10.13140/RG.2.2.28306.91845.
19. Çalışkan F, Sivas H, Sahin Y. A Preliminary study for the detection of gelatinolytic proteases from the scorpion *Androctonus crassicauda* (Turkishblack scorpion) venom. *Türk J Biochem*, 2009; 34(3): 148-53.
20. Adiguzel S, Ozkan O, Inceoglu B. Epidemiological and clinical characteristics of scorpionism in children in Sanliurfa, Turkey. *Toxicon*, 2007;49(6):875-80.
21. Ozkan O, Adiguzel S, Inceoglu B, Lango J, Ertek M, Hammock BD. Evaluation of the neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807) antivenom against *Leiurus quinquestriatus* (Ehrenberg, 1928) venom (Scorpiones: Buthidae). *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 2008; 14(3), 481-96.
22. Yakıncı C, Almış H, Demirbağ Ö, Kayhan E, Elkıran Ö. Son beş yıldaki akrep sokması olgularımız. *Ege Tıp Derg*, 2015; 54(2): 74-7.

23. Caglar A, Köse H, Babayigit A, Oner T, Duman M. Predictive factors for determining the clinical severity of pediatric scorpion envenomation cases in southeastern Turkey, Wilderness Environ Med, 2015; 26(4): 451-8.
24. Zengin, N., Anil, M., Anil, A. B., Can, F. K., Bal, A., Bicilioglu, Y., . . . Gökalp, G. Clinical characteristics of pediatric scorpion envenomation in the aegean region: An experience of a training and research hospital. Çocuk Acil Ve Yogun Bakım, 2016; 3(2), 69-75.
25. Dokur M, Doğan M, Yağmur E. Scorpion-related cardiomyopathy and acute pulmonary edema in a child who is stung by *Leiurus abduhbayrami*. Turk J Emer Med. 2017;17.
26. Altınkaynak S, Ertekin V, Alp H. Scorpion envenomation in children. Turk Arch Ped, 2002; 37: 48-54.
27. Soker M, Haspolat K. Güneydoğu ve Anadolu bölgesinde çocuklarda akrep sokması: 64 vakanın değerlendirilmesi. Çocuk Sağ Hast Derg, 2000; 43: 43-50.
28. Ozkan O, Alcigir ME. A comparative pathomorphological findings between *Leiurus abduhbayrami* and *Androctonus crassicauda* (Scorpion: Buthidae) envenomation in rabbit animal model. J Arthropod Borne Dis, 2019;13(1):104-15.
29. Theakston RD, Warrell DA, Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. Toxicon, 2003; 41:541-57.
30. Krifi MN, Marrakchi N, el Ayeb M, Dellagi K. Effect of some variables on the in vivo determination of scorpion and viper venom toxicities. Biologicals, 1998; 26(4):277-88.
31. Ozkan O, Yagmur EA, Ark M. A newly described scorpion species, *Leiurus abduhbayrami* (Scorpion: Buthidae), and the lethal potency and in vivo effects of its venom. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis, 2011; 17(4), 414-21.
32. Whittemore FW, Keegan HL, Borowitz JL. Studies of scorpion antivenins. 1. paraspecificity. Bull World Health Organ, 1961;25:185-8.
33. Ozkan O, Adiguzel S, Kar S, Yakistiran S, Cesaretli Y, Karaer KZ. Determination of potency and paraspecific effects of *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807) antivenom against *Mesobuthus gibbosus* (Brullé, 1832) venom (Scorpiones: Buthidae). J Venom Anim Toxins incl Trop Dis, 2007; 13(2): 500-8.
34. Ozkan O, Carhan A. The neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* antivenom against *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. Toxicon, 2008 Aug; 1;52(2):375-9.
35. Ozkan O, Adiguzel S, Onceoglu B, Lango J, Ertek M, Hammock BD. Evaluation of the neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807) antivenom against *Leiurus quinquestratus* (Ehrenberg, 1928) venom (Scorpiones: Buthidae). J Venom Anim Toxins incl Trop Dis, 2008;14(3):481-96.
36. Ozkan O, Yağmur EA. Neutralization capacity of monovalent antivenom against existing lethal scorpions in the Turkish scorfiofauna. Iran J Pharm Res. 2017;16(2):653-60.
37. Elfiky A, Attia H, Abd Elaziz M. CROSS neutralization of some kinds of scorpion venoms from Africa and south east using *Vacsera* polyvalent scorpion antisera. J Egypt Soc Parasitol, 2019; 49(2): 443-9.
38. Fatani AJ, Ahmed AA, Abdel-Halim RM, Abdoon NA, Darweesh AQ. Comparative study between the protective effects of Saudi and Egyptian antivenoms, alone or in combination with ion channel modulators, against deleterious actions of *Leiurus quinquestratus* scorpion venom. Toxicon, 2010;55(4):773-86.

Mitigative effects of chloroquine treatment against hypoxia-induced intestinal injury: a histological and immunohistochemical study

Hipoksiye bağlı bağırsak hasarına karşı klorokin tedavisinin hafifletici etkileri: histolojik ve immünohistokimyasal bir çalışma

Ali Tuğrul AKIN¹ (ID), Emin KAYMAK² (ID), Emel ÖZTÜRK³ (ID), Tayfun CEYLAN⁴ (ID), Betül YALÇIN⁵ (ID), Kemal Erdem BAŞARAN⁶ (ID), Derya KARABULUT⁵ (ID), Züleyha DOĞANYİĞİT² (ID), Saim ÖZDAMAR⁷ (ID), Birkan YAKAN⁵ (ID)

ABSTRACT

Objective: Hypoxia has an important role in the disruption of intestinal mucosal integrity because of inflammation and apoptosis induced by inflammatory cytokines such as TNF- α (Tumor necrosis factor-alpha), IL-6 and IFN- γ , and apoptotic regulatory proteins. Chloroquine (CLQ) is a drug used in the novel coronavirus disease (COVID-19) and is widely used for the treatment of many inflammatory diseases such as malaria and rheumatoid arthritis. In this study, we aimed to reduce the destructive effects of hypoxia-induced inflammation and apoptosis in the intestinal mucosa of rats with CLQ applications.

Methods: For this purpose, a total of 24 Wistar Albino rats were randomly divided into three groups; Group I: Control group (n=8), Group II: Hypoxia (n=8) and Group III: Hypoxia + CLQ (n=8). The control group was housed in plexiglass cages to keep the oxygen levels at 10% levels for 28 days, while the hypoxia and hypoxia+CLQ groups were housed in a normal atmospheric environment (21%

ÖZET

Amaç: Hipoksi, TNF- α (Tumor necrosis factor-alpha), IL-6 ve IFN- γ gibi inflamatuvar sitokinler ve apoptotik düzenleyici proteinler tarafından indüklenen apoptoz neticesinde bağırsağın mukozal bütünlüğünün bozulmasında önemli bir role sahiptir. Klorokin (CLQ), yeni koronavirüs hastalığında (COVID-19) kullanılan bir ilaçtır ve sıtma ve romatoid artrit gibi birçok inflamatuvar hastalığın tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, sıçanların bağırsak mukozasında hipoksi ile indüklenen inflamasyon ve apoptoza bağlı yıkıcı etkilerin CLQ uygulamaları ile azaltılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu amaçla toplam 24 adet Wistar Albino rat rastgele üç gruba ayrılmıştır; Grup I: Kontrol grubu (n=8), Grup II: Hipoksi (n=8) ve Grup III: Hipoksi + CLQ (n=8). Kontrol grubu normal atmosferik ortamda (%21 O₂), hipoksi ve hipoksi+CLQ grupları oksijen seviyelerinin 28 gün boyunca %10 seviyelerinde tutulabilmesi için pleksiglas kafeslerde barındırılmış

¹Erciyes University, Faculty of Science, Biology Department, Kayseri

²Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Histology-Embriology Department, Yozgat

³Harran University, Faculty of Medicine, Histology-Embriology Department, Şanlıurfa

⁴Kapadokya University, Kapadokya Vocational High School, Program of Pathology Laboratory Techniques, Nevşehir

⁵Erciyes University, Faculty of Medicine, Histology-Embriology Department, Kayseri

⁶Erciyes University, Faculty of Medicine, Physiology Department, Kayseri

⁷Pamukkale University, Faculty of Medicine, Histology-Embriology Department, Denizli



İletişim / Corresponding Author : Ali Tuğrul AKIN

Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, C2-1k-13, Talas, Kayseri - Türkiye

E-posta / E-mail : tugrul.akinn@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 28.06.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 28.07.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.78476

Akin AT, Kaymak E, Öztürk E, Ceylan T, Yalçın B, Başaran KE, Karabulut D, Doğanyığıt Z, Özdamar S, Yakan B. Mitigative effects of chloroquine treatment against hypoxia-induced intestinal injury: a histological and immunohistochemical study. Turk Hij Den Biol Derg, 2022; 79(1): 59 - 70

O₂), and the hypoxia+CLQ group was administered CLQ at a dose of 50 mg/kg every day for 28 days. At the end of the experiment, the intestinal tissues of the experimental animals, were extracted under the anesthesia and they were sacrificed.

Results: As a result of histopathological evaluations, it was determined that CLQ applications showed healing properties on the histopathological effects induced by hypoxia in the intestine. While an increase in TNF- α expression was observed in the hypoxia group, a statistically significant decrease was detected in the hypoxia+CLQ group. In addition, Bax expression was found to be statistically significantly lower in the hypoxia+CLQ group when compared to the hypoxia group. On the contrary, it was observed that Bcl-2 expression was statistically significantly increased in the hypoxia+CLQ group compared to the Hypoxia group.

Conclusion: We observed that hypoxia causes significant damage to the intestinal mucosa and triggers a severe inflammation that drives cells to apoptosis. Considering the curative effects of chloroquine on the intestinal mucosa, we suggest that this anti-inflammatory drug has a potential to use clinically to alleviate the deleterious effects of hypoxia in the intestine.

Key Words: Apoptosis, chloroquine, hypoxia, TNF- α , intestine

ve hipoksi+CLQ grubuna 28 gün boyunca her gün 50 mg/kg dozda CLQ uygulanmıştır. Deneş sonunda anestezi altında bağırsak dokuları çıkarılan deneş hayvanlarının yaşamlarına son verilmiştir.

Bulgular: Histopatolojik değerlendirmeler sonucunda CLQ uygulamalarının, hipoksinin bağırsakta indüklediği histopatolojik etkiler üzerinde iyileştirici özellikler gösterdiği belirlenmiştir. Hipoksi grubunda TNF- α ekspresyonunda artış gözlenirken, hipoksi+CLQ grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Ayrıca hipoksi+CLQ grubunda Bax ekspresyonunun Hipoksi grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir. Bunların aksine, Bcl-2 ekspresyonunun hipoksi+CLQ grubunda hipoksi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu gözlenmiştir.

Sonuç: Hipoksinin barsak mukozasında önemli bir hasara neden olduğunu ve hücreleri apoptoza sürükleyen ciddi bir inflamasyonu tetiklediğini gözlemledik. Klorokinin bağırsak mukozası üzerindeki iyileştirici etkileri göz önüne alındığında, bu anti-enflamatuar ilacın, bağırsakta hipoksinin zararlı etkilerini hafifletmek için klinik olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, klorokuin, hipoksi, TNF- α , bağırsak

INTRODUCTION

Hypoxia is known as a restricted oxygen (O₂) in an organism or in a situation (1). In an organism, hypoxia means a state in which oxygen is not enough for the tissue oxygen necessity to sustain homeostasis. This may cause weak oxygen transportation into the tissues both owing to lower blood quantity and lower oxygen volume in blood. The level of hypoxia can be

various, and it may be mild or hazardous to organisms. It can be applied as acute, chronic or combination of acute and chronic applications. Although some tissues overcome the destructive effects of hypoxia for a long time, other tissues are very sensitive even to relatively low oxygen levels (2-4).

In addition to digestion and absorption functions, studies have showed that the gastrointestinal tract have many other functions such as mucosal barrier,

endocrine and immunomodulatory functions. Intestinal mucosal barrier is one of the most substantial barrier systems of body and it includes biological barrier, chemical barrier and immune barrier. Thanks to collaboration of these different barriers which have different conformation, molecular structure and biological functions, a powerful defence mechanism is formed against pathogenic antigens or foreign microorganism via combined and complicated signalling pathways (5).

Hypoxic conditions can trigger a barrier dysfunction in gastrointestinal tract. As a consequence of this barrier dysfunction, a systemic inflammation can take place because of the bacterial and other pathogenic invasions; it is also the key factor which induces high-altitude multiple organ dysfunction syndrome (6). Moreover, it is considered that hypoxia is one of the important factors in the pathogenesis of bowel diseases such as Crohn's disease (7).

The restricted energy synthesis induced by hypoxia reduces cilia swinging, decelerates peristaltic movement and prevents the cleaning of the gastrointestinal tract. Furthermore, sufficient blood and oxygen demand of gastrointestinal mucosa for healthy function can vary under specific conditions. Therefore, hypoxia can damage to the intestinal villi (8). The anatomical and chemical structures of gastrointestinal microvilli are also very sensitive to hypoxic conditions (9, 10).

Many researches have shown that the immunomodulatory function of intestinal barrier is maintained by an organization of several cytokines such as ILs, IFNs and TNF- α (11). Hence, the imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines can be harmful to intestinal mucosa. It is shown that hypoxia can increase permeability of intestinal mucosa in vivo and it can induce the activation of inner immune cells. Activation of the immune cells leads the mucosal immune system response (12). TNF- α , IL-6, and IFN- γ are important inflammatory factors playing important roles in various inflammatory reactions and are highly correlated with the severity of inflammation (13).

Apoptosis plays an important role in the intestinal epithelium and it occurs in response to the stress of intestinal epithelial cells. Apoptosis can be induced in the epithelium of both crypt and villi (14). Bcl-2 family proteins are the first ones among discovered apoptosis regulators in mammals and they can regulate apoptosis both negatively and positively (15, 16). Bcl-2 and Bcl-XL proteins are anti-apoptotic regulators of programmed cell death, and they inhibit apoptosis induced by several factors in most cell types while Bax and Bid induce or enhance apoptosis (17, 18).

CLQ is administered against malaria (19). CLQ is recommended and used in the treatment of COVID-19 pneumonia. (20) CLQ is also used in the treatment of rheumatoid arthritis (21). The effect of TNF- α is prevented by the lysosomal protease inhibitor chloroquine (22). CLQ pre-treatment could improve mortality in mice by inhibiting inflammatory pathways and lethal death (23).

In the present study, we investigated the impact of CQ treatment on normobaric hypoxia-induced intestine injury in rats. The aim of this study is to investigate the protective effects of CLQ in the gastrointestinal tract of rats exposed to normobaric hypoxia. For this purpose, we evaluated the histopathological changes in duodenum, and changes in the expression of TNF- α as a tissue inflammatory mediator. In addition, we evaluated changes in the expression of Bax and Bcl-2, which are the pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins.

MATERIAL and METHOD

Experimental Design

Mature 24 male Wistar inbred albino rats were obtained from the Experimental and Clinical Research Centre of Erciyes University. All procedures were carried out in accordance with the Universal Declaration of Animal Rights, with the approval of the Ethical Committee (Date: 14.02.2018, Decision no: 18/027) of Erciyes University Experimental Animals.

Rats were fed with pellet food and they had free access to drinking water. The room temperature was held constant at $23\pm 1^\circ\text{C}$ and 12 h night-day cycle was applied. Animals were treated in accordance with the Guidelines for Animal Experimentation of Jichi Medical University (Shimotsuke, Japan), based on the National Institutes of Health Guidelines for the Use and Care of Laboratory Animals.

The rats were randomly divided into three groups as follows: Control group (n=8), Hypoxia group (HX, n=8), Hypoxia plus Chloroquine (Sigma Aldrich, C6628) group (Hypoxia+CLQ, treated with 50 mg/kg/day chloroquine). Rats in Control group were kept in room air. Rat in Hypoxia and Hypoxia+CLQ groups were put in Plexiglas chambers which could allow maintaining oxygen levels at 10% and their oxygen levels were monitored in the chambers.

During the 28 days, all groups were given equal volumes of intraperitoneal (i.p.) injections. The CLQ preparation was diluted with distilled water. The control group was given the same volume of distilled water. The hypoxia group was given 10% oxygen and i.p. distilled water. Hypoxia+CLQ group were given 10% oxygen and 50 mg/kg/day CLQ intraperitoneally. The study was terminated on day 28. The rats were sacrificed by decapitation under i.p. ketamine (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) anaesthesia. After decapitation, intestine tissues were rapidly excised and left in 10% neutral formalin fixation solution for histological and immunohistochemical examination.

Histological Evaluation

Intestine samples were fixed for 72 hr in 10% neutral formalin solution. After washing with water, samples were dehydrated following through a graded alcohol series. Xylol were used for clearing the samples and the tissues were embedded in paraffin blocks. The 5 μm thick sections were taken from the paraffin blocks and they were stained with haematoxylin-eosin for evaluating histological changes. The histological changes were scored from 0 to 3 according to the histological findings. Scoring was performed with

these steps: 0 represents no pathological findings, and 1, 2 and 3 represent pathological findings and 1; mild, 2; moderate and 3 was severe. Moreover, presence of leukocyte infiltration and mucosal degeneration at intestinal mucosa were examined on the sections. Changes in the intestinal morphology was evaluated by measuring the length and width of the intestinal villi and height of intestinal mucosa. Images were taken with light microscope (Olympus BX51; Olympus, Tokyo, Japan) and photos were taken with camera attachment of this microscope. The histological examinations were performed by histologists of the study group.

Immunohistochemistry

TNF- α , Bax and BCL₂ expression were detected immunohistochemically using a polyclonal antibody and the streptavidin-biotin-peroxidase technique (24). The sections were deparaffinized in xylene, rehydrated through graded alcohols and washed in deionized water. Antigen retrieval was performed by microwave treatment in 0.01 M sodium citrate buffer, pH 6.0, at 95°C for 5 min. The slides were cooled and held at room temperature for 10 min. Sections were washed with PBS. Endogenous peroxidase activity was inhibited by immersion in 3% (w/v) H₂O₂ for 12 min. Lab Vision™ UltraVision™ Large Volume Detection System (TP-125-HL; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was used. All sections were washed with distilled water, then Ultra V block was applied for 10 min at room temperature to block background staining. Sections then were incubated overnight at 4°C with an TNF- α (52B83) mouse monoclonal antibody diluted 1:50 (sc-52746; Santa Cruz Biotechnology), Bax rabbit polyclonal antibody diluted 1:200 (bs-0127R; Bioss), Bcl-2 rabbit polyclonal antibody diluted 1:200 (bs-4563R; Bioss) in antibody diluent buffer (TA-125-ADQ; Thermo Fisher Scientific). After washing with PBS, sections were incubated with biotinylated goat anti-polyvalent secondary antibodies (TP-125-BN) (TP-125-HL; Thermo Fisher Scientific). The immunoreaction was amplified using the streptavidin-

avidin-peroxidase complex and visualized using 3,3'-p-diaminobenzidine tetrahydrochloride (TA-060-HDX; Thermo Fisher Scientific). After counterstaining with Gill's haematoxylin, sections were washed three times with deionized water. Then, the sections were dehydrated through rising alcohols, cleared in xylene and mounted with Entellan. Images were taken using a light microscope (Olympus BX51; Olympus). At least five randomly chosen fields in each slide were counted at the original $\times 20$ magnification. The immunoreactivity was scored from 0 to 3 according to the histological findings and 0 represents no staining, and 1, 2 and 3 represent 1; less staining, 2; moderate staining and 3; strong staining.

Statistical Analysis

All statistical analyses were carried out using SPSS statistical software (SPSS for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, version 24.0) and graphs were drawn by using Graphpad Prism 8.0 software. The Kolmogorov-Smirnov test was used to identify normal distribution of the data. In case of normal distribution, quantitative variables were compared using One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test. The data

was presented as the mean of normalized data \pm standard deviation of the mean (SEM). p -value < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Histological findings

Intestinal mucosa showed a healthy histological structure in control group and there were no detected defects in the intestinal mucosa and villi. In the hypoxia group, it showed increased mucosal degeneration and inflammatory cells. The intestinal villi height in the hypoxia group were decreased and villi width was thinner than control groups. The intestinal mucosa of hypoxia group was shorter than the control group (Figure 1). Damage of intestinal mucosa ($p < 0.001$), the height of the intestinal villi ($p < 0.022$), the villi width ($p < 0.001$), thickness of the mucosa ($p < 0.005$) was significantly decreased in the hypoxia group as compared to the control group. Treatment with CLQ significantly reduced the damage on the histological structure of the intestine in rats exposed to hypoxia (Table 1, Figure 1 and Figure 2).

Table 1. Changes in the histological damage score and measurements (μ) of the villi height, villi width and mucosa thickness among groups

Groups	Control	Hypoxia	Hypoxia+CLQ	p
Score of Damage	0.06 \pm 0.25	1.46 \pm 1.19 ^a	0.64 \pm 1.28 ^b	0.001
Villi Height	672.43 \pm 127.47	593.09 \pm 148.37 ^a	645.81 \pm 84.44	0.022
Villi Width	177.17 \pm 54.39	140.36 \pm 36.98 ^a	151.71 \pm 38.03 ^a	0.001
Mucosa Thickness	915.13 \pm 158.60	822.38 \pm 162.11 ^a	931.68 \pm 152.18	0.005

Data are expressed as mean \pm SD. Significant result was considered when $p < 0.05$. (Tukey's post-hoc test).

^a Significantly different from control group.

^b Significantly different from both control and hypoxia group.

CLQ: Chloroquine.

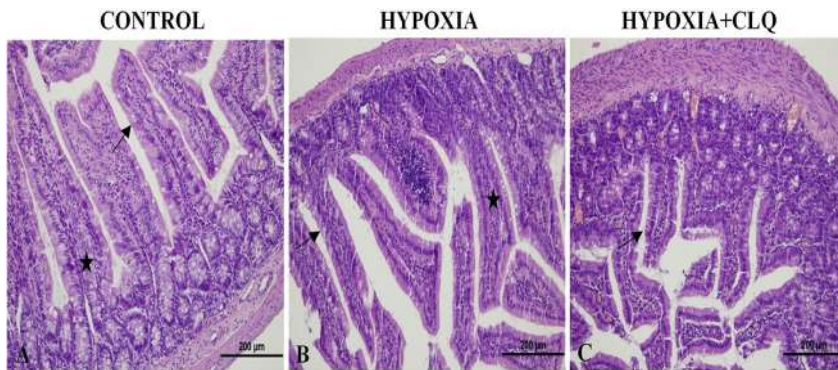


Figure 1. Haematoxylin-eosin (H&E) staining to evaluate the effects of hypoxia on the intestinal epithelium, intestinal villi height, villi width and thickness of mucosa.

(A) Control group given distilled water by i.p. injection.

(B) Hypoxia group exposed to reduced oxygen level (10%) and given same volume distilled water by i.p. injection for 28 days.

(C) Hypoxia+CLQ group exposed to hypoxic oxygen level (10%) and given chloroquine (50 mg/kg/day) by i.p. injection for 28 days. Arrows show the intestinal epithelium and stars show the intestinal villi.

Stars show the villi width.

CLQ: Chloroquine

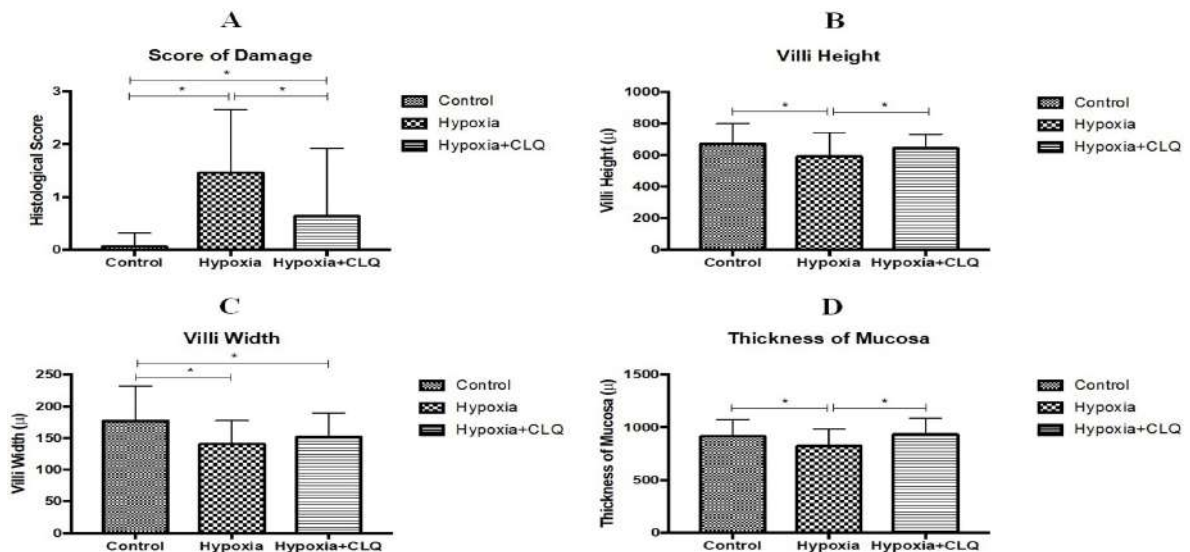


Figure 2. (A) Graphics of histopathological score of intestinal damage, (B) changes in measurements (μ) of the intestinal villi height (B) and villi width (C) and thickness of intestinal mucosa (D).

Measurements were statistically analysed with SPSS statistical software (SPSS for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, version 24.0). Statistical significance among groups were determined by Tukey's post hoc test and results were transformed to graphs by using Graphpad Prism 8.0 software.

* shows the significant difference among groups.

CLQ: Chloroquine

Immunohistochemical Findings

TNF- α , Bax and Bcl-2 expressions were observed in the intestinal epithelium. In the hypoxia group, TNF- α and Bax expressions statistically increased when compared with control group while Bcl-2 expression significantly reduced compared to control group. In

the hypoxia+CLQ group, TNF- α and Bax expressions statistically reduced compared with that in group hypoxia. Additionally, In the hypoxia+CLQ group, Bcl-2 expression statistically increased compared with that in group hypoxia (Table 2, Figure 3 and Figure 4).

Table 2. Immunoreactivity score of TNF- α , Bax and Bcl-2 among groups

Groups	Control	Hypoxia	Hypoxia+CLQ	p
TNF- α	1.30 \pm 0.83	2.96 \pm 0.18 ^a	1.32 \pm 0.74	0.001
Bax	0.43 \pm 0.56	2.83 \pm 0.37 ^a	1.25 \pm 1.12 ^b	0.001
Bcl-2	2.10 \pm 0.92	0.93 \pm 0.90 ^a	1.96 \pm 1.11	0.001

Data are expressed as mean \pm SD. Significance among groups were considered when $p < 0.05$.

^a Significantly different from control group.

^b Significantly different from both control and hypoxia group.

CLQ: Chloroquine; TNF- α :Tumor necrosis factor-alpha.

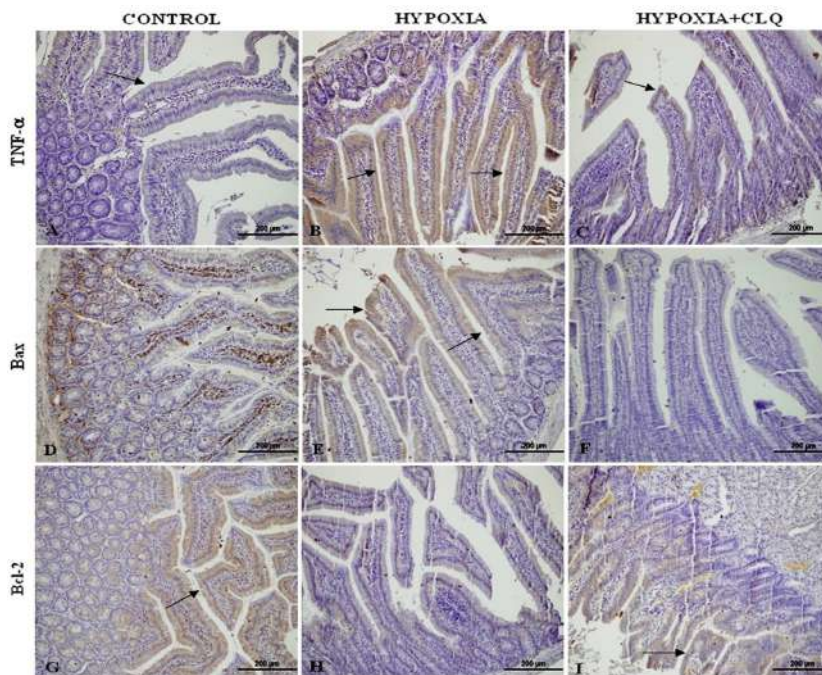


Figure 3. Immunohistochemical stainings of all groups by using TNF- α , Bax and Bcl-2 polyclonal antibodies and streptavidin-biotin-peroxidase technique.

Control group (A) and Hypoxia+CLQ group (C) of TNF- α staining show less immunoreactivity while Hypoxia group (B) of TNF- α shows strong immunoreactivity. Similarly, Hypoxia group (E) of Bax shows strong immunoreactivity when compared with Control group (D) and Hypoxia+CLQ group (F) of Bax. On the other hand, Hypoxia group (H) of Bcl-2 immunostaining shows less immunoreactivity while Control group (G) and Hypoxia+CLQ (I) group show strong immunoreactivity.

Arrows show the immunoreactive cells at the intestinal epithelium.

CLQ, Chloroquine; TNF- α , Tumor necrosis factor-alpha

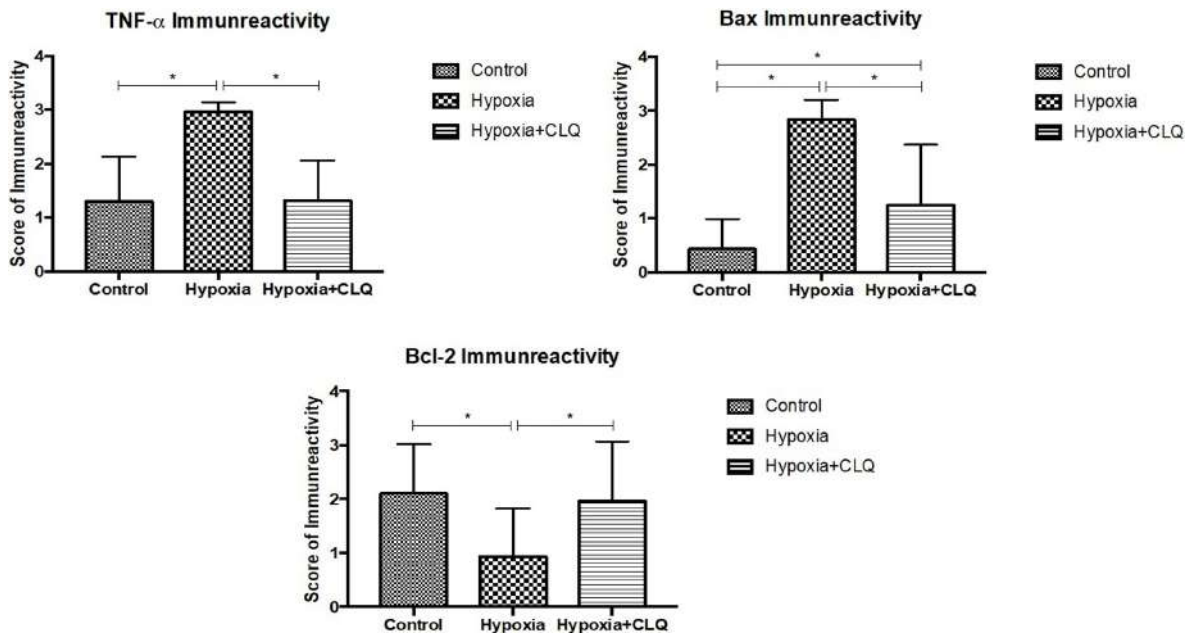


Figure 4. Graphics obtained from the analysis of TNF- α , Bax and Bcl-2 immunoreactivity scores.

Data scored by histologist of the study group were analysed with SPSS statistical software (SPSS for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, version 24.0).

Statistical significance among groups were determined by Tukey's post hoc test and results were transformed to graphs by using Graphpad Prism 8.0 software.

* shows the significant difference among groups.

CLQ, Chloroquine; TNF- α , Tumor necrosis factor-alpha

DISCUSSION and CONCLUSION

Instabilities between oxygen levels supplied to tissues and oxygen consumption result in tissue hypoxia. Hypoxia causes many pathophysiologic conditions in some process and situations such as ion homeostasis, proliferation, differentiation, erythropoiesis, angiogenesis (25).

Entireness of intestinal mucosa is a major element for normal physiologic function and disease prevention. Wu et al. (26) have reported that the intermittent hypoxia disrupts the intestinal structure. In this study, we show that the chronic hypoxia causes a significant damage in intestinal mucosa. Intestinal damage score is high numbered in hypoxia group when considered control group. Moreover, in hypoxia group, there is a significant decrease in intestinal villi height, villi width and mucosa thickness (Table 1).

Several studies have showed that hypoxia plays a role in cell death by apoptosis, oxidative stress and inflammation. As a major mechanism regulating the cell death, apoptosis has an important role in hypoxia-induced cell damage. Many results have suggested that there is a close link between hypoxia and apoptosis. Hypoxia may cause apoptosis by upregulation of hypoxia-inducible factor (HIF), increased free oxygen radicals, overloading calcium ions and mitochondrial damage (27). Recent studies have indicated hypoxia increases the production of mitochondrial reactive oxygen levels (ROS) and reduces the antioxidant defense (28). ROS can interact with biomolecules and can damage several cell component such as DNA, RNA, proteins and lipids (29, 30). In the light of several studies, we believe that the intestinal structure disruption such as reducing intestinal villi height, villi width and mucosal thickness is because

of apoptosis triggered by HIF and increased ROS at intestinal mucosal region.

Kalpna et al. (31) have suggested that hypoxia induces excessive production of inflammatory cytokines such as nuclear factor kappa-B (NF- κ B), interleukin-1 alpha (IL-1 α) and TNF- α causing systemic inflammation and cell death in their study. They used male Sprague-Dawley rats as a model organism, and they exposed them hypobaric hypoxia. As a result, they observed a significant increase in TNF- α level in brain tissue. In the present study, we have found that hypoxia induces excessive production of TNF- α in intestinal mucosa. According to our immunohistochemical stainings, TNF- α levels in intestinal epithelial cells increased and this may cause a significant systemic inflammation (Table 2).

The mitochondrial apoptotic pathway is regulated by Bax and Bcl-2, which are the pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins (32). Therefore, Bcl-2 and Bax ratios determining whether a cell undergo programmed cell death are very important for many cell types in mammals. In their study, Aliparasti et al. (33) investigated the effects of chronic hypoxia on Bcl-2/Bax ratio in rat heart tissue. For this purpose, they expose rats to O₂ 11% for two weeks and investigate the changes in expression of Bcl-2 and Bax proteins by Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). As a one of their results, they suggested that chronic hypoxia negatively affected the mRNA expression of Bax protein but has no effect on the mRNA expression of Bcl-2 protein. In our study, we found that the Bax immunoreactivity significantly increased in intestinal epithelial cells in the hypoxia group while Bcl-2 immunoreactivity decreased according to our immunohistochemical staining (Table 2).

CLQ is widely used in treatment of *Plasmodium vivax malaria* as an anti-inflammatory agent. However, it is administered for treating some autoimmune defects such as rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus (34). It is promising

against the new SARS-CoV-2 coronavirus causing COVID-19 (35). In several studies with experimental animals, CLQ has been shown to have ameliorative effects against mucosal damage induced by various chemicals in the intestine (36). In addition, several studies have shown that CLQ inhibits oxidative stress and apoptosis in the intestinal tract after hepatic ischemia-reperfusion (37). Moreover, in many studies CLQ has been shown to suppress inflammation via the TLR pathway in inflammatory bowel disease (38). It is thought that this ameliorative effect of CLQ in the intestinal tract is due to its inhibitory effect on oxidative stress and apoptosis pathways due to its anti-inflammatory effect. In our study, we used CLQ to reduce negative effects of hypoxia on intestinal mucosa in rats. According to our histopathologic and immunohistochemical examinations, we found that CLQ significantly reduced the negative effects of hypoxia such as decreasing in height and width of intestinal villi and mucosal thickness in hypoxia+CLQ group when compared hypoxia group. Moreover, in hypoxia+CLQ group, a significant amelioration in terms of inflammation were determined by histopathological and immunohistochemical examinations; the number of inflammatory regions in intestinal mucosa disembarked and TNF- α immunoreactivity decreased significantly. CLQ inhibited apoptosis triggered by inflammatory cytokines such as TNF- α because it has an effect on Bcl-2/Bax ratio. In hypoxia group, Bax immunoreactivity significantly increased in intestinal epithelial cells while in hypoxia+CLQ group its immunoreactivity significantly decreased when compared to hypoxia group.

As a consequence, we suggested that the administration of CLQ after exposure to hypoxic conditions can reduce the negative effects of hypoxia on intestinal tract. By means of its anti-inflammatory feature, the devastating effects of overexpression of inflammatory cytokines overloading cell to apoptosis in the intestinal mucosa may be inhibited when it is used regularly and properly dosed administrations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Erciyes University Scientific Research Projects Commission with the Project code number TDK-2018-8099.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Erciyes University's Experimental Animal and Local Ethics' Committee (Date: 14.02.2018 and Number: 18/027).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Connett RJ, CR Honig, Gayeski T, Brooks GA. Defining hypoxia: a systems view of VO₂, glycolysis, energetics, and intracellular PO₂. *J Appl Physiol*, 1990;68(3):833-42.
2. Hiraga T. Hypoxic microenvironment and metastatic bone disease. *Int J Mol Sci*, 2018;19(11):3523.
3. Keuski BM. Updates in diving medicine: evidence published in 2017-2018. *Undersea Hyperb Med*, 2018;45:511-20.
4. Watts ER, Walmsley SR. Inflammation and Hypoxia: HIF and PHD isoform selectivity. *Trends Mol Med*, 2019;25(1):33-46.
5. Wu WM, Zhang FX. Research advances in plateau hypoxia and gut barrier injury. *World Chin J Dig*, 2009(14):1432-6.
6. Zhou QQ, Yang DZ, Luo YJ, Li SZ, Liu FY and Wang GS. Over-starvation aggravates intestinal injury and promotes bacterial and endotoxin translocation under high-altitude hypoxic environment. *World J Gastroenterol*, 2011;17(12):1584-93.
7. Hatoum OA, Binion DG, Otterson MF, Gutterman DD. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: Loss of nitric oxide-mediated vasodilation. *Gastroenterology*, 2003. 125(1):58-69.
8. Livak KJ, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001;25(4):402-8.
9. Feng J, Wang QS, Chiang A, Chen BY. The effects of sleep hypoxia on coagulant factors and hepatic inflammation in emphysematous rats. *PLOS one*, 2010;5(10):e13201.

10. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. a morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*, 1970;101(4):478-83.
11. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 2007;448(7152):427-34.
12. Wu QJ, Zhou YM, Wu YN, Zhang LL, Wang T. The effects of natural and modified clinoptilolite on intestinal barrier function and immune response to LPS in broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013;153(1-2):70-6.
13. Van Deventer SJ. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut*, 1997;40(4): p. 443-8.
14. Pritchard DM, Watson AJ. Apoptosis and gastrointestinal pharmacology. *Pharmacol Ther*, 1996;72(2):149-69.
15. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 1998;281(5381):1322-6.
16. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 1999;13(15):1899-911.
17. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*, 1992;80(4):879-86.
18. Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, et al. Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993;90(10):4533-37.
19. Lalloo DG, Shingadia D, Pasvol G, Chiodini PL, Whitty CJ, Beeching NJ, et al. UK malaria treatment guidelines. *J Infect*, 2007;54(2):111-21.
20. Zhai P, Ding Y, Wu X, Long J, Zhong Y, Li Y. The epidemiology, diagnosis and treatment of COVID-19. *Int J Antimicrob Agents*, 2020:105955.
21. Rainsford KD, Parke AL, Clifford-Rashotte M, Kean WF. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology*, 2015;23(5):231-69.
22. Lehmann GL, Carreras FI, Soria LR, Gradilone SA, Marinelli RA. LPS induces the TNF-alpha-mediated downregulation of rat liver aquaporin-8: role in sepsis-associated cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008;294(2): 567-75.
23. Yang M, Cao L, Xie M, Yu Y, Kang R, Yang L, et al. Chloroquine inhibits HMGB1 inflammatory signaling and protects mice from lethal sepsis. *Biochem Pharmacol*, 2013;86(3):410-8.
24. Kaymak E, Akin AT, Öztürk E, Ceylan T, Kuloğlu N, Karabulut D, et al. Chloroquine inhibits adriamycin-induced cardiotoxicity in rats by inhibiting endoplasmic reticulum stress and inflammation. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2020;77(4):459-66.
25. Farias JG, Puebla M, Acevedo A, Tapia PJ, Gutierrez E, Zepeda A, et al. Oxidative stress in rat testis and epididymis under intermittent hypobaric hypoxia: protective role of ascorbate supplementation. *J Androl*, 2010;31(3):314-21.
26. Wu J, Sun X, Wu Q, Li H, Li L, Feng J, et al. Disrupted intestinal structure in a rat model of intermittent hypoxia. *Mol Med Rep*, 2016;13(5):4407-13.
27. Guo Y, Tan J, Miao Y, Sun Z, Zhang Q. Effects of microvesicles on cell apoptosis under hypoxia. *Oxid Med Cell Longev*, 2019;2019:5972152.
28. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer*, 2014;14(11):709-21.
29. Pajovic SB, Saicic ZS. Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones. *Physiol Res*, 2008;57(6):801-11.
30. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 2003;552(2):335-44.

31. Kalpana S, Dhananjay S, Anju B, Lilly G, Sai Ram M. Cobalt chloride attenuates hypobaric hypoxia induced vascular leakage in rat brain: molecular mechanisms of action of cobalt chloride. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008;231(3):354-63.
32. Dai C, Li J, Tang S, Li J, Xiao X. Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014;58(7):4075-85.
33. Aliparasti MR, Alipour MR, Almasi S, Feizi H. Ghrelin administration increases the bax/bcl-2 gene expression ratio in the heart of chronic hypoxic rats. *Adv Pharm Bull*, 2015;5(2):195-9.
34. Wu K, Zhang Q, Wu X, Lu W, Tang H, Liang Z, et al. Chloroquine is a potent pulmonary vasodilator that attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol*, 2017;174(22):4155-72.
35. Devaux CA, Rolain JM, Colson P, Raoult D. New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: what to expect for COVID-19? *Int J Antimicrob Agents*, 2020:105938.
36. Liao S, Tang S, Tan B, Li J, Qi M, Cui Z, et al. Chloroquine improves deoxynivalenol-induced inflammatory response and intestinal mucosal damage in piglets. *Oxid Med Cell Longev*, 2020;2020:9834813.
37. Chen YP, Cao DQ, Chang YT, Li YG. Effect of chloroquine on the apoptosis of intestinal mucosa epithelial cells and enterogenous bacteria-endotoxin translocation after total hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2006;31(2):245-8.
38. Nagar J, Ranade S, Kamath V, Singh S, Karunanithi P, Subramani S, et al. Therapeutic potential of chloroquine in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol*, 2014;21(2):328-35.

Hiperglisemi RBL-1 hücrelerinde Ca^{2+} salınımı ile aktive olan Ca^{2+} akımlarını (I_{CRAC}) arttırır

Hyperglycemia increases Ca^{2+} realese activated Ca^{2+} current (I_{CRAC}) in RBL-1 cells

Yasin GÖKÇE¹ (ID), Taufiq RAHMAN² (ID), Nazmi YARAŞ³ (ID)

ÖZET

Amaç: Depo bağımlı Ca^{2+} girişi (SOCE) olarak farklı türde akımlar tanımlanmış olsa da bunlar arasında en iyi bilineni Ca^{2+} salınımı ile aktive olan Ca^{2+} akımlarıdır (I_{CRAC}). SOCE yolu çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyen hücre içi Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) sinyalleri oluşturmak için önemli bir yoldur. Anormal SOCE, özellikle alerji, diyabet, yangı ve kanseri içeren birçok çeşitli hastalık tipinin altında yatan önemli sebeplerden biri olarak görülmektedir. Bu çalışmada, hipergliseminin SOCE aktivitesi üzerine olan etkileri elektrofizyolojik yöntemlerle incelenmiştir.

Yöntem: Bu çalışmada, sıçan bazofilik lösemi-1 (RBL-1) hücreleri yüksek glikoz (YG, 50mM) ve normal glikoz (5.5mM) derişimine sahip DMEM solüsyonları kullanılarak çoğaltılmıştır. RBL-1 hücreleri yeterli sayıya ulaşmasının ardından 72 saat süreyle yüksek glikoz ortamına maruz bırakılmıştır. Bu süreyi takiben hücrelerden Fura-2 tabanlı Ca^{2+} görüntüleme tekniği ile SOCE aktivitesi ve voltaj kenetleme yöntemiyle I_{CRAC} akımları ölçülmüştür.

Bulgular: I_{CRAC} akım ölçümleri patch-clamp ve Fura-2 tabanlı Ca^{2+} görüntüleme yöntemleriyle

ABSTRACT

Objective: Although different types of currents have been defined as store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), the best characterized of these is Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} currents (I_{CRAC}). The SOCE pathway is an important way to generate cytosolic Ca^{2+} signals that regulate various biological processes. Abnormal SOCE appears to be one of the underlying causes of several diseases, particularly allergies, diabetes, inflammation, and cancer. In this study, the effects of hyperglycemia on SOCE activity were investigated by electrophysiological methods.

Methods: In this study, rat basophilic leukemia-1 (RBL-1) cells were grown using DMEM solutions with high glucose (HG, 50mM) and normal glucose (5.5mM) concentrations. Following 72 h incubation period, SOCE activity was measured by Fura-2 based Ca^{2+} imaging technique and ICRAC currents recorded by voltage clamp method.

Results: I_{CRAC} current measurements were performed by the patch-clamp method and Fura-2 based Ca^{2+}

¹Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa
²Cambridge Üniversitesi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Cambridge, İngiltere
³Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı, Antalya



İletişim / Corresponding Author : Yasin GÖKÇE
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Bölümü, Şanlıurfa - Türkiye
E-posta / E-mail : ygokce58@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 22.12.2020
Kabul Tarihi / Accepted : 29.03.2021

gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol deneyler için PYR6 (SOCE blokörü) kullanılarak akımların SOCE yolağı üzerinden olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca hipergliseminin RBL-1 hücrelerinde SOCE aktivitesini kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı iki farklı yöntemle tespit edilmiştir.

Sonuç: Bulgularımız diyabetik patolojilerde karşılaşılan Ca^{2+} homeostazındaki ve ER/SR depolarının Ca^{2+} içeriğindeki bozulmalarda SOCE yolağı ile ilgili proteinlerin önemli bir rolü olabileceğini ortaya koymaktadır. Hücre düzeyinde elde edilen bu bulgular sınırlı olsa da ileride geliştirilecek olan çalışmalara büyük katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: SOCE, RBL-1 hücreler, patch-clamp, hiperglisemi

imaging methods. For positive control experiments, using the PYR6 (SOCE blocker), it was confirmed that the currents were through the SOCE pathway. In addition, it was determined by two different methods that hyperglycemia significantly increased SOCE activity in RBL-1 cells compared to control values.

Conclusion: Our findings reveal that the SOCE pathway may have an important role in the disturbances in Ca^{2+} homeostasis and Ca^{2+} content of ER/SR stores encountered in diabetic pathologies. Although these findings at the cellular level are limited, it is thought that they will make great contributions to future studies.

Key Words: SOCE, RBL-1 cells, patch-clamp, hyperglycemia

GİRİŞ

Döllenmeden hücre ölümüne kadar hücrenel yaşamın neredeyse her yönünü düzenleyen Ca^{2+} , evrensel ve çok yönlü bir hücre içi habercidir. Ca^{2+} sinyallerinin üretilmesi, hücre içi serbest Ca^{2+} konsantrasyonu dinlenim durumundaki düşük (≤ 500 nM) değerinden yaklaşık $\sim 1\mu M$ seviyesine kadar geçici artışı ile gerçekleşir (1). Hücrelerin bunu gerçekleştirebilmeleri hücre içi depolardan endoplazmik retikulum (ER), uyarıcı-bağımlı Ca^{2+} salınımına ve ayrıca hücre dışında plazma membranı (PM) üzerine yerleşmiş ligand- veya voltaj-bağımlı Ca^{2+} geçirgen iyon kanallarından Ca^{2+} girişine bağlıdır. Bununla birlikte, birçok hücre için, Ca^{2+} 'yi sinyallerinin ana kaynağı, farklı ve benzersiz bir Ca^{2+} giriş mekanizması olan depo bağımlı Ca^{2+} girişi (SOCE) ile gerçekleşir. SOCE, hücre içi Ca^{2+} depolarının hızlı boşaltılması neticesinden PM üzerinde bulunan Orai1 kanalı (Ca^{2+} salınımı ile aktive olan Ca^{2+}

kanalı), üzerinden devamlı- Ca^{2+} akımı (I_{CRAC}) şeklinde gerçekleşir. Orai1 kanalı, ER membranında eksprese edilen ve ER lümeni içindeki Ca^{2+} düşüşünü etkili bir şekilde “algılayan” stromal etkileşim molekülü-1 (STIM1) proteinlerinin bu kanalla olan fiziksel teması neticesinde aktive olur ve hücre içine Ca^{2+} girişini tetikleyerek Ca^{2+} homeostazında önemli görev alır. SOCE kavramı, yaklaşık otuz yıl önce James Putney tarafından, hücre içi Ca^{2+} depolarının boşalmasının her zaman plazma membranı boyunca Ca^{2+} akışının artmasına yol açtığı gözlemini açıklayabilmek adına formüle edilmiştir. SOCE'nin oluşması için gereken tek şey hücre içi Ca^{2+} depolarının boşalmasıdır, bu duruma endojen hücrenel sinyal yolları veya farmakolojik reaktifler neden olmaktadır. SOCE ilk olarak mast hücrelerinde tanımlanmasına ve çoğunlukla bu ve diğer uyarılmayan hücrelerde çalışmasına rağmen, bu tür Ca^{2+} giriş yolağının uyarılabilir hücreler de dahil olmak üzere her tür hücrede var olduğuna dair kanıtlar yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir (2-5).

SOCE'nin geleneksel olarak azalmış hücre içi Ca^{2+} depolarını doldurmak için ana yolak olarak görev aldığı iyi bilinmektedir. Bu kadar önemli görevlerinin yanında, SOCE'nin ekzositoz, mitokondriyal metabolizma, gen ekspresyonu, hücre büyümesi ve çoğalması gibi bazı daha spesifik biyolojik süreçleri düzenlemek için uzaysal-zamansal olarak karmaşık Ca^{2+} sinyalleri de sağlayabileceğine dair kanıtlar ortaya çıkmaya devam etmektedir (6). Son yıllarda, anormal Orai1 kanal aktivitesi, şiddetli kombine immün yetmezlik bozuklukları, diyabet, alerji, tromboz, akut pankreatit, enflamatuvar bağırsak hastalığı, romatoid artrit ve kanser dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarında gösterilmiştir (7, 8).

Tip 2 diyabetin (T2D) önemli nedensel faktörleri hem kronik hiperglisemi hem de hiperlipidemi olduğu bilinmektedir. Ayrıca T2D ve ER stres arasındaki ilişki birçok çalışmada gösterilmiştir (9). ER stres ise genel olarak ER Ca^{2+} seviyesi düşüklüğü ile karakterize bir durumdur (10). Tüm bu bulgular SOCE kanallarının bu süreçte oldukça önemli bir etkinliğe sahip olması gerekliliğini düşündürmektedir. Ayrıca, son zamanlarda yapılan bir çalışmada, ER stresinin SOCE etkinliğinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (11).

SOCE Ca^{2+} sinyallerinin yukarıda bahsedilen bazı özel hücresel işlemlerin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı göz önüne alındığında, bu yolağın herhangi bir modülatörünün normal ve patolojik koşullar altında hücre biyolojisi üzerinde önemli etkilere sahip olması muhtemeldir.

Bu çalışmada, normal glikoz (NG, 5.5mM) ve yüksek glikoz (YG, 50mM) ortamında çoğaltılan RBL-1 hücrelerinde SOCE ölçümleri voltaj kenetleme yöntemi ve Fura-2 tabanlı Ca^{2+} görüntüleme tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre Kültürü

RBL-1 hücreleri %10 (v/v) fetal sığır serumu, 2mM L-glutamin ve %1 (v/v) antibiyotik/antimikotik ile

desteklenen F-12 besin karışımı ile NG (5.5mM) ve YG (50mM) DMEM solüsyonu kullanılarak 37 °C'de, %5 CO_2 ve %95 hava ile nemlendirilmiş ortamda kültüre edilmiştir. Hücreler 75 cm^2 'lik flaskta tutulmuş ve ~%80 çoğalmaya ulaştıktan sonra haftada en az bir kez pasajlanmıştır. Hücreler pasaj yapılmadan önce DMEM ve tripsin 37 °C'ye önceden ısıtılmıştır. Flasktaki hücre ortamı aspire edilmiş ve hücreler, 2-3 ml tripsin ilave edilerek flasktan ayrılması sağlanmıştır. Yaklaşık 2-3 dakika sonra, yapışan hücrelerin tamamen ayrılmasına sağlamak için flask yavaşça çalkalanmış ve ardından 8-10 ml DMEM ilave edilerek tripsin nötralize edilmiştir. Hücre süspansiyonu daha sonra birkaç kez nazikçe pipetlenmiş, 1000 rpm'de 5 dakika santrifürlenerek süpernatantlar atılmış ve pelletler DMEM (1ml) içinde yeniden süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, hücrelerden akım kayıtları ve Ca^{2+} sinyal kaydı için plastik ve cam tabanlı petrilere (10 mm) ekilmek suretiyle ilgili deneyler için kullanılmıştır.

Hücre içi Ca^{2+} Ölçümü

SRBL-1 hücreleri 10 mm'lik cam tabanlı petrilere ekilmiştir. Fura-2 asetoksümetil ester (Fura2-AM), 2 mM'lik bir stok konsantrasyonu hazırlamak için DMSO içerisinde %20 Pluronic® F-127 çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür. Boya daha sonra Hank dengeli tuz çözeltisi (HBSS) tamponunu içeren Ca^{2+} (1.25mM) içinde 3 μ M çalışma konsantrasyonuna seyreltilmiştir. Hücreler, önceden ısıtılmış HBSS tamponu kullanılarak birkaç kez iyice yıkanmış ve pH 7.4'te tutuldu. Daha sonra hücreler, karanlık bir odaya alınarak 40 dakika süreyle Fura-2 ile yüklenmeleri sağlanmıştır. Hücreler daha sonra boyayı ortamdaki çıkarmak için taze ve önceden ısıtılmış Ca^{2+} içeren tamponda yıkanmış ve hücreler içindeki tüm boyanın de-esterleşmesini sağlamak için 30 dk süreyle taze takviye edilmiş HBSS tamponuna aktarılmıştır. Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. De-esterifikasyon aşamasından sonra hücreler Ca^{2+} içermeyen tampon ile yıkanmış ve mikroskopta ilk olarak Ca^{2+} içermeyen durumda görüntüleme başlatılmıştır. Başlangıç

flüoresansı ilk olarak >50s süreyle kaydedilmiş, ardından 2 μ M thapsigargin (Tg) eklenmiştir. ~10dk sonra, hücre dışı (banyo) solüsyonuna Ca^{2+} (2 mM) eklenmiş ve ~10dk sonra, banyo solüsyonuna 10 μ M iyonominin ve 1 mM $MnCl_2$ eklenmiştir. Pozitif kontrol (Pyr6) için hücreler, Ca^{2+} görüntülemenin başlamasından önce 15 dakika boyunca istenen bileşik konsantrasyonu ile inkübe edilmiştir.

Floresan görüntüler, QImaging QIClick dijital CCD kamera ile monte edilmiş Nikon Eclipse Ti-S Mikroskop ve 10X (NA 0.25) hava hedefi kullanılarak yakalanmıştır. Uyarma, hem 355 nm hem de 380 nm dalga boylu LED'ler arasında değişen bir Çift OptoLED Güç Kaynağı (Cairn, İngiltere) ile sağlanmıştır. Fura-2 sinyalinin emisyon floresansı 510 nm'de (470 nm - 550 nm) toplanmıştır. MetaFluor® (Molecular Devices, ABD) Floresan Oranı Görüntüleme Yazılımı ile her 5 saniyede bir 12 bitlik görüntüler elde edilmiştir. Her bir zaman noktasındaki floresan, hem 355 nm hem de 380 nm dalga boyları için elde edilmiş, oto-floresans için düzeltilmiş ve 355 nm/380 nm oranları hesaplanmıştır.

Elektrofizyoloji

RBL-1 hücrelerinde CRAC akımları oda sıcaklığında (22-25 °C) tüm-hücre konfigürasyonu kullanılarak kaydedilmiştir. Yama (patch) pipetleri borosilikat cam kapilerlerden (World Precision Instruments, Hitchin, UK) çekilmiştir. Pipet solüsyonu (mM cinsinden): sezyum glutamat 145, NaCl 8, $MgCl_2$ 1, MgATP 2, EGTA 10, HEPES 10, pH 7,2 CsOH ile pipetler doldurulduğunda 2.5-4 M Ω dirençlere sahipti. Hücre dışı (banyo) solüsyonu ise (mM cinsinden): NaCl 145, KCl 2,8, $CaCl_2$ 10, $MgCl_2$, CsCl 10, glikoz 10, HEPES 10, pH NaOH ile 7,4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Tüm voltajlar hücre içi ve dışı arasındaki +10 mV'luk sıvı bağlantı potansiyeli için düzeltilmiştir. I_{CRAC} , her 4s'de bir uygulanan step protokolleri (150 ms süreyle 0 - -80 mV) kullanılarak ölçülmüştür. PCLAMP 10 yazılımı ile Axopatch 200B ve Digidata 1440A (Moleküler Cihazlar) veri toplama ve analiz için kullanılmıştır. Veriler 10 kHz'de sayısallaştırılmış ve 1 kHz'de filtrelenmiştir. Hücreler, pulslar arasında 0

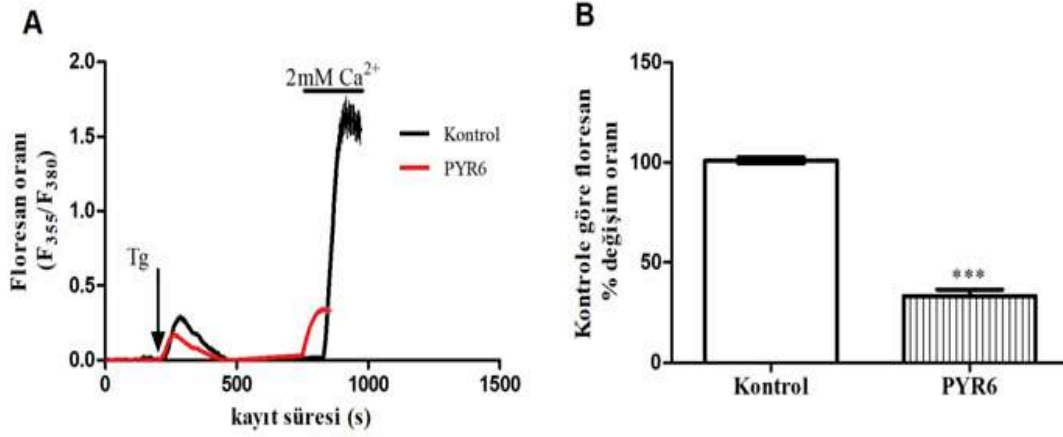
mV'da tutulmuştur. Kapasitif akımlar, her voltaj ramp protokolü öncesi kompanse edilmiştir. Sızıntı akımları tüm-hücre modu sonrası ilk 2-3 kayıt diğer tümünden çıkarılmak kaydıyla elemine edilmiştir. Akım genişliği hücre boyutuna göre normalize edilerek pA/pF olarak gösterilmiştir. Hücreler, kayıttan önce ~ 15dk süreyle PYR6 (3 μ M) ile inkübe edilmiştir.

BULGULAR

SOCE çalışmalarında yaygın olarak kullanılan RBL-1 hücrelerinde Fura-2 bazlı Ca^{2+} görüntüleme tekniği (12, 13) kullanılarak hipergliseminin SOCE üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu hücreler ilk önce banyo solüsyonu Ca^{2+} içermeyen ortamda, sarko-endoplazmik Ca^{2+} -ATPaz'ı (SERCA) inhibe ederek hücre içi Ca^{2+} deposunu pasif olarak boşaltan thapsigargin (Tg) ile muamele edilmiştir. Daha sonra, hücrelerde SOCE ölçümü için banyo solüsyonunda Ca^{2+} konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde Ca^{2+} uygulaması yapılmıştır. Öncelikli olarak SOCE ölçümlerinin doğrulanması için RBL-1 hücreleri 15dk süre ile PYR6 (SOCE blokörü) ile inkübe edilerek Fura-2 tabanlı Ca^{2+} sinyal ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 1'den görüldüğü gibi SOCE blokörü olarak uygulanan PYR6, SOCE aktivitesini kontrol değerlerine göre yaklaşık ~ %60 oranında azaltmıştır.

Daha sonra YG ortamında çoğaltılan RBL-1 hücrelerinde SOCE değişimlerini değerlendirmek üzere Fura-2 tabanlı Ca^{2+} sinyal ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 2'den görüldüğü gibi 72 saat süre ile YG ortamının çoğaltılan RBL hücrelerinde SOCE değerlerinin anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir.

Ca^{2+} görüntüleme deneylerinden elde edilen bulguları desteklemek için, RBL-1 hücrelerinden SOCE akım (I_{CRAC}) ölçümleri voltaj kenetleme yöntemi kullanılarak tüm-hücre modunda gerçekleştirilmiştir. Şekil 3'den görüldüğü gibi I_{CRAC} akımları YG ortamında kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (I_{CRAC} : Kontrol: -2,024pA/pF, YG: -3,194pA/pF, $p < 0,001$).

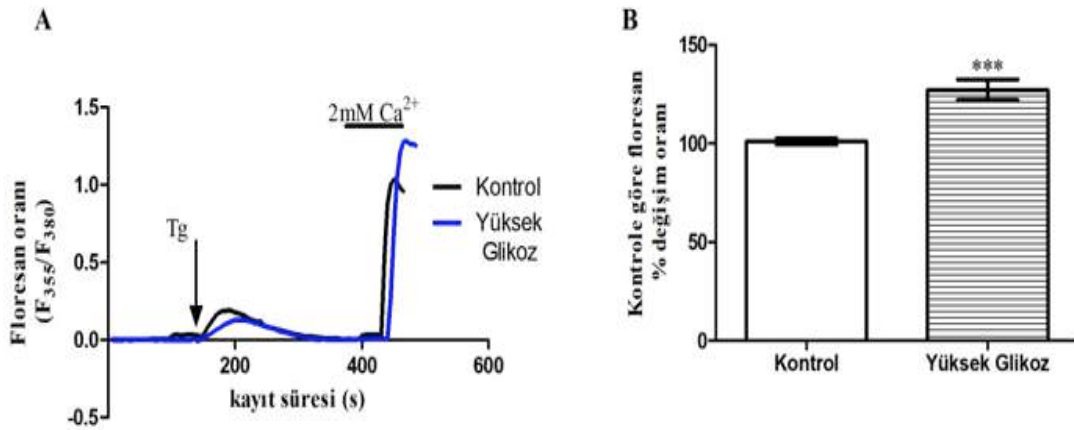


Şekil 1. A) RBL-1 hücrelerine 2 μ M (Tg) eklenerek tetiklenen Ca²⁺ sinyallerini (Fura-2 floresan oranı) temsil eden iki grup için örnek traseler.

B) Tg ile tetiklenen SOCE tepe değerlerini gösteren histogram grafiği.

Her bir değer (ortalama \pm SEM) 3-5 ayrı deneylerden ve toplam 30-60 hücreden elde edilmiştir.

Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma student t-test ile hesaplanmıştır (***; p<0,001).

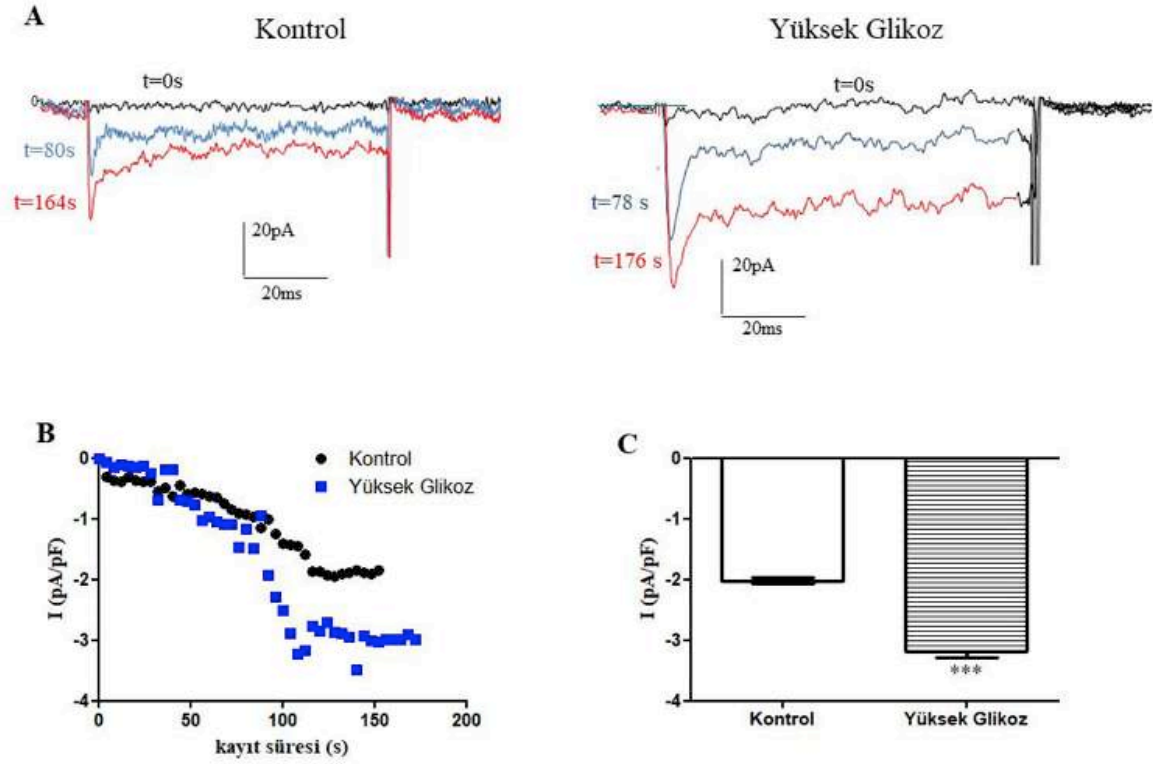


Şekil 2. A) RBL-1 hücrelerine 2 μ M (Tg) eklenerek tetiklenen Ca²⁺ sinyallerini (Fura-2 floresan oranı) temsil eden kontrol ve yüksek glikoz grupları için örnek traseler.

B) Tg ile tetiklenen SOCE tepe değerlerini gösteren histogram grafiği.

Her bir değer (ortalama \pm SEM) 3-5 ayrı deneylerden ve toplam 30-60 hücreden elde edilmiştir.

Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma student t-test ile hesaplanmıştır (***; p<0,001).



Şekil 3. A) RBL-1 hücrelerine ait I_{CRAC} akımlarını gösteren örnek traseler (kontrol ve yüksek glukoz grupları). B) Her bir grup için en az 5-hücreden elde edilen I_{CRAC} akımlarının -80mV değerlerinin zamana göre değişim grafikleri. C) Bar grafiği (ortalama \pm S.E.M) akım yoğunluklarının tepe değerlerini göstermiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma student t-test ile hesaplanmıştır (***, $p < 0,001$).

TARTIŞMA ve SONUÇ

RBL-1 hücreleri, bağımsızlık ve nöroimmün sistemlerin bir parçası olan mast hücrelere olan fonksiyonel benzerlikleri, genetik olarak manipüle edilebilmeleri ve kolayca çoğaltılabilmeleri açısından yaygın şekilde kullanılmaktadır ayrıca SOCE proteinleri bu hücrelerde ekspres edilmektedir (14). Bu anlamda, RBL-1 hücrelerde

hipergliseminin SOCE yolağını nasıl etkilediğinin gösterilmesinin literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmüştür.

Hücre içi Ca^{2+} 'in sürekli birikimi hücrelerde Ca^{2+} aşırı yüklenmesine neden olacağı, bu da enerji üretiminin bozulmasına ve diyabet gibi patolojik durumlarda oksidatif stresin daha da artmasına neden olacağı iyi bilinmektedir. Ca^{2+} 'yi regülasyonu hücre fonksiyonlarının ve büyümenin düzenlenmesi

için çok önemlidir (15). SOCE, hücre içi Ca^{2+} depolarının boşalmasına bağlı olarak tetiklenen hücrel Ca^{2+} girişi için benzersiz bir mekanizma olarak kabul edilmekte ve çok sayıda biyolojik sürece katılmaktadır (16). Plazma membranı üzerindeki G proteinine bağlı reseptörlerin aktivasyonu sonucunda ER/SR Ca^{2+} depolarının boşalması fosfolipazC/IP3 yolağı üzerinden sinyal olaylarının bir parçası olarak fizyolojik nedenlerle meydana gelmektedir (17). ER/SR Ca^{2+} salınımı, Stim1 proteinin Orai1 ve TRPC ile etkileşimine neden olarak hücrel fonksiyonlar için gerekli olan Ca^{2+} 'un hücre içine girişini tetiklemektedir (14). Bu yolak üzerinde sorumlu proteinlerdeki (Orai1 veya Stim1) kayıplar immün hücrelerde bağışıklık fonksiyonunun bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir (18). Doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık cevaplarını etkileyen bir başka mekanizma olan ER stresi ve kronik ER stresi, hastalık patogenezi ve ilerlemesinde yer alan anormal fizyolojik süreçlere katkıda bulunmaktadır (19, 20). Ayrıca, kronik ER stresine bağlı anormal immün aktivasyonu, diyabet, ateroskleroz, miyosit ve enflamatuar bağırsak hastalığı gibi otoimmün ve enflamatuar bozukluklarla yakından ilişkilidir (21). Yine son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, ER stresinin diyabetik kardiyomiyopati gelişiminde önemli rol aldığı gösterilmiştir (22, 23). Uzun süreli hiperglisemi, Ca^{2+} aşırı yüklenmesine neden olarak hücrelerde ER/SR Ca^{2+} dengesini bozduğu gösterilmiştir (9).

Çalışmamızda, hipergliseminin I_{CRAC} akımlarını kontrol değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca pozitif kontrol deneyleri CRAC kanal blokörü olarak sıklıkla kullanılan PYR6 ile gerçekleştirilmiş ve ~%60 düzeyinde inhibisyon gözlenmiştir. Bu çalışmada, elde edilen sonuçları destekler nitelikte, mezangiyal hücreler ve trombositlerde hipergliseminin SOCE aktivitesini arttırdığı gösteren çalışmalar mevcuttur (10, 24). Bununla birlikte,

diğer bazı çalışmalarda, hiperglisemide artan glikasyon son ürününün, mezangiyal hücrelerde ve neonatal kardiyomiyositlerde SOCE'yi baskıladığı gösterilmiştir (25-27). SOCE etkinliğindeki bu azalmanın SOCE proteinleri (Stim/Orai) arasındaki etkileşimlerin bozulmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca Stim/Orai eksenini üzerinden gerçekleşen SOCE dışında etkili olabilecek diğer depo-bağımlı kanalların (TRP kanallar gibi) özellikle patolojik durumlarda nasıl etkilendiğinin belirlenmesi SOCE etkinliğinin aydınlatılmasında önemli katkılar sağlayacaktır. SOCE sadece Stim/Orai eksenini üzerinden değil ayrıca Stim/Orai/TRPC'ler ve TRP kanalları üzerinden aktive olabilmektedir. Dahası, Stim ve Orai izoformlarının patolojik durumlarda aktivasyonlarında meydana gelebilecek değişiklikler yeni bir eksenin (Stim2/Orai1, Stim2/Orai2 gibi) oluşmasına neden olarak SOCE etkinliğinin bozulmasına sebebiyet verebilir. Bu anlamda diyabet gibi patofizyolojik durumlarda SOCE rolünün tam olarak anlaşılabilmesi için bu yolak üzerinde görev alan tüm proteinlerin ekspresyon seviyeleri ve buna bağlı olarak proteinler arası etkileşimlerin aydınlatılması gerekmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, hiperglisemi durumunda Ca^{2+} homeostazındaki bozulmalarla SOCE yolağı arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir. Bu anlamda, diyabetik bozukluklarda SOCE mekanizması üzerine yapılacak çalışmalar ve geliştirilecek yeni tedavi yöntemlerinin bu hastalığın ilerlemesinin durdurulmasında büyük kazanımlar sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışmada YG ortamında çoğaltılan RBL-1 hücrelerinde SOCE aktivitesi Fura-2 tabanlı Ca^{2+} görüntüleme tekniği ile ve I_{CRAC} akımları voltaj kenetleme tekniği ile incelenmiştir. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlara göre SOCE aktivitesinin kontrol değerlerine göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Bulgularımız diyabetik

patojilerde karşılaşılan Ca²⁺ homeostazındaki ve ER/SR Ca²⁺ içeriğindeki bozulmalara SOCE yolağındaki ilgili proteinlerin (Stim1, Orai1 ve TRPC) aracılık ettiği akımlarında gözlenen değişimlerin neden olabileceği yönünde literatüre önemli katkılar sağlamıştır. Bu çalışmada, RBL-1 hücreleri üzerinden

elde edilen bulguların kardiyomyosit, mezengial hücreler gibi diğer hücre türlerinde de gösterilmesi hipergliseminin SOCE üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılmasına ve yeni tedavi metotlarının geliştirmesine olanak sağlayacaktır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma Etik Kurul İzni gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000; 1(1): 11-21.
2. Amcheslavsky A, Yeromin AV, Penna A, Cahalan MD. Store-operated calcium channels. *Encycl Biol Chem Second Ed*, 2013; (307): 314-20.
3. Parekh AB, Putney JW. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 2005; 85(2): 757-810.
4. Hunton DL, Zou L, Pang Y, Marchase RB, Dacia L, Zou L, et al. Adult rat cardiomyocytes exhibit capacitative calcium entry. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004; 0005: 1124-32.
5. Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol*, 2002; 4(11): E263-72.
6. Parekh AB. Store-operated CRAC channels: function in health and disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2010; 9(5): 399-410.
7. Tian C, Du L, Zhou Y, Li M. Store-operated CRAC channel inhibitors: opportunities and challenges. *Future Med Chem*, 2016; 8(7): 817-32.
8. Wang J, Fu J, Li J, Wang Y, Tang L, Bai S, et al. Enhanced store-operated Ca²⁺ entry in high glucose-cultured neonatal and adult diabetic rat cardiomyocytes. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017; 10(2): 877-89.
9. Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem*, 2012; (81): 767-93.
10. Chaudhari S, Wu P, Wang Y, Ding Y, Yuan J, Begg M, et al. High glucose and diabetes enhanced store-operated Ca²⁺ entry and increased expression of its signaling proteins in mesangial cells. *Am J Physiol Physiol*, 2014; 306(9): F1069-80.
11. Zhang IX, Ren J, Vadrevu S, Raghavan M, Satin LS. ER stress increases store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) and augments basal insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, 2020; 295(17): 5685-70.
12. Bird GS, DeHaven WI, Smyth JT, Putney JW. Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods*, 2008; 46(3): 204-12.
13. Hendron E, Wang X, Zhou Y, Cai X, Goto JI, Mikoshiba K, et al. Potent functional uncoupling between STIM1 and Orai1 by dimeric 2-aminodiphenyl borinate analogs. *Cell Calcium*, 2014; 56(6): 482-92.
14. Putney JW, Steinckwich-Besançon N, Numaga-Tomita T, Davis FM, Desai PN, D'Agostin DM, et al. The functions of store-operated calcium channels. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017; 1864(6): 900-06.
15. Battiprolu PK, Gillette TG, Wang ZV, Lavandero S, Hill JA. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discov Today Dis Mech*, 2010; 7(2): 135-43.
16. Putney JW. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 1986; 7(1): 1-12.
17. Várnai P, Hunyady L, Balla T. STIM and orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci*, 2009; 30(3): 118-28.
18. Shaw PJ, Feske S. Regulation of lymphocyte function by ORAI and STIM proteins in infection and autoimmunity. *J Physiol*, 2012; 590(17): 4157-67.
19. Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Ito H, Koide N, Mori I, et al. Lipopolysaccharide prevents apoptosis induced by brefeldin A, an endoplasmic reticulum stress agent, in RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 340(2): 589-96.
20. Kim SY, Hwang JS, Han IO. Tunicamycin inhibits Toll-like receptor-activated inflammation in RAW264.7 cells by suppression of NF- κ B and c-Jun activity via a mechanism that is independent of ER-stress and N-glycosylation. *Eur J Pharmacol*, 2013; 721(1-3): 294-300.

21. Arruda AP, Hotamisligil GS. Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. *Cell Metab*, 2015; 22(3): 381-97.
22. Li Z, Zhang T, Dai H, Liu G, Wang H, Sun Y, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in myocardial apoptosis of streptozocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol*, 2008; 196(3):565-72.
23. Li Z, Zhang T, Dai H, Liu G, Wang H, Sun Y, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in myocardial apoptosis of streptozocin-induced diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr*, 2007; 41(1): 58-67.
24. Xia W, Li Y, Wang B, Chen J, Wang X, Sun Q, et al. Enhanced Store-Operated Calcium Entry in Platelets is Associated with Peripheral Artery Disease in Type 2 Diabetes. *Cell Physiol Biochem*, 2015; 37(5): 1945-55.
25. Menè P, Pugliese G, Pricci F, Di Mario U, Cinotti GA, Pugliese F. High glucose level inhibits capacitative Ca^{2+} influx in cultured rat mesangial cells by a protein kinase C-dependent mechanism. *Diabetologia*, 1997; 40(5): 521-27.
26. Menè P, Pascale C, Teti A, Bernardini S, Cinotti GA, Pugliese F. Effects of advanced glycation end products on cytosolic Ca^{2+} signaling of cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, 1999; 10(7): 1478-86.
27. Pang Y, Hunton DL, Bounelis P, Marchase RB. Hyperglycemia inhibits capacitative calcium entry and hypertrophy in neonatal cardiomyocytes. *Diabetes*, 2002; 51(12): 3461-67.

Vitamin B12 alleviates methotrexate-induced lung injury in rat: A histopathological, immunohistochemical and biochemical study

B12 vitamini sıçanlarda metotreksatın neden olduğu akciğer hasarını azaltır: Histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal bir çalışma

Emin KAYMAK¹ (ID), Derya KARABULUT² (ID), Emel ÖZTÜRK³ (ID), Ali Tuğrul AKIN⁴ (ID),
Nurhan KULOĞLU² (ID), Birkan YAKAN² (ID)

ABSTRACT

Objective: Methotrexate (MTX) is an important chemotherapeutic and an important anticarcinogen used in cancer patients, but it causes side effects in other tissues. Among these side effects is lung toxicity. Vitamin B12 is a powerful antioxidant and reduces reactive oxygen species. This study was designed to determine whether vitamin B12 could protect against methotrexate-induced damage in rat lungs.

Methods: A total of 32 male Wistar albino rats were divided into four groups: The control group (n=8) received intraperitoneal (i.p.) saline throughout the experiment. Vitamin B12 group (B12) (n=8) 3 µg/kg/i.p. Vitamin B12 was administered for 14 days. The methotrexate (MTX) group received a single dose MTX injection at 20 mg/kg/i.p. on the 8th day of the experiment. On the 8th day of the experiment, a single dose of MTX 20 mg/kg/i.p. was given to the MTX+B12 group. + 3 µg/kg/i.p. Vitamin B12 was administered daily throughout the experiment. Histopathological, immunohistochemical, and biochemical methods were

ÖZET

Amaç: Metotreksat (MTX) önemli bir kemoterapötik olup kanser hastalarında kullanılan önemli bir antikanserojen olmakla birlikte diğer dokularda yan etkilere yol açmaktadır. Bu yan etkiler arasında akciğer toksisitesi de yer almaktadır. B12 Vitamini güçlü bir antioksidandır ve reaktif oksijen türlerinin azalmasını sağlar. Bu çalışma, B12 vitamininin sıçan akciğerinde metotreksat kaynaklı hasara karşı koruma sağlayıp sağlayamayacağını belirlemek için tasarlanmıştır.

Yöntem: Toplam 32 erkek Wistar albino sıçanı dört gruba ayrılmıştır: Kontrol grubuna (n=8) deney boyunca intraperitoneal (i.p.) salin uygulanmıştır. B12 vitamini (B12) grubuna (n=8) 3 µg/kg/i.p. 14 gün boyunca B12 vitamini verilmiştir. Metotreksat (MTX) grubuna 20 mg/kg/i.p. tek doz (MTX) enjeksiyonu deneyin sekizinci gününde yapılmıştır. MTX+B12 grubuna deneyin sekizinci gününde MTX tek doz 20 mg/kg/ i.p. + 3 µg/kg/i.p. B12 vitamini günlük deney boyunca uygulandı. Elde edilen akciğer dokularına histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemler uygulanmıştır. Akciğer dokuları Masson's Trikrom (MT) ile boyanmıştır. Ayrıca α-Sma,

¹Yozgat Bozok University, Faculty of Medicine, Histology-Embriology Department, Yozgat

²Erciyes University, Faculty of Medicine, Histology-Embriology Department, Kayseri

³Harran University, Faculty of Medicine, Histology-Embriology Department, Şanlıurfa

⁴Erciyes University, Faculty of Science, Biology Department, Kayseri



İletişim / Corresponding Author : Emin KAYMAK

Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-embriyoloji AD, Yozgat - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 28.06.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 28.07.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.00947

Kaymak E, Karabulut D, Öztürk E, Akın AT, Kuloğlu N, Yakan B. Vitamin B12 alleviates methotrexate-induced lung injury in rat: A histopathological, immunohistochemical and biochemical study. Turk Hij Den Biol Derg, 2022; 79(1): 81 - 92

applied to the obtained lung tissues. Lung tissues were stained with Masson's Trichrome (MT). In addition, α -Sma, Laminin, PCNA, and TNF- α antibodies were stained by immunohistochemistry. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA) levels were evaluated in lung tissue homogenates.

Results: MTX caused an increase in MDA and IL-6 levels and expression of α -Sma, Laminin, and TNF- α , and the number of apoptotic cells in lung tissue. It also caused a decrease in PCNA expression and SOD and CAT levels in the MTX group. Vitamin B12 inhibited the increase in MDA and IL-6 levels and the expression of α -Sma, Laminin, and TNF- α . Vitamin B12 was found to increase antioxidant capacity.

Conclusion: Vitamin B12 has been shown to be effective on factors such as oxidative stress, inflammation, fibrosis, and apoptosis in MTX-induced lung toxicity and reduce damage. We observed that MTX stimulated lung injury decreased with vitamin B12 treatment. It suggests that vitamin B12 should not be ignored in reducing side effects in cancer drug use.

Key Words: Methotrexate, vitamin B12, fibrosis, antioxidant capacity

Laminin, PCNA ve TNF- α antikorları immünohistokimya ile boyandı. Akciğer doku homojenatlarında ise süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve malondialdehit (MDA) seviyeleri değerlendirilmiştir.

Bulgular: Metotreksat, MDA ve IL-6 seviyelerinde ve α -Sma, Laminin ve TNF- α ekspresyonunda ve akciğer dokusunda apoptotik hücre sayısında artışa neden olmuştur. Ayrıca MTX grubunda PCNA ekspresyonu ve SOD ve CAT seviyelerinde azalma görülmüştür. B12 vitamini, MDA ve IL-6 düzeylerindeki artışı ve α -Sma, Laminin ve TNF- α ekspresyonunu engellemiştir. B12 vitamininin antioksidan kapasiteyi artırdığı tespit edilmiştir.

Sonuç: B12 vitamininin metotreksat kaynaklı akciğer toksitesinde oksidatif stress, inflamasyon, fibrosis ve apoptosis gibi faktörler üzerinde etkili olduğu ve hasarı azalttığı görülmüştür. Bu çalışma, metotreksatın neden olduğu akciğer hasarı için B12 vitamini kullanımının faydalı olacağını göstermiştir. Kanser ilacı kullanımında yan etkileri azaltmada B12 vitamininin göz ardı edilmemesi gerektiğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, vitamin B12, fibrosis, antioksidan kapasite

INTRODUCTION

Methotrexate (MTX) is a folic acid analog chemotherapeutic commonly used in many cancer diseases. MTX can inhibit the synthesis of DNA, RNA, and proteins (1). Although it is used in many cancer treatments, it also has side effects in many tissues. These side effects include nephrotoxicity, hepatotoxicity, bone marrow toxicity, and lung toxicity induced by MTX (2-4). It has been shown in studies that MTX will cause significant pulmonary toxicity (4, 5). One of the mechanisms by which MTX causes lung damage is inducing oxidative stress in lung epithelial cells (6).

It has been reported that MTX causes injury to the alveolar epithelium, apoptosis, and fibrosis in the lung (7). MTX stimulates oxidative stress, leading to increased reactive oxygen species and later cellular apoptosis (8). MTX increases apoptosis and decreases cell regeneration (7). The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is considered a hub protein and is an important regulator of DNA replication, repair, cell cycle control, and apoptosis (9). It has been reported that MTX increases lipid peroxidation in different tissues, increases inflammation, and decreases antioxidant capacity by increasing oxidative stress (10-12).

Inflammation and fibrosis stages are important in the development of pulmonary fibrosis. Proinflammatory cytokine production is stimulated by the increase of reactive oxygen species by MTX (13). Cytokines such as TNF- α and IL-6 play a role in inflammation (14). Such cytokines have been shown to increase and play an important role in MTX-induced lung toxicity (15). As MTX increases reactive oxygen species, it will lead to the development of pulmonary fibrosis (6). Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) is a protein that plays an important role in fibrogenesis (16). Laminin, a heterotrimeric protein, plays an important role in maintaining tissue integrity (17). Laminin, an important component of the basement membrane, also contributes to pulmonary fibrosis (18).

Reactive oxygen species are controlled by the antioxidant defense system, which includes enzymes such as SOD, CAT. MTX breaks down the enzymes of the antioxidant system and reduces their amount (19, 20). MTX produces reactive oxygen species and increases lipid peroxidation (21).

Alternative or complementary therapies play an important role in reducing the side effects of cancer drugs. Vitamin B12 (B12, cobalamin) is a water-soluble molecule found in foods of animal origin (22). Vitamin B12 is required as a cofactor in the metabolic process of remethylation of homocysteine to methionine (23). Vitamin B12 plays an important role in oxidative stress and increases antioxidant capacity. It provides a reduction of reactive oxygen species. Moreover, it has been shown in studies that it reduces inflammation, fibrosis, and apoptosis (24-26). The antioxidant property of vitamin B12 is achieved by removing reactive oxygen species and protecting the enzymes of the antioxidant system. It also provides modulation of cytokines (27).

The effects of vitamin B12 on damages such as fibrosis, inflammation, and apoptosis in MTX-induced lung injury has not been studied before. Therefore, the aim of this study was to investigate the protective effects and to reveal possible mechanisms of vitamin B12 against MTX-induced lung toxicity.

MATERIAL and METHOD

Experimental procedure

This study was planned and performed in Erciyes University Faculty of Medicine Histology-Embryology Department in line with the approval of the Ethics Committee of Erciyes University Experiments Local Ethics Committee. All procedures were carried out in accordance with the Universal Declaration of Animal Rights, with the approval of the Ethical Committee (Date: 12.09.2018, Decision no: 18/116 and subject for lung tissue: 21/131) of Erciyes University Experimental Animals. In this study, all the animals received human care according to standart guidelines. The experimental stage of the study was carried out in the Erciyes University Experimental Research Application and Research Center (DEKAM).

In this study, eight weeks old 150-200 g adult 32 Wistar albino type male rats produced in DEKAM were used. Rats kept in cages were kept in the normal order of the day at 21°C and 12 hours of light / dark environment and water and nutrient needs were provided. The experimental groups were formed by weighing the subjects and putting them together so that their weights were close to each other.

Group I: the control group (n = 8) was administered intraperitoneal (i.p.) saline throughout the experiment.

Group II: Vitamin B12 (B12) (n = 8) 3 μ g / kg / i.p. Vitamin B12 (Vitamin B12 Rubranova, 5,000 μ g; Bristol-Myers Squibb) was administered throughout the experiment.

Group III: On the 8th day of the experiment, the Methotrexate (MTX) (n = 8) group received a single dose of 20 mg/kg / i.p. Methotrexate (Methotrexate, 500mg / 20ml, Kocak Farma, Turkey).

Group IV: MTX + Vitamin B12 (B12) (n = 8) group single dose 20 mg / kg i.p. MTX + daily Vitamin B12 3 μ g / kg / i.p.

The experiment continued for 15 days. At the end of the experiment, animals were anesthetized with 30 mg/kg ketamine and 4 mg/kg xylazine and

they were sacrificed. At the end of the experiment, lung tissues were taken for histopathological, immunohistochemical, and biochemical evaluation.

Histopathological evaluation

Lung sections of 5 µm from paraffin blocks were left in the oven for a certain period of time using histological methods, then paraffin was removed with xylene and passed through graduated alcohol series and diluted. Masson's Trichrome (MT) staining was performed to see the general histological structure and fibrotic areas.

Immunohistochemistry

The immunohistochemistry method was used to investigate PCNA, α -Sma, Laminin, and TNF- α antibodies in lung tissues. Avidin biotin peroxidase method was used to determine the difference in expression of PCNA (PC10, sc-56, Santa Cruz Biotechnology), α -Sma (BSM-33188M, Bioss), laminin (ab128053, Abcam), and TNF- α (bs-2081R, Bioss) in lung sections. Paraffin sections were deparaffinized in xylene. For antigen recovery, 0.01 M 10% citrate buffer was applied in the microwave for seven minutes at 600 w and then allowed to cool at room temperature for 10 minutes. Sections washed with phosphate buffer (PBS) were treated with 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) for 12 minutes to prevent endogenous peroxidase activity. It was washed again with PBS three times for five minutes. The staining kit (TA-125-HDX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used for the next steps. After washing again 3 times in PBS, ultra v block solution was added to the tissues and kept in the tank for 10 minutes. After then PCNA, α -Sma, Laminin, and TNF- α antibodies were added to the tissues and incubated overnight at 4°C. After re-washing, the peroxidase in the kit, which exhibits diaminobenzidine (DAB) (TA-060-HDX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), was treated with the peroxidase substrate for 1.5 minutes to make its immunoreactivity visible. Image J program was used to evaluate antibody expressions (28, 29). 20 fields were examined and counted at 200 X magnification.

Apoptosis (TUNEL) staining

Apoptotic cells in the lung sections taken from the subjects were determined using the Roche brand In Situ Cell Detection Apoptosis Fluorescein Kit. The staining was performed according to the kit procedure. Lung sections taken at a thickness of 5 µm were deparaffinized and then rehydrated and washed twice with PBS for five minutes. Then, 270°C in a microwave oven in 0.01 M 5% sodium citrate buffer for antigen recovery was left for 5 minutes, then allowed to cool at room temperature for 10 minutes. Tissues washed with PBS for 3x5 minutes were then placed in the moisture chamber at 37°C with the TUNEL reaction mixture coming out of the kit and incubated in the oven for 75 minutes. Tissues washed two times for five minutes with PBS were contrasted with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole). Tissues sealed with glycerol closure solution were visualized on the Olympus BX51 fluorescent microscope at a wavelength of 450-500 nm. For the apoptotic index, apoptotic cells in 25 different areas (each group: total 200 area) were counted in 40X objective from each section (28).

Biochemical Analysis

Lung tissues from subjects were raised to -80°C. Tissues were homogenized before the study. Then, centrifugation was applied and supernatants were transferred to Eppendorf tubes for use. By ELISA method SOD (Cat. No: 201-11-0169, Sun Red Biological Technology), CAT (Cat. No: 201-11-5106, Sun Red Biological Technology), Malondialdehyde (MDA) (Cat. No: Cat. No: 201-11-0157, Sun Red Biological Technology), Interleukin-6 (IL-6) (Cat. No: Cat. No: 201-11-0136, Sun Red Biological Technology) kits were used and quantities were determined in ng/ml at 450 nm in ELISA reader.

Statistical Analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to identify the normal distribution of the data. One-way analysis of variance and posthoc Tukey test were used to determine differences between groups. Results are

presented as mean \pm Standard deviation (SD). The SPSS/PC program (Version 20.0; SPSS, Chicago, IL) and Graphpad Prism 8.0 software was used for statistical analysis. $P < 0.05$ were considered as statistically significant.

RESULTS

Histopathological results

In lung tissue was performed Masson's trichrome (MT) to investigate the histopathological changes. Healthy lung tissue was observed in the control, vitamin B12, and MTX+ vitamin B12 groups. In the MTX group, in interalveolar areas of the lung tissues were observed fibrotic areas compared to the other groups. With Masson trichrome staining, we saw increased fibers in the connective tissue in the lung of the MTX

group (Figure 1 A-B-C-D).

Immunohistochemistry results

Immunohistochemical staining was performed by using the avidin-biotin method to determine the lung tissue expressions of PCNA, α -Sma, Laminin, and TNF- α (Table 1, Figure 2). In the MTX group, PCNA positive cell counts significantly decreased compared to the control group ($p=0.0001$). In the MTX+B12 group, PCNA positive cell counts significantly increased compared to the MTX group ($p=0.0001$). In the MTX group, α -Sma, Laminin, and TNF- α staining areas significantly increased compared to the control group ($p=0.0001$). There was a statistically significant decrease in α -Sma, Laminin, and TNF- α staining area in the group MTX+B12 compared to the MTX group ($p=0.0001$).

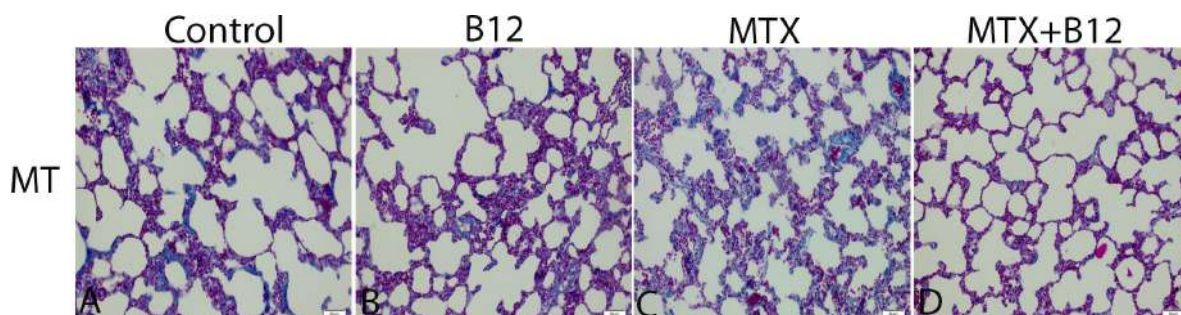


Figure 1. MT staining in lung tissues. In the Control group (A), B12 group (B), MTX+B12 group (D) is seen healthy lung tissue. In the MTX group (C) were seen pathologically increased fibrotic areas.

Fibrotic areas are shown with a black arrow. Blue stained areas show fibrosis. X200

MT: masson'trichrome,

MTX: methotrexate,

B12: B12 vitamin

Table 1. Immunohistochemistry data on the lung tissues

Groups	Control	B12	MTX	MTX+B12	<i>p</i>
PCNA Positive cell count	4.90 \pm 2.11 ^a	5.25 \pm 1.18 ^a	1.45 \pm 1.17 ^b	4.72 \pm 1.86 ^a	0.0001
α -SMA % staining area	12.69 \pm 3.39 ^a	8.64 \pm 2.48 ^b	31.84 \pm 5.41 ^c	18.94 \pm 4.73 ^d	0.0001
Laminin % staining area	4.20 \pm 2.11 ^a	4.44 \pm 1.15 ^a	7.52 \pm 1.88 ^b	3.51 \pm 1.97 ^a	0.0001
TNF α Staining area	0.40 \pm 0.25 ^a	0.42 \pm 0.27 ^a	5.16 \pm 3.72 ^b	1.21 \pm 0.69 ^a	0.0001

The data are expressed as mean + standard deviation. $p < 0.05$ was accepted as significant. There were no significant differences between the groups expressed with the same letter (a, b, c, d).

MTX: methotrexate, B12: vitamin B12, PCNA: Proliferating cell nuclear antigen,

α -SMA: Alpha-smooth muscle actin, TNF α : Tumor necrosis factor-alpha

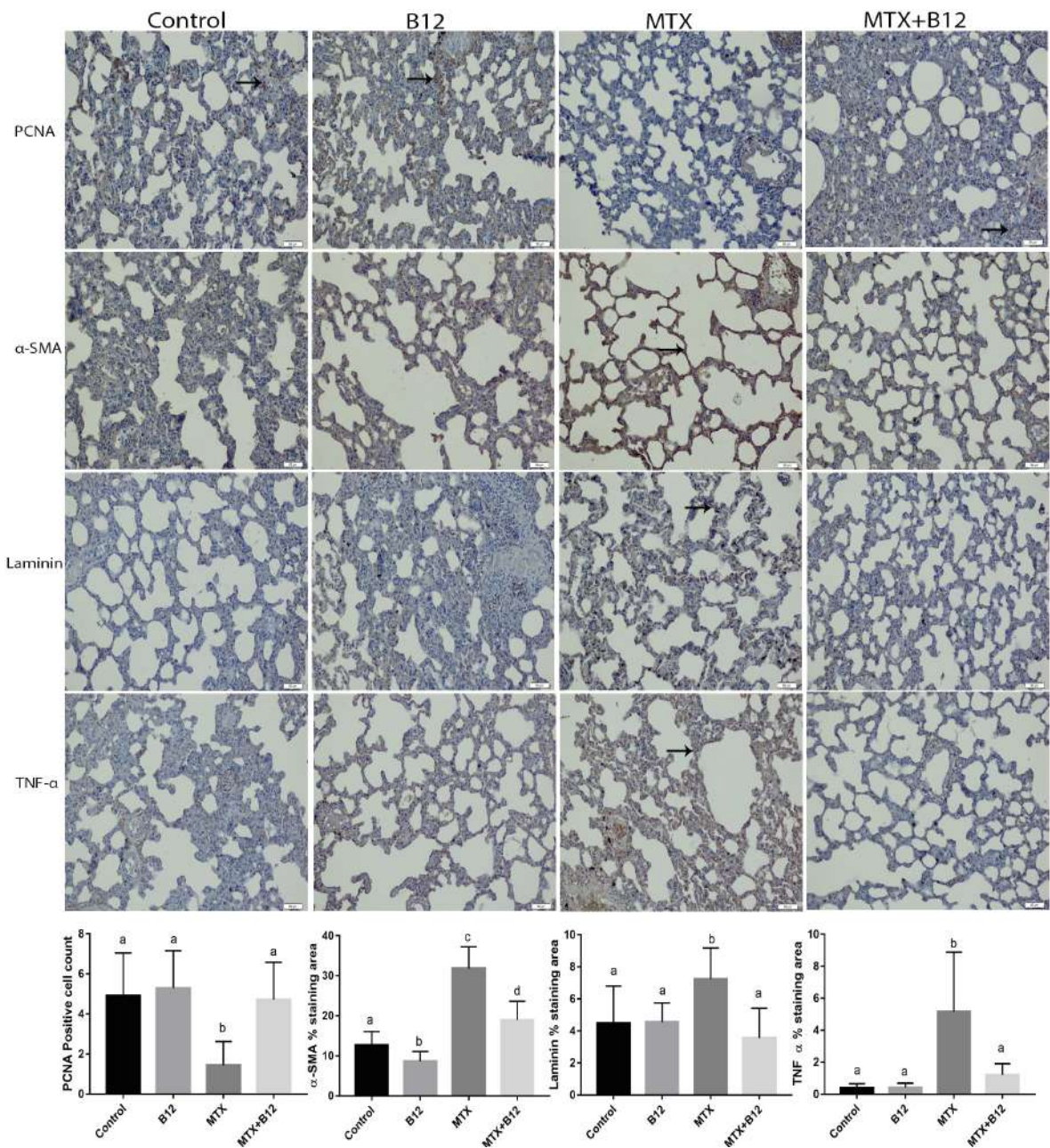


Figure 2. Results of MAP 2, eNOS, iNOS and nNOS immunohistochemical staining of lung tissues in experimental groups. Immunoreactive areas are indicated by arrows. X200.

Values are given as mean \pm standard deviation. $P < 0.05$ was considered significant.

There is no significant difference between groups containing the same letter (a, b, c, d).

MTX: methotrexate, B12: vitamin B12, PCNA: Proliferating cell nuclear antigen, α -SMA: Alpha-smooth muscle actin, TNF α : Tumor necrosis factor-alpha

TUNEL Results

TUNEL staining was performed to determine apoptotic cells in lung tissue. In the MTX group, TUNEL positive cell counts increased statistically significantly

compared to the control group ($p=0.0001$). There was a statistically significant decrease in TUNEL positive cell counts in the MTX+B12 group compared to the DOX group ($p=0.0001$). (Table2, Figure 3).

Table 2. TUNEL positive cell numbers belonging to the groups

Groups	Control	B12	MTX	MTX+B12	<i>p</i>
TUNEL positive cell count	3.24±2.65 ^a	2.51±2.16 ^b	3.70±2.15 ^c	3.04±1.78 ^a	0.0001

The data are expressed as mean + standard deviation. $p < 0.05$ was accepted as significant.

There were no significant differences between the groups expressed with the same letter (a, b, c).

MTX: methotrexate, B12: vitamin B12

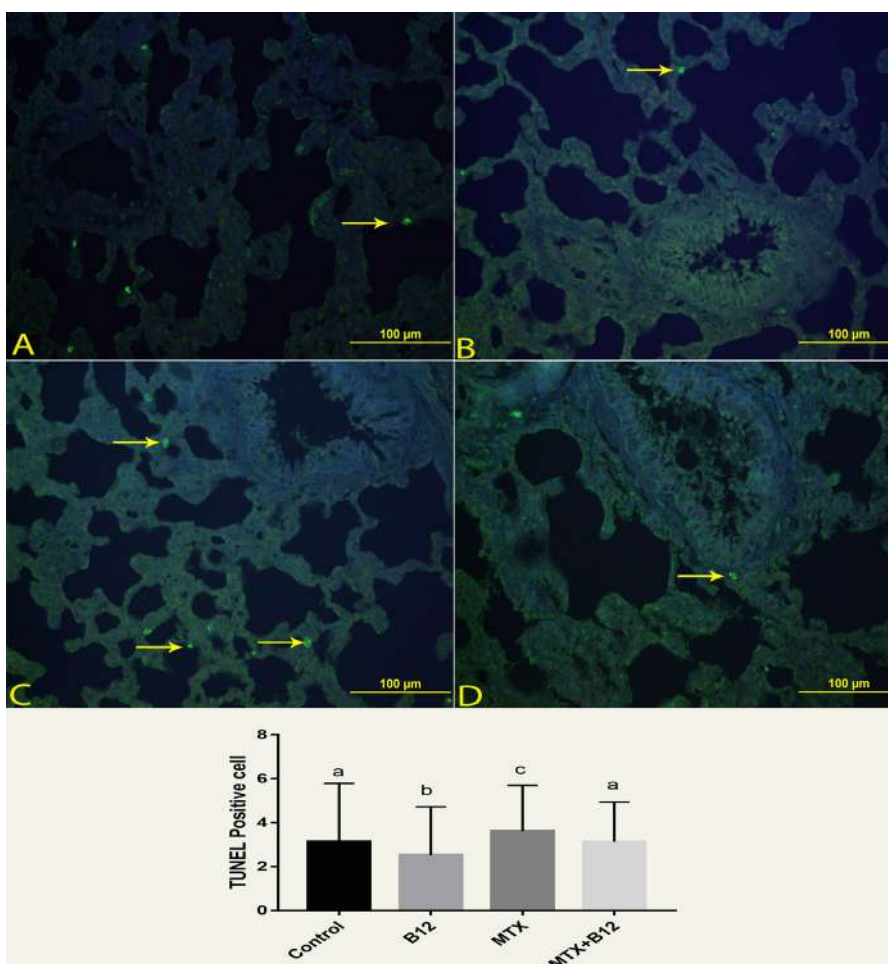


Figure 3. TUNEL data of the groups.

(A) Control group, (B) B12 group, (C) MTX group, (D) MTX+B12 group.

Apoptotic cells are indicated by yellow arrows. X400. $P < 0.05$ was considered significant.

There is no significant difference between groups containing the same letter (a, b, c).

Biochemical Results

Lung Tissue Antioxidant Enzymes Activities

The results of the antioxidant enzymes are shown in Table 3. SOD and CAT levels significantly decreased in the MTX group compared to the Control group ($p=0.005$). SOD and CAT levels significantly increased in the MTX+B12 group compared to the MTX group ($p=0.005$). MDA level significantly increased in the MTX group compared to the Control group ($p=0.005$).

MDA level was significantly decreased in the MTX+B12 group compared to the MTX group ($p=0.0001$). (Figure 4).

Lung Tissue inflammatory marker IL-6 Activity

The results of the inflammatory IL-6 are shown in Table 3. IL-6 level significantly increased in the MTX group compared to the control group ($p=0.005$). IL-6 level significantly decreased in the MTX+B12 group compared to the MTX group ($p=0.005$). (Figure 4).

Table 3. Biochemical data of the experimental groups

Groups	Control	B12	MTX	MTX+B12	<i>p</i>
SOD ng/ml	33.13±9.73 ^a	34.9±8.49 ^a	21.41±2.09 ^b	32.44±2.09 ^a	0.0086
CAT ng/ml	96.9±28.4 ^a	101.4±24.99 ^a	56.32±22.65 ^b	96.06±12.55 ^a	0.0091
MDA ng/ml	10.31±2.20 ^a	10.39±1.21 ^a	18.56±2.76 ^b	12.31±1.25 ^a	0.0001
IL-6 ng/ml	99.73±12.56 ^a	98.67±10.10 ^a	148.10±20.35 ^b	119.8±9.66 ^a	0.0001

The data are expressed as mean + standard deviation. $p < 0.05$ was accepted as significant.

There were no significant differences between the groups expressed with the same letter (a, b).

MTX: methotrexate, B12: vitamin B12, SOD: Superoxide dismutase, CAT: Catalase, MDA: Malondialdehyde, IL-6: Interleukin 6.

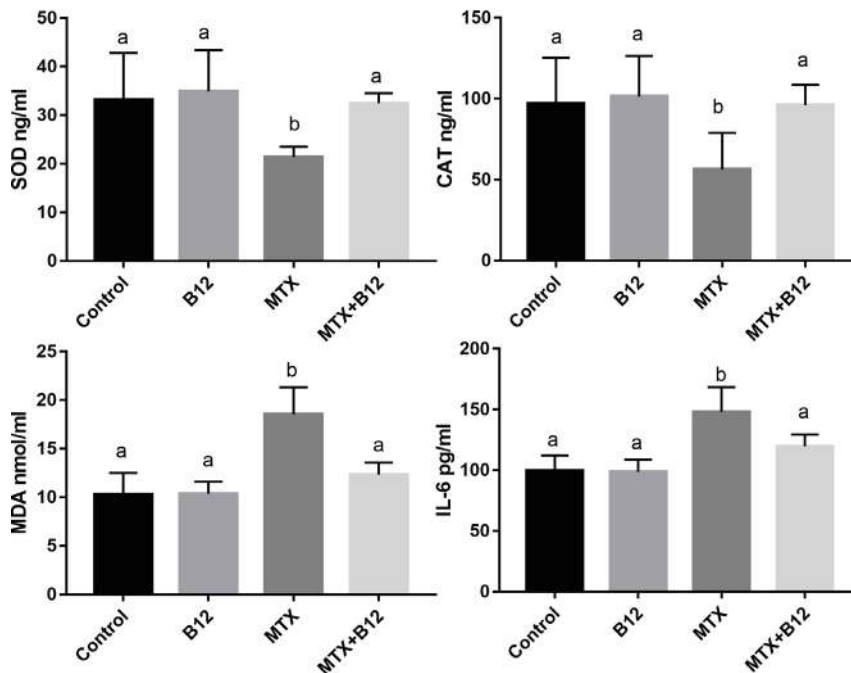


Figure 4. Graphics of biochemical results.

There were no significant differences between the groups expressed with the same letter (a, b).

MTX: methotrexate, B12: vitamin B12, SOD: Superoxide dismutase,

CAT: Catalase, MDA: Malondialdehyde, IL-6: Interleukin 6

DISCUSSION and CONCLUSION

Methotrexate (MTX) is a chemotherapeutic drug that is generally used in diseases such as rheumatoid arthritis and psoriasis (30, 31). MTX also causes neurotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, and lung damage (32-35). In our study, when the lung tissue is examined histopathologically, we show that MTX stimulates fibrosis by increasing the amount of collagen around the alveoli. However, in the group treated with vitamin B12, lung tissue was observed similar to the control group. MTX has been shown to cause fibrosis in studies (20, 36). Pulmonary fibrosis is an important life-threatening disease. It is a fatal disease that causes excessive collagen accumulation and lung dysfunction in the lung parenchyma due to excessive activation of the fibroblast (37). Myofibroblasts provide an increase in the extracellular matrix such as collagen in the development of fibrosis. α -sma is synthesized by myofibroblasts (38, 39). It has been observed that the amount of α -sma and laminin increases in pulmonary fibrosis (40, 41). MTX has been shown to be associated with pulmonary fibrosis (42, 43). In our study, the results of immunohistochemistry staining, it was observed that MTX significantly increased the amount of α -sma and laminin around the alveoli in the lung compared to the control group. In the group treated with vitamin B12, there was a significant decrease in the amount of immunoreactivity of α -sma and laminin compared to the MTX group. This result shows that vitamin B12 reduces fibrosis by decreasing collagen accumulation similar to other studies (44, 45).

MTX-induced pulmonary toxicity has been shown to increase inflammation. In this case, the increase in pro-inflammatory cytokines occurs (46). In our study, TNF- α immunoreactivity in lung tissue significantly increased in the MTX group. IL-6 level, another cytokine, showed a significant increase in the MTX group when evaluated biochemically. Our results confirm the increase in MTX-induced TNF- α and IL-6 levels and comply with other studies (46, 47). In the current study, TNF- α and IL-6 levels significantly decreased in the group treated with

vitamin B12. It has been noted that increasing the level of cytokines will significantly increase pulmonary profibrotic activity by activation of fibroblast, macrophage, and myofibroblast cells (48). These results confirm the anti-inflammatory presentation of vitamin B12 (49, 50).

Although chemotherapeutic drugs are used in cancer, they cause apoptosis in healthy tissues. MTX application also causes apoptosis in different tissues (7, 51). In our study While the number of apoptotic cells increased in the lung tissue in the MTX group, the number of PCNA positive cells decreased. In the group treated with vitamin B12, we showed that the number of TUNEL positive cells in the lung tissue decreased and the number of PCNA positive cells increased. As in other studies, it shows the positive effects of vitamin B12 on cell proliferation (52, 53).

Oxidative stress plays an important role in lung toxicity caused by MTX, and oxidants and antioxidants play a role in this process. Malondialdehyde (MDA) from oxidants and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) from antioxidants play an important role in this process (46, 47). MTX causes oxidative damage and increases lipid peroxidation. Excessive production of reactive oxygen species disrupts the antioxidant system (54). In the current study, we showed that in the MTX applied group, the level of MDA showing lipid peroxidation increased significantly as a result of the biochemistry of lung tissue. The level of enzymes such as SOD and CAT, which play a role in the antioxidant system, has decreased significantly in the MTX treated group. This decreased antioxidant capacity and increased lipid peroxidation amount are compatible with other studies in the literature (33, 54). In the group treated with B12, which we use as an antioxidant, lipid peroxidation significantly decreased, while a significant increase in the enzymes of the antioxidant system contributed to the preservation of lung tissue. Vitamin B12, which has functions such as removing reactive oxygen species and reducing oxidative stress, demonstrated this feature in our study in MTX-induced lung cytotoxicity (27, 55).

In conclusion, we found that vitamin B12 has positive effects by reducing factors such as oxidative stress, fibrosis, apoptosis, and inflammation in methotrexate-induced lung damage. We observed that MTX stimulated lung injury decreased with

vitamin B12 treatment. The administration of vitamin B12 together with chemotherapeutics used in cancer draws attention as an important agent in minimizing the damage to other tissues.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Erciyes University the Scientific Research Projects Unit, TSA-2019-8673 project code.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* The study was approved by the Erciyes University's Experimental Animal and Local Ethics' Committee (Date: 12.09.2018 and Number: 18/116).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Ohbayashi M, Kubota S, Kawase A, Kohyama N, Kobayashi Y, Yamamoto T. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in methotrexate-induced pulmonary fibrosis. *J Toxicol Sci*, 2014;39(2):319-30.
- El-Sheikh AA, Morsy MA, Abdalla AM, Hamouda AH, Alhaider IA. Mechanisms of thymoquinone hepatorenal protection in methotrexate-induced toxicity in rats. *Mediators Inflamm*, 2015;2015:859383.
- Lee AM, Shandala T, Soo PP, Su YW, King TJ, Chen KM, et al. Effects of Resveratrol Supplementation on Methotrexate Chemotherapy-Induced Bone Loss. *Nutrients*, 2017;9(3).
- Akubovic BD, Donovan A, Webster PM, Shear NH. Methotrexate-induced pulmonary toxicity. *Can Respir J*, 2013;20(3):153-5.
- Salehi M, Miller R, Khaing M. Methotrexate-induced hypersensitivity pneumonitis appearing after 30 years of use: a case report. *J Med Case Rep*, 2017;11(1):174.
- Mohamed DI, Khairy E, Tawfek SS, Habib EK, Fetouh MA. Coenzyme Q10 attenuates lung and liver fibrosis via modulation of autophagy in methotrexate treated rat. *Biomed Pharmacother.*,2019;109:892-901.
- Ohbayashi M, Suzuki M, Yashiro Y, Fukuwaka S, Yasuda M, Kohyama N, et al. Induction of pulmonary fibrosis by methotrexate treatment in mice lung in vivo and in vitro. *J Toxicol Sci*, 2010;35(5):653-61.
- Ebrahimi R, Sepand MR. Ellagic acid reduces methotrexate-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction via up-regulating Nrf2 expression and inhibiting the I κ B α /NF κ B in rats. *Daru*, 2019;27(2):721-33.
- Shemesh A, Kundu K, Peleg R, Yossef R, Kaplanov I, Ghosh S, et al. NKp44-derived peptide binds proliferating cell nuclear antigen and mediates tumor cell death. *Front Immunol*, 2018;9:1114.
- Moghadam AR, Tutunchi S, Namvaran-Abbas-Abad A, Yazdi M, Bonyadi F, Mohajeri D, et al. Pre-administration of turmeric prevents methotrexate-induced liver toxicity and oxidative stress. *BMC Complement Altern Med*, 2015;15:246.

11. Selimoglu Sen H, Sen V, Bozkurt M, Turkcu G, Guzel A, Sezgi C, et al. Carvacrol and pomegranate extract in treating methotrexate-induced lung oxidative injury in rats. *Med Sci Monit*, 2014;20:1983-90.
12. Stojiljkovic N, Ilic S, Jakovljevic V, Stojanovic N, Stojnev S, Kocic H, et al. The encapsulation of lycopene in nanoliposomes enhances protective potential in methotrexate-induced kidney injury model. *Oxid Med Cell Longev*, 2018;2018:2627917.
13. Mahmoud AM, Hussein OE, Hozayen WG, Abd El-Twab SM. Methotrexate hepatotoxicity is associated with oxidative stress, and down-regulation of PPAR γ and Nrf2: protective effect of 18 β -glycyrrhetic acid. *Chem Biol Interact*, 2017;270:59-72.
14. Chu H, Jiang S, Liu Q, Ma Y, Zhu X, Liang M, et al. Sirtuin1 protects against systemic sclerosis-related pulmonary fibrosis by decreasing proinflammatory and profibrotic processes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018;58(1):28-39.
15. Kim YJ, Song M, Ryu JC. Inflammation in methotrexate-induced pulmonary toxicity occurs via the p38 MAPK pathway. *Toxicology*, 2009;256(3):183-90.
16. Sun P, Li L, Zhao C, Pan M, Qian Z, Su X. Deficiency of α 7 nicotinic acetylcholine receptor attenuates bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Mol Med*, 2017;23:34-9.
17. Lee CM, Cho SJ, Cho WK, Park JW, Lee JH, Choi AM, et al. Laminin α 1 is a genetic modifier of TGF- β 1-stimulated pulmonary fibrosis. *JCI Insight*, 2018;3(18).
18. Su Y, Gu H, Weng D, Zhou Y, Li Q, Zhang F, et al. Association of serum levels of laminin, type IV collagen, procollagen III N-terminal peptide, and hyaluronic acid with the progression of interstitial lung disease. *Medicine (Baltimore)*, 2017;96(18):e6617.
19. Zaki SM, Hussein GHA, Khalil HMA, Abd Algaleel WA. Febuxostat ameliorates methotrexate-induced lung damage. *Folia morphologica*, 2020.
20. Kalemci S, Akpinar O, Dere Y, Sarihan A, Zeybek A, Tanriverdi O. Efficacy of clarithromycin as a protective agent in the methotrexate-induced pulmonary fibrosis model. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*, 2018;15(4):209-12.
21. Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 2004;39(11):1119-27.
22. Mahalle N, Bhide V, Greibe E, Heegaard CW, Nexo E, Fedosov SN, et al. Comparative Bioavailability of Synthetic B12 and Dietary Vitamin B12 Present in Cow and Buffalo Milk: A Prospective Study in Lactovegetarian Indians. *Nutrients*, 2019;11(2).
23. Banerjee R. B12 trafficking in mammals: A for coenzyme escort service. *ACS chemical biology*, 2006;1(3):149-59.
24. Li F, Bahnson EM, Wilder J, Siletzky R, Hagaman J, Nickeleit V, et al. Oral high dose vitamin B12 decreases renal superoxide and post-ischemia/reperfusion injury in mice. *Redox Biol*, 2020;32:101504.
25. Samblas M, Martinez JA, Milagro F. Folic Acid Improves the Inflammatory Response in LPS-Activated THP-1 Macrophages. *Mediators Inflamm*, 2018;2018:1312626.
26. Moreira ES, Brasch NE, Yun J. Vitamin B12 protects against superoxide-induced cell injury in human aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 2011;51(4):876-83.
27. van de Lagemaat EE, de Groot L. Vitamin B(12) in Relation to Oxidative Stress: A Systematic Review. 2019;11(2).
28. 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.
29. Sonmez MF, Ozdemir S, Guzel M, Kaymak E. The ameliorative effects of vinpocetine on apoptosis and HSP-70 expression in testicular torsion in rats. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*, 2017;92(2):92-9.
30. Tang KT, Chen YH, Lin CH, Chen DY. Methotrexate is not associated with increased liver cirrhosis in a population-based cohort of rheumatoid arthritis patients with chronic hepatitis C. *Sci Rep*, 2016;6:33104.
31. Cooper I, Last D, Guez D, Sharabi S, Elhaik Goldman S, Lubitz I, et al. Combined local blood-brain barrier opening and systemic methotrexate for the treatment of brain tumors. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015;35(6):967-76.
32. Wen J, Maxwell RR, Wolf AJ, Spira M, Gulinello ME, Cole PD. Methotrexate causes persistent deficits in memory and executive function in a juvenile animal model. *Neuropharmacology*, 2018;139:76-84.
33. Akbulut S, Elbe H, Eris C, Dogan Z, Toprak G, Otan E, et al. Cytoprotective effects of amifostine, ascorbic acid and N-acetylcysteine against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *World J Gastroenterol*, 2014;20(29):10158-65.
34. Devrim E, Cetin R, Kilicoglu B, Erguder BI, Avci A, Durak I. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. *Ren Fail*, 2005;27(6):771-3.
35. Kahraman H, Kurutas E, Tokur M, Bozkurt S, Ciralik H, Kabakci B, et al. Protective effects of erythropoietin and N-acetylcysteine on methotrexate-induced lung injury in rats. *Balkan Med J*, 2013;30(1):99-104.

36. Tag HM. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. *BMC Complement Altern Med*, 2015;15:252.
37. Oliveira FMS, da Paixao Matias PH, Kraemer L, Gazzinelli-Guimaraes AC, Santos FV, Amorim CCO, et al. Comorbidity associated to *Ascaris suum* infection during pulmonary fibrosis exacerbates chronic lung and liver inflammation and dysfunction but not affect the parasite cycle in mice. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019;13(11):e0007896.
38. Goodwin J, Choi H, Hsieh MH, Neugent ML, Ahn JM, Hayenga HN, et al. Targeting Hypoxia-Inducible Factor-1alpha/Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Axis by Dichloroacetate Suppresses Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018;58(2):216-31.
39. Horie M, Saito A, Mikami Y, Ohshima M, Morishita Y, Nakajima J, et al. Characterization of human lung cancer-associated fibroblasts in three-dimensional in vitro co-culture model. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012;423(1):158-63.
40. Tsoyi K, Chu SG, Patino-Jaramillo NG, Wilder J, Villalba J, Doyle-Eisele M, et al. Syndecan-2 Attenuates Radiation-induced Pulmonary Fibrosis and Inhibits Fibroblast Activation by Regulating PI3K/Akt/ROCK Pathway via CD148. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018;58(2):208-15.
41. Singer II, Kawka DW, McNally SM, Eiermann GJ, Metzger JM, Peterson LB. Extensive Laminin and Basement-Membrane Accumulation Occurs at the Onset of Bleomycin-Induced Rodent Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol*, 1986;125(2):258-68.
42. Fragoulis GE, Nikiphorou E, Larsen J, Korsten P, Conway R. Methotrexate-Associated Pneumonitis and Rheumatoid Arthritis-Interstitial Lung Disease: Current Concepts for the Diagnosis and Treatment. *Front Med (Lausanne)*, 2019;6:238.
43. Herfarth HH, Kappelman MD, Long MD, Isaacs KL. Use of Methotrexate in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 2016;22(1):224-33.
44. Ahmad A, Afroz N, Gupta UD, Ahmad R. Vitamin B12 supplement alleviates N'-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Pharm Biol*, 2014.
45. Isoda K, Kagaya N, Akamatsu S, Hayashi S, Tamesada M, Watanabe A, et al. Hepatoprotective effect of vitamin B12 on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol Pharm Bull*, 2008;31(2):309-11.
46. Mammadov R, Suleyman B, Akturan S, Cimen FK, Kurt N, Suleyman Z, et al. Effect of lutein on methotrexate-induced oxidative lung damage in rats: a biochemical and histopathological assessment. *Korean J Intern Med*, 2019;34(6):1279-86.
47. Abdel-Daim MM, Khalifa HA, Abushouk AI, Dkhil MA, Al-Quraishy SA. Diosmin Attenuates Methotrexate-Induced Hepatic, Renal, and Cardiac Injury: A Biochemical and Histopathological Study in Mice. *Oxid Med Cell Longev*, 2017;2017:3281670.
48. Wilson MS, Wynn TA. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunol*, 2009;2(2):103-21.
49. Kemse NG, Kale AA, Joshi SR. A combined supplementation of omega-3 fatty acids and micronutrients (folic acid, vitamin B12) reduces oxidative stress markers in a rat model of pregnancy induced hypertension. *PLoS One*, 2014;9(11):e111902.
50. Sampaio AL, Dalli J, Brancaleone V, D'Acquisto F, Perretti M, Wheatley C. Biphasic modulation of NOS expression, protein and nitrite products by hydroxocobalamin underlies its protective effect in endotoxemic shock: downstream regulation of COX-2, IL-1beta, TNF-alpha, IL-6, and HMGB1 expression. *Mediators Inflamm*, 2013;2013:741804.
51. Koppelman T, Pollak Y, Mogilner J, Bejar J, Coran AG, Sukhotnik I. Dietary L-arginine supplementation reduces Methotrexate-induced intestinal mucosal injury in rat. *BMC Gastroenterol*, 2012;12:41.
52. Vasiliausha SR, Beltrame FL, de Santi F, Cerri PS, Caneguim BH, Sasso-Cerri E. Seminiferous epithelium damage after short period of busulphan treatment in adult rats and vitamin B12 efficacy in the recovery of spermatogonial germ cells. *Int J Exp Pathol*, 2016;97(4):317-28.
53. Bhattacharjee A, Prasad SK, Pal S, Maji B, Syamal AK, Banerjee A, et al. Protective efficacy of folic acid and vitamin B12 against nicotine-induced toxicity in pancreatic islets of the rat. *Interdiscip Toxicol*, 2015;8(2):103-11.
54. Eki Nci-Akдеми RF, Yildirim S, Kandemi RF, Gulci NI, Kucukler S, Saglam YS, et al. The effects of casticin and myricetin on liver damage induced by methotrexate in rats. *Iran J Basic Med Sci*, 2018;21(12):1281-8.
55. Abdulkhaleq FM, Alhussainy TM, Badr MM, Khalil AAA, Gammoh O, Ghanim BY, et al. Antioxidative stress effects of vitamins C, E, and B12, and their combination can protect the liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Drug Des Devel Ther*, 2018;12:3525-33.

The epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from patients in intensive care units of a research hospital

Araştırma hastanesinde yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin epidemiyolojisi ve antifungal duyarlılığı

Esma EREN¹ (ID), Hafize SAV² (ID), Zehra BEŞTEPE DURSUN¹ (ID)

ABSTRACT

Objective: Over the past two decades, *Candida* species have come to be regarded as important agents of nosocomial infection. In this study, we evaluated the epidemiology, antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from adult and pediatric patients in intensive care units of a research hospital from 2015 to 2017.

Methods: A total of 279 yeast *Candida* isolates recovered from blood and other samples were identified to species by using conventional (germ tube formation, microscopic morphology in corn meal-Tween 80 agar and formation of chlamydo-spore, presence of pseudohyphae, carbohydrate fermentation and assimilation tests, urease and nitrate test), and Phoenix (Becton Dickinson, ABD). Susceptibility of the same species to amphotericin B (AMB), fluconazole (FLC), voriconazole (VRC) and caspofungin (CAS) were determined by E test method.

Results: The specimens were isolated from, urine 173 (62%), blood 76 (27.24%), wound 18 (6.45%), tissue culture 4 (1.43%), central venous catheter 3 (1.08%), respiratory tract 2 (0.72%), peritoneal fluid 2 (0.72%), pleural fluid 1 (0.36%). The most commonly isolated species was 185 (66.31%) *C. albicans* from the various clinical specimens

ÖZET

Amaç: *Candida* türleri son yirmi yılda nosokomial enfeksiyonların önemli ajanları olarak görülmeye başlanmıştır. Çalışmamızda hastanemizde 2015-2017 tarihleri arasında çocuk ve yetişkin hasta grubundan izole edilen *Candida* spp. türlerinin lokal epidemiyolojisi ve antifungal duyarlılığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Klinik örneklerden izole edilen toplam 279 *Candida* spp. türü ticari Phoenix (Becton Dickinson, ABD) ve konvansiyonel yöntem (germ tüp oluşumu, mısır unlu agarda mikroskopik morfoloji, klamidospor oluşumu, pseudohif bulunuşu, karbonhidrat fermantasyon ve asimilasyon testleri, üreaz testi, nitrat testi) ile tanımlanmıştır. İzole edilen türlerin flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B, kaspofungin antifungal minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIK) değerleri antifungal duyarlılığı E-test metodu ile belirlenmiştir.

Bulgular: Örneklerin dağılımı 173 (%62) idrar, 76 (%27,24) kan, 18 (%6,45) yara, 4 (%1,43) doku, 3 (%1,08) santral venöz kateter, 2 (%0,72) solunum yolu, 2 (%0,72) peritoneal sıvı, 1 (%0,36) plevral mayı olarak belirlenmiştir. Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türleri 185 (%66,31) *C. albicans*, 33 (%11,83)

¹Kayseri City Hospital, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Kayseri

²Kayseri City Hospital, Department of Mycology, Kayseri



İletişim / Corresponding Author : Hafize SAV
Kayseri Şehir Hastanesi, Mikoloji bölümü, Kayseri - Türkiye
E-posta / E-mail : hafize.sav@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 26.10.2020
Kabul Tarihi / Accepted : 23.03.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.34356

Eren E, Sav H, Beştepe Dursun Z. The epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from patients in intensive care units of a research hospital. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 93 - 102

was followed by the species of 33 (11.83%) *C. parapsilosis*, 29 (10.39%) *C. glabrata*, 29 (10.39%), *C. tropicalis*, 2 (0.72%) *C. pelliculosa*, 1 (0.36%) *C. melibiosica*. *C. glabrata* was the most frequently isolated in elderly patients and *C. albicans* was the most frequently isolated in childhood. Various candida species have been isolated from the urine samples of 173 patients with candiduria. *C. albicans* was found to be the most common cause of candiduria (142 samples (82%)). Antifungal susceptibility test study was performed from 92 *Candida* isolates. For these species, the geometric mean minimum inhibitor concentration of each antifungal was calculated to be 2.2 µg/mL for FLC, 0.6 µg/mL for AMB, 0.6 µg/mL for CAS and 0.1 µg/mL for VRC. All *Candida* isolates were found susceptible to voriconazole. Seven isolates of 19 *C. glabrata* species were dose-dependent sensitivity and two isolates were determined to be resistant to fluconazole. Three isolates of 26 *C. parapsilosis* species were reported to be resistant to caspofungin.

Conclusion: *C. albicans* is the most common *Candida* species isolated from the clinical specimens we studied. Knowing the types and susceptibility of *Candida* strains will be an important factor in our choice of antifungal therapy.

Key Words: Antifungal susceptibility, *Candida* spp., epidemiology, intensive care unit

C. parapsilosis, 29 (%10,39) *C. glabrata*, 29 (%10,39) *C. tropicalis*, 2 (%0,72) *C. pelliculosa*, 1 (% 0,36) *C. melibiosica* olarak tanımlanmıştır. Yaşlı hastalardan en sık *C. glabrata* türü, çocuk hastalardan en sık *C. albicans* türü izole edilmiştir. Kandidürisi olan 173 hastanın idrar örneğinde çeşitli candida türleri izole edilmiştir. En sık (142 örnekte (%82)) kandidüri etkeni olarak *C. albicans* tespit edilmiştir. Klinisyen isteğine bağlı olarak 92 *Candida* izolatından antifungal çalışılmıştır. Bu türler için geometrik minimum inhibitör konsantrasyon değeri flukonazol için 2,2 µg/mL, amfoterisin B için 0,6 µg/mL, kaspofungin 0,6 µg/mL, vorikonazol 0,1 µg/mL olarak belirlenmiştir. İzolatların hepsi vorikonazol için duyarlı bulunmuştur. Flukonazol için 19 *C. glabrata* türünden yedi izolat doza bağlı duyarlı ve iki izolat dirençli olarak tespit edilmiştir. Kaspofungin için 26 *C. parapsilosis* türünün üçü dirençli olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Çalıştığımız klinik örneklerden en sık izole edilen tür *C. albicans* türüdür. *Candida* enfeksiyonlarının lokal epidemiyolojisini bilmek ampirik antifungal ajanların seçimi için gerekli bir bilgidir.

Anahtar Kelimeler: Antifungal duyarlılık, *Candida* spp., epidemiyoloji, yoğun bakım

INTRODUCTION

There are over 150 species of *Candida* spp. isolates in nature. While the isolation frequency of these species is changing, it is accepted that the most commonly isolated species are *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* (1). *Candida* species isolated from different age groups may vary. For example, *C. parapsilosis* isolated from the blood cultures of newborns is known as a predominant species (2, 3). The frequency of *C. glabrata* species is higher in adult and elderly patients (4). *C. tropicalis* is more frequently isolated

in patients from non-neutropenic and haematological malignancies (5).

Nosocomial invasive infections caused by *Candida* spp. have been a major medical problem in intensive care units (ICUs). Infectious Diseases Society of America (IDSA) anti-fungal treatment protocols vary according to patients' age groups (6). These latest treatment protocols state that echinocandins are recommended as the first choice for suspected candidiasis. Fluconazole (FLC) is an acceptable alternative azole drug for non-neutropenic patients (those who have had no recent azole exposure and are not colonized with azole-resistant *Candida* species) in intensive

care. Despite new antifungal drugs, amphotericin B deoxycholate is recommended for neonates with disseminated candidiasis (7). In patients without neutropenia, initial antifungal treatment begins with FLC. This regimen can be used for infections caused due to *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, and *C. guilliermondi*. Caspofungin (CAS) is recommended for *C. glabrata* infections (6). *C. krusei* is intrinsically resistant to FLC and has a decreased susceptibility to other azoles. Echinocandins, VCZ or amphotericin B (AMB) are preferred antifungal regimens for *C. krusei* infection (8).

The aim of our study was to analyze the species distribution of *Candida* isolates from different clinical specimens and determine antifungal susceptibility to AMB, FLC, voriconazole (VRC) and CAS, by the E-test method.

MATERIAL and METHOD

Patients

This was a retrospective study of *Candida* infection in the ICUs of a 1200-bed research hospital in Turkey. The study was conducted according to the declaration of Helsinki. The patients were selected from patients who were hospitalized in ICUs between October 2015 and August 2017. A total of 279 non-repeat isolates of *Candida* isolates were obtained from 76 blood, 173 urine, 18 wounds, four tissue sample, three central venous catheters, two respiratory tracts, two peritoneal fluid, one pleural fluid of patients in adult and child intensive care unit of a research hospital. Candidemia was defined as the isolation of *Candida* spp. from blood cultures and other forms of invasive candidiasis (proven or probable) were defined according to the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group criteria (9). In our study, all patients with asymptomatic candiduria had a urinary catheter. Candiduria refers

to the laboratory finding of $>10^3$ colony-forming units (CFU) of *Candida* spp. per mL of urine. For suspicious infection potentially occurring nosocomially and out of the hospital, samples including wound, respiratory tract, peritoneal fluid, pleural fluid were cultured on SDA agar for fungal identification. The cut-off age value for elderly patients was taken as 65 years.

Mycological studies

Identification of each strain was performed by using conventional (germ tube formation, microscopic morphology in corn meal-Tween 80 agar) and automated methods, Phoenix (Becton Dickinson, ABD).

Antifungal Agents and Susceptibility Testing

All isolates were cultured by using SDA (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). These isolates were tested for susceptibility against FLC, CAS, VRC, and AMB with E test method. For the antifungal susceptibility testing RPMI 1640 (Sigma) medium was prepared. 4 g L-glutamine, 34.5 g morpholinepropanesulfonic acid, 20 g glucose, and 17 g Bacto agar (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) were dissolved in 1 L deionized water and autoclaved at 121 °C for 15 minutes. The inoculum suspensions were adjusted spectrophotometrically at 530 nm to match the turbidity of a 0.5 McFarland standard. Agar plates were inoculated with a cotton swab and allowed to dry for at least 15 min before the E-test strips were applied. E-test agar plates were incubated at 35 °C and assessed at 48 h. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of azole were detected as the lowest concentrations providing an 80% reduction in growth. MICs of AMB was determined as the lowest concentration inhibiting any growth. MICs were also determined by the E-test method according to the manufacturer's guidelines. E-test strips of FLC (0.016-256 µg/ml), VRC (0.002-32 µg/ml), AMB (0.002-32 µg/ml), and CAS (0.002-32 µg/ml) were placed perpendicular to each other on an RPMI plate. Quality control was performed in both tests in accordance with the CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute) document M27-A3 using *C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019.

RESULTS

Candida species were isolated from the clinical specimens of 279 patients, including 147 female and 132 male patients hospitalized in our ICUs. The mean age of the patients was found to be 65 years. The specimens were isolated from urine 173 (62%), blood 76 (27.24%), wound 18 (6.45%), tissue culture 4 (1.43%), central venous catheter 3 (1.08%), respiratory tract 2 (0.72%), peritoneal fluid 2 (0.72%), pleural fluid 1 (0.36%). The most commonly isolated species from various specimens of pediatric and adult patients was determined to be *C. albicans*. While 185 of 279 isolates (66.31%) were identified as *C. albicans*, the others were identified as 33 (11.83%) *C. parapsilosis*, 29 (10.39%) *C. glabrata*, 29 (10.39%) *C. tropicalis*, 2 (0.72%) *C. pelliculosa*, 1 (0.36%) *C. melibiosica*, respectively (Table 1). Considering all the specimens, the unit in which proliferation was observed most frequently was determined to be the

anaesthesia intensive care unit. Simultaneously, the most commonly isolated species from all specimens in the pediatric intensive care unit (n = 11/17, 64.7%) were identified to be *C. albicans*. In the adult and pediatric intensive care units, 76 *Candida* species were isolated from the blood culture. Examining the blood culture isolates, the most commonly isolated species was 32 (42.2%) *C. albicans* species and it was followed by 26 (34.2%) *C. parapsilosis*, 11(14.4%) *C. glabrata*, 7 (9.2%) *C. tropicalis* species, respectively. Distribution of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit was shown in Table 2. From the 142 of 173 urine specimens coming from the hospitalized patients of intensive care units in our hospital, *C. albicans*, (n = 15/173, 8.7%), *C. tropicalis*, (n = 11/173, 6.3%) *C. glabrata* (n = 2/173, 1.2%) *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa* (n = 2/173 1.2%), *C. melibiosica* (n = 1/173, 0.6%) were isolated, respectively.

Table 1. Distribution of *Candida* species isolated from patients in intensive care

Department	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. melibiosica</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. tropicalis</i>	TOTAL
Anesthesia ICU	60	8	-	19	-	10	97
Brain surgery ICU	14	-	-	3	-	2	19
Pediatric ICU	11	1	-	3	-	2	17
Medical ICU	47	8	-	2	1	5	63
Chest diseases ICU	2	-	-	1	-	-	3
Surgical ICU	13	7	-	-	-	-	20
Cardiovascular surgery ICU	3	-	-	1	-	1	5
Cardiac ICU	8		1	1	1	1	12
Neurology ICU	21	4	-	2		4	31
Burn Unit	6	1	-	1		4	12
Total (Number%)	185(66.31%)	29(10.39%)	(0.36%)	33(11.83%)	2(0.72%)	29(10.39%)	279

ICU: Intensive Care Unit

:- Not growth

Table 2. Distribution of *Candida* species isolated from blood cultures in intensive care

Department	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis complex</i>	<i>C. tropicalis</i>	Total
Anesthesia ICU	10	2	17	4	33
Brain surgery ICU	1	-	2	-	3
Pediatric ICU	6	-	2	-	8
Medical ICU	7	4	1	3	15
Chest diseases ICU	1	-	-	-	1
Surgical ICU	2	4			6
Cardiovascular surgery ICU	-	-	1	-	1
Cardiac ICU	1	-	-	-	1
Neurology ICU	1	-	2	-	3
Burn Unit	3	1	1	-	5
Total	32	11	26	7	76

ICU: Intensive Care Unit

The antifungal sensitivity of 92 species of *Candida* species was evaluated by the E-test method. For these species, the geometric mean (GM) Minhibitor concentration of each antifungal was calculated to be 2.2 µg/mL for FLC, 0.6 µg/mL for AMB, 0.6 µg/mL for CAS and 0.1 µg/mL for VRC. The MIC 50 and MIC 90 values of the isolated *Candida* species against

antifungals were presented in Table 3. No cross-resistance was encountered between FLC and VRC. Seven isolates of 19 *C. glabrata* species isolated from various clinical specimens had dose-dependent sensitivity to FLC and two isolates were determined to be resistant. Also, three isolates of 26 *C. parapsilosis* species were reported to be resistant to CAS.

Table 3. *In vitro* susceptibilities of the *Candida* isolates to four antifungal agents (µg/ml)

Species (Number)	AMB			CAS			FLC			VRC		
	MIC range	MIC50	MIC90	MIC range	MIC50	MIC90	MIC range	MIC50	MIC90	MIC range	MIC50	MIC90
<i>C. albicans</i> (20)	0.094-3	0.25	1	0.125-1.5	0.75	1	0.5-6	2	4	0.0012-2	0.38	0.75
<i>C. parapsilosis</i> (9)	0.125-2	0.5	1	0.19-1.5	0.75	1	1-48	3	4	0.125-0.5	0.25	0.38
<i>C. glabrata</i> (8)	0.125-6	0.25	0.75	0.125-1.5	0.75	1.5	2-24	8	24	0.064-2	0.75	1
<i>C. tropicalis</i> (3)	0.25-2	-	-	0.38-0.75	-	-	1-3	-	-	0.19-0.75	-	-
<i>C. dubliniensis</i> (1)	2	-	-	0.5	-	-	-	16	-	0.38-	-	-

AMB; Amphotericin b, CAS; Caspofungin, FLC; Fluconazole, VRC Voriconazol, MIC: Minimal inhibitory concentration, GM; Geometric mean

DISCUSSION and CONCLUSION

The distribution of *Candida* species causing the fungal infection is changing gradually. *C. albicans* were reported to be most frequently isolated in Serbia (10), China (11), Australia (12) and Turkey (13, 14). However, non-*albicans Candida* species is the most commonly isolated fungal species in India (15) and Brazil (16). The differences in regional epidemiological data of these studies could not be explained completely, but it was considered that azole exposure of patients, underlying diseases and different applications in hospitals might have been the cause. In our study, the most commonly isolated species was *C. albicans* from the various clinical samples were followed by *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. pelliculosa*, *C. melibiosica*, respectively. Also, 76 *Candida* species were isolated from the blood samples of the patients diagnosed with candidemia infection in our hospital during this period. Among these species, the most frequently isolated species was *C. albicans* and it was followed by the species of *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis*, respectively. Multicenter epidemiological data in conformance with our result are available (17, 18). According to our hospital data, *C. parapsilosis* was the second most commonly isolated species. *C. parapsilosis* is exogenous pathogenetic species and often isolated from the patients, especially those who use an intravascular device, in intensive care units (19). Also, since these species are frequently isolated from the hands of health care personnel working in the intensive care unit, we suggest that necessary precautions should be taken (20). *C. glabrata* species are the most commonly found species in critically ill elderly patients (21). When various clinical specimens obtained from all intensive care units were examined, 29 *C. glabrata* species were isolated and of these, 17 were isolated from the

clinical samples of patients over 65 years of age. Candidemia cases are important among pediatric patients. Only six *C. albicans* and two *C. parapsilosis* species were isolated from our hospital's pediatric candidemia cases. According to changing candidemia epidemiologies depending on the region, such as Europe (22-24) and America (25, 26), *C. albicans* species are frequent while non-*albicans* species are most commonly isolated in Asian countries (27, 28). Examining the data from pediatric intensive care unit, the study had some limitations. The first of these was it was a single-centre study and the second was the clinical outcome could not be reflected, since it was a laboratory-based study.

The use of urinary catheters and wide-spectrum antibiotics for hospitalized patients in the intensive care unit may cause candiduria. Although the species isolated varies, they were often reported to be *C. albicans* (29, 30). *C. glabrata* and *C. tropicalis* species were reported as the second and third most common species, respectively (31,32). It is noted that the *C. parapsilosis* species attach to plastic materials owing to their extracellular polysaccharide or slime production (33). In this case, from the medical perspective, the prevalence of *C. parapsilosis* was expected to increase concerning the fact that urinary catheters used in intensive care units increase the risk for their colonization or infection. It must be noted that *C. parapsilosis* was isolated only in a 2% ratio, according to our results.

Antifungal sensitivity was determined with the E-test in some *Candida* species. The compatibility ratio of the E-test and broth microdilution was found to be high in various studies conducted (34, 35). The E-test method was also preferred because it was fast and had high repeatability. In a conducted study, when all *Candida* species were evaluated, VRC was sensitive at higher ratios than FLC (36). Further, in our study, no resistance to VRC was detected. In contrast, FLC resistance

was determined in two isolates in the iso-late of *C. glabrata* and dose-dependent resistance was detected in six isolates. The increase in the isolation frequency of *C. parapsilosis* species recently and its in-vitro resistance to CAS was presented in various studies (37, 38). Pfaller et al. (39) reported that the different MIC values shown by the *Candida* species to CAS were secondary to the biological differences among species. In our study, especially in the candidemia cases, the second most commonly isolated species was *C. parapsilosis*. A resistance to CAS was detected in three *C. parapsilosis* species from these isolates, while no resistance was observed among other species.

C. albicans species was revealed to occur at higher rates compared to non-albicans species in our study. The detection of the *C. parapsilosis* species as the second most common species lead to the conclusion that hygienic conditions should be maintained in intensive care units. Moreover, the inability to isolate *C. krusei*, which has azole resistance, demonstrated that no substantial resistance pattern in our hospital. In conclusion, we propose that these data will be useful for the clinicians working in our hospital while selecting the antifungal agents for the treatment and prophylaxis of invasive fungal disease.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

* This study does not require Ethics Committee Approval.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Az-ole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. *Front Microbiol*, 2017; 7: 2173
2. Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Barbuti G, Montagna O, Laforgia N, et al. Candidemia in the neonatal intensive care unit: a retrospective, observational survey and analysis of literature data. *Biomed Res Int*, 2017; 2017: 7901763.
3. Hoffmann-Santos HD, Paula CR, Yamamoto AC, Tadano T, Hahn RC. Six-year trend analysis of nosocomial candidemia and risk factors in two intensive care hospitals in Mato Grosso, midwest region of Brazil. *Mycopathologia*, 2013; 176 (5-6): 409-15.
4. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Messer SA, Hollis RJ. Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *J Clin Microbiol*, 2002; 40 (3): 852-6.
5. Garcia-Effron G, Kontoyiannis DP, Lewis RE, Perlin DS. Caspofungin-resistant *Candida tropicalis* strains causing breakthrough fungemia in patients at high risk for hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008; 52 (11): 4181-83.
6. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 2016; 62 (4): e1-50.
7. Rowen JL, Tate JM. Management of neonatal candidiasis. Neonatal Candidiasis Study Group. *Pediatr Infect Dis J*, 1998; 17 (11): 1007-11.
8. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *Eur J Intern Med*, 2016; 34: 21-28.
9. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG). *Clin Infect Dis*, 46 (12): 1813-21.
10. Arsic Arsenijevic VS, Otašević S, Dragana J, Minic P, Matijasevic J, Medić D, et al. *Candida* bloodstream infections in Serbia: First multicentre report of a national prospective observational survey in intensive care units. *Mycoses*, 2018; 61 (2): 70-8.
11. Guo LN, Xiao M, Cao B, Qu F, Zhan YL, Hu YJ, et al. Epidemiology and antifungal susceptibilities of yeast isolates causing invasive infections across urban Beijing, China. *Future Microbiol*, 2017; 12: 1075-1086.
12. Chapman B, Slavin M, Marriott D, Halliday C, Kidd S, Arthur I, et al. Changing epidemiology of candidemia in Australia. *J Antimicrob Chemother*, 2017; 72 (4): 1103-8.
13. Yeşilkaya A, Azap Ö, Aydın M, Akçil Ok M. Epidemiology, species distribution, clinical characteristics and mortality of candidemia in a tertiary care university hospital in Turkey, 2007-2014. *Mycoses*, 2017; 60 (7): 433-9.
14. Bilgi EA, Sav H, Zararsız G, Özakkaş F, Kiraz N. Distribution of *Candida* species isolated from blood cultures in a university hospital. *Dicle Medi J*, 2015;3 (42): 368-72.
15. Tak V, Mathur P, Varghese P, Gunjijal J, Xess I, Misra MC. The epidemiological profile of candidemia at an Indian trauma care center. *J Lab Physicians*, 2014; 6 (2): 96-101.
16. Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LF, Siqueira RA, et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS One*, 2016; 11 (1): e0146909.

17. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp. among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis*, 2010; 14 (11): e954-66.
18. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 2006; 27 (5): 359-66.
19. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida* parapsilosis, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 2008; 21 (4): 606-25.
20. Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TIE. High frequency of *Candida* parapsilosis on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect*, 2005; 59: 159-62.
21. Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegaki A, Armaganidis A, Dimopoulos G. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. *Clin Interv Aging*, 2013; 8: 1199-208.
22. Lagrou K, Verhaegen J, Peetermans WE, De Rijdt T, Maertens J, Van Wijngaerden E. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007; 26 (8): 541-7.
23. Lovero G, De Giglio O, Montagna O, Diella G, Divenuto F, Lopuzzo M, et al. Epidemiology of candidemia in neonatal intensive care units: a persistent public health problem. *Ann Ig*, 2016; 28 (4): 282-7.
24. Feja KN, Wu F, Roberts K, Loughrey M, Nesin M, Larson E, et al. Risk factors for candidemia in critically ill infants: a matched case-control study. *J Pediatr*, 2005; 147 (2): 156-161.
25. Robinson JA, Pham HD, Bloom BT, Wittler RR. Risk factors for persistent candidemia infection in a neonatal intensive care unit and its effect on mortality and length of hospitalization. *J Perinatol*, 2012; 32 (8): 621-5.
26. Benjamin DK Jr, Stoll BJ, Gantz MG, Walsh MC, Sánchez PJ, Das A et al. Neonatal candidiasis: epidemiology, risk factors, and clinical judgment. *Pediatrics*, 2010; 126 (4): e865-73.
27. Rani R, Mohapatra NP, Mehta G, Randhawa VS. Changing trends of *Candida* species in neonatal septicaemia in a tertiary North Indian hospital. *Indian J Med Microbiol*, 2002; 1 (20): 42-4.
28. Fu J, Ding Y, Ba W, Wang L, Xu S, Qin P, et al. Epidemiology of *Candida albicans* and non-*C. albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in west-ern China. *BMC Infect Dis*, 2017; 17: 329.
29. Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, León C, Palomar M, Jordá R, Carrasco N, et al; EPCAN Study Group. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intensive Care Med*, 2003; 29 (7): 1069-76.
30. Mishra M, Agrawal S, Raut S, Kurhade AM, Powar RM. Profile of yeasts isolated from urinary tracts of catheterized patients. *J Clin Diagn Res*, 2014; 8 (2): 44-6.
31. Lagrotteria D, Rotstein C, Lee CH. Treatment of candiduria with micafungin: a case series. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2007; 18 (2): 149-50.
32. Achkar JM, Fries BC. *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev*, 2010; 23 (2): 253-73.

33. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. Candida biofilms: an update. *Eukaryot Cell*, 2005; 4 (4): 633-8.
34. Arikan S, Gür D, Akova M. Comparison of E-test, microdilution and colorimetric dilution with reference broth macrodilution method for antifungal susceptibility testing of clinically significant Candida species isolated from immunocompromised patients. *Mycoses*, 1997; 40 (7-8): 291-6.
35. Alexander BD, Byrne TC, Smith KL, Hanson KE, Anstrom KJ, Perfect JR, et al. Comparative evaluation of Etest and sensititre yeastone panels against the Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A2 reference broth microdilution method for testing Candida susceptibility to seven antifungal agents. *J Clin Microbiol*, 2007; 45 (3): 698-706.
36. Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-Year analysis of susceptibilities of candida and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol*, 2005; 43 (12): 5848-59.
37. Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smetana J, et al. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med*, 2002; 347 (5): 2020-9.
38. Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of Candida parapsilosis candidemia with caspofungin usage. *J Infect*, 2008; 56 (2): 126-9.
39. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ, et al. Further standardization of broth microdilution methodology for in vitro susceptibility testing of caspofungin against candida species by use of an international collection of more than 3,000 Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*, 2004; 42 (7): 3117-9.

Periferik arter hastalarında yükselmiş serum homositrulin düzeyleri

Elevated serum homocitrulline levels in patients with peripheral artery disease

Duygu ERYAVUZ ONMAZ¹ (ID), Canan AYDOĞAN² (ID), Nazif AYGÜL² (ID), Abdullah SİVRİKAYA¹ (ID), Sedat ABUŞOĞLU¹ (ID), Ali ÜNLÜ¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Periferik arter hastalığı (PAH) arteriyel stenoz veya oklüzyon ile karakterize, kronik, progresif bir hastalıktır. Ateroskleroz PAH'ın en yaygın nedenidir (>90%). Karbamilasyon, proteinlerin post translasyonel modifikasyon mekanizmalarından birisi olup ateroskleroz için yeni bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Bilinen en yaygın karbamilasyon ürünü ise homositrulindir. Bu çalışmamızda PAH'lı hastalar ile benzer yaş, cinsiyet dağılımı ve risk faktörlerine sahip PAH'ı olmayan bireylerde serum homositrulin düzeylerini ölçerek homositrulinin PAH tanısındaki rolünün aydınlatılmasına katkıda bulunmak ve çeşitli biyolojik parametreler ile homositrulin düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmak amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya, 70 PAH'lı hasta ve 65 PAH'ı olmayan birey dahil edilmiştir. Serum homositrulin ve lizin düzeyleri AB Sciex API 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex) likit kromatografi-tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) cihazıyla geliştirmiş olduğumuz geçerli kılınmış yöntemle ölçülmüştür. Hastalara ait çeşitli hematolojik ve biyokimyasal parametreler sırasıyla Beckman Coulter LH 780 ve Beckman Coulter AU 5800 (Beckman Coulter,

ABSTRACT

Objective: Peripheral arterial disease (PAH) is a chronic, progressive disease characterized by arterial stenosis or occlusion. Atherosclerosis is the most common cause of PAH (>90%). Carbamylation is one of the post-translational modification mechanisms of proteins and has been identified as a new risk factor for atherosclerosis. The most common carbamylation product known is homocitrulline. Our aim in this study was to contribute to the elucidation of the role of homocitrulline in the diagnosis of PAH.

Methods: 70 patients with PAH and 65 individuals without PAH were included in the study. Serum homocitrulline and lysine levels were measured by AB Sciex API 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex) liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) device. Various hematological and biochemical parameters of the patients were measured in Beckman Coulter LH 780 and Beckman Coulter AU 5800 (Beckman Coulter, Brea, USA) autoanalyzers, and C-reactive protein (CRP) levels were measured in IMMAGE 800 (Beckman Coulter, Brea, USA) device,

¹Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Konya,
²Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, Konya



İletişim / Corresponding Author : Duygu ERYAVUZ ONMAZ

Selçuk Üni. Tıp Fakültesi, Biyokimya AD Akademi Mah. Yeni İstanbul Cad. No: 313 Alaeddin
Keykubat Kampüsü Selçuklu/Konya - Türkiye E-posta / E-mail : duygu_eryavuz@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 29.08.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 02.11.2021

DOI ID : 10.55051/TurkHijyen.2022.76402

Eryavuz Onmaz D, Aydoğan C, Aygül N, Sivrikaya A, Abuşoğlu S, Ünlü A. Periferik arter hastalarında yükselmiş serum homositrulin düzeyleri. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 103 - 114

Brea, USA) otoanalizörlerinde, C-reaktif protein (CRP) düzeyleri ise IMMAGE 800 (Beckman Coulter, Brea, USA) cihazında ölçülmüştür.

Bulgular: PAH'lı hastaların serum homositrulin konsantrasyonları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.001$). Homositrulinin PAH'ı öngörme gücünü değerlendirmek için Receiver Operating Characteristic (ROC) analizi yapıldığında ise optimal serum homositrulin cut-off değeri, %71.4 sensitivite ve %86.7 spesifiteyle 165.1 $\mu\text{mol} / \text{mol}$ lizin ($p<0.001$) olarak saptanmıştır. Eğri altında kalan alan (AUC) değeri 0.873 olup %95 güven aralığı 0.804-0.925 idi. Spearman korelasyon analizine göre ise serum homositrulin düzeyleri ile üre, CRP, nötrofil lenfosit oranı (NLO) ve platelet lenfosit oranı (PLO) düzeyleri arasında pozitif korelasyon vardı.

Sonuç: Sonuç olarak bulgularımız, homositrulin düzeylerinin PAH'lı hastalarda önemli ölçüde yükseldiğini, homositrulinin PAH'ın erken teşhisinde yararlı bir göstere olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Periferik arter hastalığı, ateroskleroz, enflamasyon, karbamilasyon, homositrulin

respectively.

Results: Serum homocitrulline concentrations of patients with PAH were statistically significantly higher than the control group ($p<0.001$). Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis showed that the optimal serum homocitrulline cut-off value was 165.1 $\mu\text{mol} / \text{mol}$ lysine ($p<0.001$) (sensitivity, 71.4% and specificity, 86.7%) for PAH. The area under curve (AUC) value was 0.873 (95% confidence interval: 0.804-0.925). There was a positive correlation between serum homocitrulline and urea, CRP, the neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and the platelet-lymphocyte ratio (PLR) levels.

Conclusion: Our findings show that homocitrulline levels are significantly elevated in patients with PAH, and homocitrulline may be a useful marker in the early diagnosis of PAH.

Key Words: Peripheral arterial disease, atherosclerosis, inflammation, carbamylation, homocitrulline

GİRİŞ

Periferik arter hastalığı (PAH) kalbi yada beyni besleyen damarlar dışındaki orta ve büyük çaptaki arterlerin daralması yada tıkanıklığı ile karakterize olan progresif bir kardiyovasküler hastalıktır (1). PAH, alt ekstremiteleri üst ekstremitelere damarlarından daha sık etkilemektedir ve alt ekstremitelerde PAH'ı, kladikasyon intermitant olarak bilinen tekrarlayan yorgunluk, kramp hissi ve ağrıya yol açabilmektedir (2). Dünya çapında 200 milyondan fazla bireyin PAH'dan etkilendiği bilinmektedir (3). Gençlerde nispeten daha nadir görülmeyle birlikte prevalansı yaşla birlikte artmaktadır ve özellikle 65 yaş üstü

bireylerde daha yaygındır (4). 50 yaş altı bireylerde prevalansı %4 ile %7 arasında değişirken, 80 yaş üstünde %20'nin üzerine çıkmaktadır. Erkeklerde ise kadınlara göre yaklaşık 1,5 kat daha sık görülmektedir (5). PAH, tromboembolizm, vaskülit ve dejenerasyon gibi birçok nedenle ortaya çıkabilmektedir, bununla birlikte PAH'a neden olan en yaygın durum aterosklerozdur (6). Sigara, alkol, hipertansiyon, böbrek ve kalp yetmezliği, dislipidemi, obezite, hiperhomosisteinemi, yaş, erkek cinsiyet, siyah ırk, yüksek C-Reaktif Protein (CRP) ve fibrinojen düzeyleri PAH için tanımlanmış risk faktörleridir (2, 7). PAH artmış kardiyovasküler, serobrovasküler hastalık, amputasyon gerektiren sekel riski ve mortalite

riskiyle ilişkili progresif, klinik seyri sessiz bir hastalık olduğundan erken tanısına yönelik biyobelirteçlerin saptanması ve tedaviye erken başlanması oldukça önemlidir (8).

Üreminin kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olduğu ortaya konmuş ve ilişkili mekanizmaları araştıran çalışmalar artmış üre düzeylerinin proteinlerde karbamilasyona yol açarak proteinlerin yapısını ve işlevini değiştirdiğini göstermiştir. Ayrıca son yıllarda, aterogenez sürecine dahil olan enflamasyon ve oksidatif stresin artmış protein karbamilasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (9). Karbamilasyon siyanatın primer amin veya tiyol grubu içeren moleküllere bağlanarak karbamil grupları oluşturduğu non-enzimatik bir post translasyonel modifikasyondur (PTM) (10). Protein karbamilasyonu ürenin degradasyonu yada tiyosiyanatın miyeloperoksidaz (MPO) aracılı katabolizmasıyla oluşan izosiyanik asitin proteinlerin serbest amino gruplarına post-translasyonel bağlanmasıyla gerçekleşmektedir (11). MPO aracılı katabolizmayla izosiyanik asitin diğer kaynağı olan tiyosiyanatın serum düzeyleri ise diyet ve sigaradan etkilenmektedir (12). MPO hem içeren bir enzim olup, lökositlerde (hem nötrofil hemde makrofajlarda) en bol bulunan proteindir ve aterosklerotik lezyonlarda katalitik olarak aktiftir. MPO insanlarda aterokleroz ve rupture eğilimli plak gelişimiyle ilişkilidir (13). Homositrolin (karbamil lizin) global olarak protein karbamilasyonunun en güvenilir belirteci olarak kabul edilmekte ve izosiyanik asitin lizin rezidülerinin ϵ -NH₂ gruplarına bağlanmasıyla oluşmaktadır (14). MPO aktivitesi, yüksek üre düzeyleri ve protein karbamilasyonunun ateroskleroz patogenezindeki rolü düşünüldüğünde çalışmamızdaki amacımız en karakteristik karbamilasyon ürünlerinden birisi olan homositrolin düzeylerini PAH'lı hastalarda ve benzer yaş, cinsiyet dağılımı ile risk faktörlerine sahip PAH'ı olmayan bireylerde ölçerek PAH'ın erken tanısındaki ve progresyonundaki rolünün aydınlatılmasına katkıda bulunmak ve serum homositrolin düzeyleri ile çeşitli biyolojik parametreler arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji polikliniğine başvuran PAH teşhisi alan 70 birey ile benzer yaş ve cinsiyet dağılımı ile risk faktörlerine sahip PAH'ı olmayan 65 birey dahil edilmiştir. PAH teşhisi, invaziv periferik anjiyografi, BT/MR anjiyografi, USG ile klinisyenler tarafından konulmuştur. Kontrol grubunda ise PAH tanısı yine klinisyenler tarafından fizik muayane ve el dopleri ile dışlanmıştır. Karaciğer yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği, aktif sistemik enfeksiyöz hastalığı, dekompanse kalp yetmezliği olan bireyler, kanser hastaları, nörolojik, psikiyatrik hastalıkları olan, romatizmal hastalıkları olan bireyler ve son üç ay içerisinde akut koroner sendrom geçiren bireyler çalışmaya alınmamıştır. Tüm katılımcılar çalışma hakkında önceden bilgilendirilerek yazılı onamları alınmıştır. Çalışmamız, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul Başkanlığının 22/04/2020 tarih ve 2020/168 sayılı etik kurul kararıyla onaylanmıştır.

Etik kurul onayını takiben katılımcılardan serum separatör jelli ve EDTA'lı tüplere totalde 6 mL kan örneği alınmış, jelli tüplere alınan kanlar 3500 g'de 10 dakika santrifüj edilerek serum örneklerinde rutin biyokimya tetkikleri analiz edildikten hemen sonra kalan serum örnekleri ayrılmış ve homositrolin, lizin düzeylerinin analizine kadar -80°C'de saklanmıştır. PAH'lı hastalardan alınan kan örnekleri ilk başvuru sırasında yani hastalara herhangi bir tedavi başlanmadan önce alınan kan örnekleriydi.

Rutin Laboratuvar Parametrelerinin Ölçümü

EDTA'lı tüplere alınan tam kan örneklerinde lökosit (WBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT), platelet (PLT), eritrosit dağılım genişliği (RDW), nötrofil (NEU), lenfosit (LYM), monosit (MONO), eozinofil (EOS), bazofil (BA) sayısı Beckman Coulter LH 780 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) otoanalizöründe ticari kitler kullanılarak üretici talimatlarına göre ölçülmüştür. Nötrofil lenfosit (NLO) ve platelet

lenfosit oranları (PLO) ise ölçülen nötrofil, platelet ve lenfosit düzeylerinden hareketle hesaplanmıştır.

Serum örneklerinde ise, kreatinin (CREA), glikoz (GLU), trigliserit (TG), total kolesterol (TC), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT), üre düzeyleri Beckman-Coulter AU 5800 (Beckman Coulter, Brea, USA) cihazında ticari kitler kullanılarak üretici talimatlarına göre ölçülmüştür. C-reaktif protein (CRP) düzeyleri immunofelometrik yöntemle IMMAGE 800 (Beckman Coulter, Brea, USA) cihazında tespit edilmiştir.

Kimyasallar

Kimyasal maddeler; L-Homocitrulline (CAS Numarası: 1190-49-4), L-Citrulline-4,4,5,5-d4 (MDL numarası MFCD09842626), n-butanol (CAS Numarası:71-36-3), hidroklorik asit (CAS Numarası: 7647-01-0), formik asit (CAS Numarası: 64-18-6), L-Lizin (CAS Numarası:56-87-1), L-Lizin-3,3,4,4,5,5,6,6-d8 hidroklorür (MDL numarası MFCD01074062), HPLC analizlerine uygun saflıkta asetonitril (CAS Numarası: 75-05-8), metanol (CAS Numarası: 67-56-1), su (CAS Numarası: 7732-18-5) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) kullanılmıştır.

Serum Homositrulin ve Lizin Düzeylerinin Analizi Ön İşlem Basamakları

Homositrulin ve lizin seviyeleri, Dietzen ve ark. (15). tarafından bildirilen yöntemle ölçülmüştür. Kısaca, 200 µl serum örneği ependorf tüplere alınarak üzerine iç standart olarak 50 µl d4-L-sitrülin, 50 µl d8-L-lizin ve protein presipitasyonu için 850 µl metanol eklenerek 30 saniye vortekslenmiş ve daha sonra bu karışım oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, ependorf tüp 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz cam tüplere alındıktan sonra azot gazı altında 65°C'de buharlaştırılmıştır. Buharlaştırma tamamlandıktan sonra 200 µl 3N HCl/n-butanol karışımı eklenmiş ve tüpler ağız kapalı olarak 65°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra azot gazı ile tekrar buharlaştırılmıştır. Buharlaştırma sonrası, tüplerdeki kalıntılar 200 µl %0,1 formik asit içeren asetonitril: su

(20:80; %v:v) karışımında çözülmüş ve 30 µl'si sisteme enjekte edilmiştir.

Cihaz Koşulları

Serum homositrulin ve lizin düzeyleri AB Sciex API 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex) likit kromatografi-tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) cihazıyla pozitif elektroprey iyonizasyon modunda ölçülmüştür. Kromatografik ayırım, Phenomenex C18 HPLC kolonu (50 mm x 4.6 mm) kullanılarak, mobil faz olarak ise %0,1 formik asit içeren su ve asetonitril karışımının (80:20; %v:v) izokratik elüsyonla uygulanmasıyla sağlanmıştır. Akış hızı 1 mL/dakika olup, kolon fırını sıcaklığı 40°C'ye ayarlanmıştır. Toplam analiz süresi her bir örnek için 5 dakika olmuştur.

Homositrulin, lizin, d4-L-sitrülin ve d8-L-lizin için Q1/Q3 iyon geçişleri sırasıyla 246.0/127.0, 203.0/84.0, 236.0/74.0 ve 211.0/84.0 olmuştur. İyon spray voltajı, interface heater sıcaklığı, iyon kaynağı (GS1), iyon kaynağı (GS2), curtain ve collision gaz değerleri sırasıyla 5000 V, 400°C, 40, 60, 20, 5 psi olarak ayarlanmıştır.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel değerlendirmeler, 'Statistical Packages for the Social Sciences' (SPSS) versiyon 21.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Sürekli değişkenlerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edilmiştir. Ortalama ve medyan değerler arasındaki istatistiksel kıyaslamalar ise sırasıyla Independent Samples t ve Mann Whitney χ^2 -testleri kullanılmıştır. Korelasyonlar, Spearman's korelasyon testi ile değerlendirilmiştir. Parametrik ve non-parametrik değişkenlere ait istatistiksel bulgular sırasıyla ortalama \pm standart sapma ve ortanca (minimum-maksimum) olarak belirtilmiştir. Homositrulinin hastalığı ön görme gücü receiver operating characteristic (ROC) eğrisi kullanılarak eğri altında kalan alandan (AUC) hareketle tespit edilmiştir. Kategorik değişkenler (cinsiyet, sigara, hiperlipidemi, koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve diyabet öyküsü) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığı ise Ki-Kare analizi ile test edilmiştir. $P < 0,05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı farklılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Klinik ve Demografik Bulgular

Çalışmaya, 70 PAH hastası ve 65 kontrol dahil edilmiştir. Grupların yaş ortalaması sırasıyla 63,17±10,60 ve 62,08±9,20 olup, yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p=0.524). Ayrıca hasta ve kontrol

grubunda cinsiyet dağılımları (p=0,841), sigara (p=0,573), hipertansiyon (p=0,855), hiperlipidemi (p=0,857), diyabet (p=0,939), koroner arter hastalığı öyküsü (p=0,604), sistolik (p=0,712) ve diyastolik kan basınçları (p=0,832) bakımından da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Hasta ve kontrol grubuna ait temel klinik ve demografik veriler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. PAH ve kontrol grubuna ait demografik ve temel klinik veriler

Parametreler	PAH (n=70)	Kontrol (n=65)	p
Yaş (yıl)	63,17±10,60	62,08±9,20	0,524
Cinsiyet (Erkek, n (%))	58 (% 82,3)	53 (% 81,5)	0,841
Hipertansiyon n (%)	42 (% 60)	40 (% 61,5)	0,855
Hiperlipidemi n (%)	60 (% 85,7)	55 (% 84,6)	0,857
Diyabet n (%)	34 (% 48,5)	32 (% 49,2)	0,939
KAH n (%)	50 (% 71,4)	49 (% 75,3)	0,604
Sigara n (%)	40 (% 57,1)	34 (% 52,3)	0,573
Sistolik kan basıncı (mmHg)	120,9±14,7	120±11,9	0,712
Diyastolik kan basıncı (mmHg)	72,8±7,5	72,6±6,4	0,832
Tedavi			
Medikal n (%)	5 (%7,1)		
Perkütan girişim n (%)	50 (%71,4)		
Cerrahi n (%)	15 (%21,4)		

KAH, koroner arter hastalığı.

Laboratuvar parametreleri ve homositrulin, lizin düzeyleri

KPAH'lı hasta ve kontrol grubuna ait çeşitli biyolojik parametreler kıyaslandığında PAH'lı hastaların NEU, MONO, RDW, CRP düzeyleri ile NLO'ları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunurken, LYM, HGB ve HDL düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu görülmüştür. İki

grubun ALT, AST, WBC, EOS, BA, HCT, PLT, GLU, üre, CREA, TC, LDL, TG düzeyleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p>0,05).

PAH'lı hastaların serum homositrulin düzeyleri ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0,001). Katılımcılara ait biyolojik parametrelerin ve serum homositrulin düzeyleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. PAH ve kontrol grubuna ait laboratuvar parametrelerinin kıyaslanması

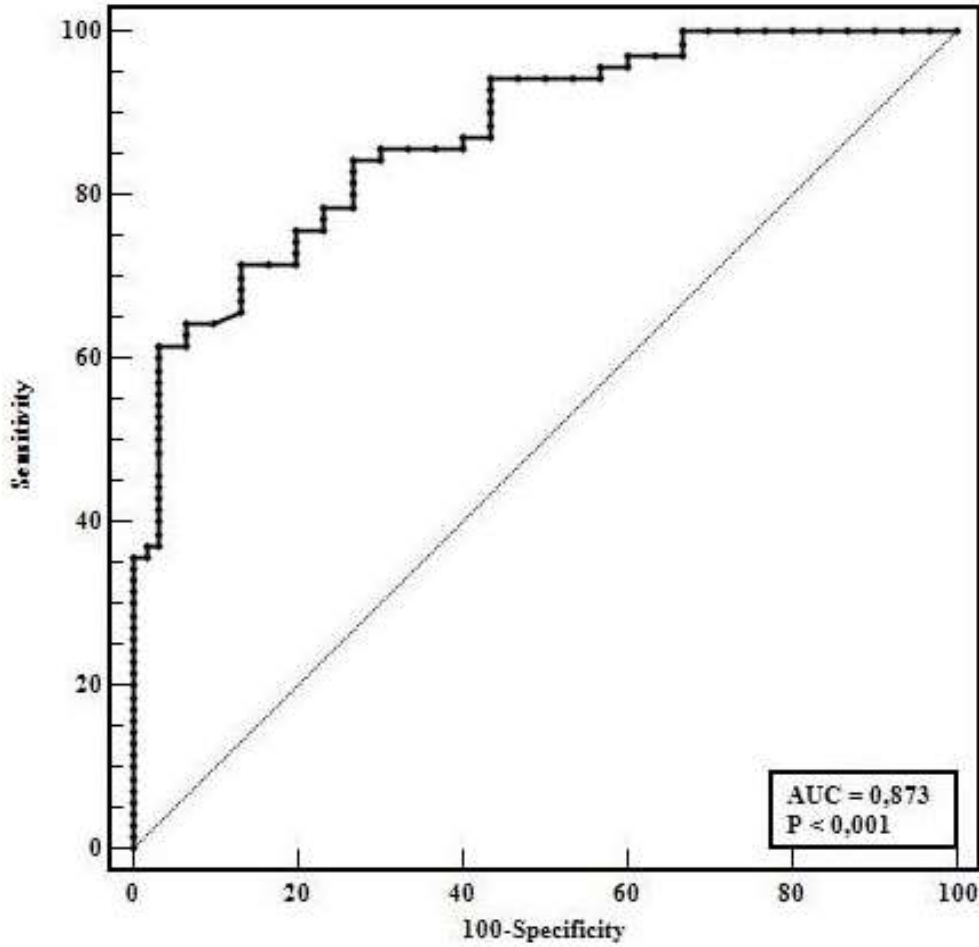
Parametreler	PAH (n=70)	Kontrol (n=65)	p
WBC (10 ⁹ /L)	8,54±1,96	8,0±2,33	0,147
LYM (10 ⁹ /L)	1,9±0,64	2,15±0,75	0,040
NEU (10 ⁹ /L)	5,66±1,76	4,96±1,83	0,025
MONO (10 ⁹ /L)	0,71±0,22	0,61±0,27	0,024
EOS (10 ⁹ /L)	0,22±0,16	0,18±0,10	0,142
BA (10 ⁹ /L)	0,054±0,049	0,048±0,10	0,670
PLO	121,7 (56,9-706,0)	115,5 (49,5-460,1)	0,205
NLO	3,0 (0,93-9,50)	2,3 (1,01-9,20)	0,001
HCT (%)	38,62±6,75	38,90±3,79	0,784
RDW (%)	15,37±2,89	14,44±1,57	0,025
HGB (g/L)	12,86±2,18	14,04±1,58	<0,001
PLT (10 ⁹ /L)	259,51±92,5	255,82±79,6	0,805
ALT (U/L)	23,68±15,85	21,23±13,41	0,407
AST (U/L)	29,75±19,04	22,54±11,45	0,177
GLU (mg/dL)	116,40±49,2	107,60±29,8	0,262
Üre (mg/dL)	31,86±8,36	30,40±6,31	0,302
CREA (mmol/L)	0,88±0,23	0,84±0,17	0,092
TC (mg/dL)	164,41±42,1	173,53±51,4	0,261
TG (mg/dL)	170,44±115,6	161,92±91,9	0,638
LDL (mg/dL)	94,02±35,9	99,1±41,6	0,448
HDL (mg/dL)	36,41±9,27	42,47±9,54	<0,001
CRP (mg/L)	5,6 (1,0-12,2)	4,0 (0,6-8,7)	0,002
Homositrülin (µmol / mol lizin)	285,7±135,2	187,1±61,0	<0,001

ALT, alanin aminotransferaz; AST, aspartat aminotransferaz; BA, bazofil; CREA, kreatinin; CRP, C-reaktif protein; EOS, eozinofil; GLU, glikoz; HCT, hematokrit; HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein; HGB, hemoglobin; LDL, düşük yoğunluklu lipoprotein; LYM, lenfosit; MONO, monosit; NEU, nötrofil; NLO, nötrofil lenfosit oranı; PLO, platelet lenfosit oranları; PLT, platelet; RDW, eritrosit dağılım genişliği; TC, total kolesterol; TG, trigliserit; WBC, lökosit.

Spearman korelasyon analizi, serum homositrulin düzeyleri ile üre ($r=0,394$, $p<0,001$), CRP ($r=0,236$, $p=0,008$), NLO ($r=0,207$, $p=0,018$) ve PLO ($r=0,175$, $p=0,047$) düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu gösterirken diğer biyolojik parametreler ile homositrulin düzeyleri arasındaki korelasyonlar

istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir.

ROC analizi ise PAH için homositruline ait optimal cut-off değerinin %71,4 sensitivite ve %86,7 spesifiteyle $165,1 \mu\text{mol} / \text{mol}$ lizin ($p<0,001$) olduğunu göstermekteydi. AUC değeri 0,873 olup %95 güven aralığı 0,804-0,925 bulunmuştur.



Şekil 1. Serum homositrülin düzeylerinin PAH'ı ön görme gücüne ait ROC eğrisi
AUC, eğri altında kalan alan;
ROC, alıcı işletim karakteristik eğris

TARTIŞMA ve SONUÇ

Proteinler *in vivo* yaşamları boyunca çeşitli PTM'lere uğramaktadır. PTM protein sentezi sırasında veya sonrasında proteinlere fonksiyonel grupların genellikle enzimatik reaksiyonlarla kovalent olarak eklenmesidir ve bu reaksiyonların çoğu polipeptit zincirinin reaktif amino yada karboksil gruplarını içeren reaktif uçlarında gerçekleşir (16). Bilinen 400'den fazla farklı tip PTM vardır ve bu reaksiyonlar şekerler, dikarbonil bileşikleri, reaktif oksijen türevleri gibi küçük metabolitlerle protein zincirindeki amino asitlerin etkileşimleri sonucunda gerçekleşmektedir. Bu modifikasyonlar proteinlerin yapısını, fonksiyonlarını, yaşam sürelerini, protein-protein etkileşmelerini, hücre-hücre ve hücre matriks etkileşmelerini, sinyalizasyon mekanizmalarını, çözünürlüklerini ve lokalizasyonlarını etkilemekte olup proteinlerin davranış ve karakteristikleri üzerinde geniş bir etkiye sahiptir (17). Giderek artan kanıtlar PTM'lerin kanser, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların patogeneze dahil olduğunu göstermektedir (18-21). Bu reaksiyonlardan oksidasyon ve glikasyonun ateroskleroz patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (22, 23). Okside-LDL hücre yüzeyinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu tetikleyerek endotel hücrelerini aktive etmektedir. Bu adezyon molekülleri kemokinlere yanıt olarak endotelyuma göç eden lökositlerin intimaya adezyonuna aracılık etmektedir. Makrofaj aktivasyonunun bir sonucu olarak ise matriks degradasyonuna yol açan proenflamatuvar sitokinlerin salınımı, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) sentezi ve proteolitik enzimlerin üretimi artar. Ayrıca, okside-LDL endotelial nitrik oksit (eNOS)'u inhibe ederek endotelial nitrik oksit (NO) üretimini azaltır. Dolayısıyla, okside-LDL'nin makrofaj scavenger reseptörleri ile etkileşiminin ateroskleroz başlangıcında kilit bir rol oynadığı düşünülmektedir (24). Aynı fenomen glükose-LDL içinde tanımlanmıştır ve ileri glikasyon son ürünlerinin

(AGEs) artmış serum düzeylerinin kardiyovasküler olaylarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. AGE prekürsörleri makrofaj apoptozu ile ilişkilidir ve rüptüre eğilimli aterosklerotik plaklara neden olmaktadır (25).

Son yıllarda, ateroskleroz ve diğer kardiyovasküler hastalıkların patogeneze dahil olduğu gösterilmiş olan diğer önemli bir PTM ise karbamilasyondur. Protein karbamilasyonunun moleküler yaşlanmayla ve birçok patolojik durumla ilişkili olduğu kabul edilmektedir (26). Çalışmamızda PAH'lı hastalarda en karakteristik karbamilasyon ürünü olan homositrulin düzeylerini ölçerek karbamilasyon ile PAH patogenezi arasındaki ilişkiyi ve homositrulinin bu hastalığı tanımladığını araştırarak hedeflemiştir. Elde edilen sonuçlarımız, PAH'lı hastalarda, benzer yaş, cinsiyet dağılımı ve risk faktörlerine sahip kontrol grubuna göre serum homositrulin düzeylerinin yüksek olduğunu göstermiştir (Tablo 2). Homositrulinin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisinin araştırılmasına yönelik kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Wang ve ark. (27) tarafından yapılan çalışmada, karbamilasyonun aterosklerotik plaklarda MPO-bağımlı mekanizmalar aracılığıyla amplifiye edilebileceğini ve serum homositrulin konsantrasyonlarının kardiyovasküler olaylarla pozitif korele olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada, serum homositrulin düzeyleri PAH'ı veya koroner arter hastalığı olan bireylerde kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca PAH'lı hastaların serum homositrulin düzeyleri koroner arter hastalığı olan bireylere göre hafif daha yüksek olduğu görülmüştür. Tang ve ark. (28) ise, kronik sistolik kalp yetmezliği olan hastalarda protein karbamilasyonunun sol ventriküler disfonksiyondan ziyade bozulmuş renal fonksiyonla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Jaisson ve ark. (29) ise koroner arter hastalığı olan bireylerde serum homositrulin düzeylerinin kontrol grubuna [0.21 (0.17-0.25) vs 0.14 (0.10-0.17) mmol/mol lizin, $p < 0.001$] göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğunu, Gensini skoruyla serum homositrulin düzeyleri arasında pozitif korelasyonu

bildirmiştir. Dolayısıyla homositrulin düzeylerinin koroner arter hastalığı boyunca yükseldiğini ve aynı zamanda hastalık şiddetiyle homositrulin düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu belirtmiştir (29). Bizde çalışmamızda, benzer şekilde PAH'lı hastalarda serum homositrulin düzeylerini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulmuş [285,7±135,2 187,1±61,0 µmol / mol lizin, p<0,001]. Dolayısıyla, bulgularımız önceki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür. Jaisson ve ark. (29) homositrulinin koroner arter hastalığını öngörme gücünü değerlendirmek için yaptıkları ROC analizinde homositrulin için optimal cut-off değerini 0,16 mmol / mol lizin (%78,9 sensitivite ve %78,8 spesifiteyle) olarak, AUC değerini ise 0,908 olarak bildirmiştir. Çalışmamızda ise homositrulinin periferik arter hastalığını öngörme gücünü değerlendirmek amacıyla ROC analizi yaptığımızda AUC değerini 0,873 olarak, optimal cut-off değerini ise %71,4 sensitivite ve %86,7 spesifiteyle 165,1 µmol homositrulin/ mol lizin (p<0,0001) olarak tespit edilmiş, %95 güven aralığı 0,804-0,925 bulunmuştur.

Homositrulin ürenin spontan degradasyonu ve da hidrojen peroksit varlığında MPO aracılığıyla tiyosiyattan hareketle sentezlenmektedir. Dolayısıyla homositrulin düzeylerindeki yükseklik bu iki yolla açıklanmaktadır. Çalışma grubumuzdaki tüm hastaların renal fonksiyonları normal olup, serum kreatinin düzeyleri 1,1 mg/dl'nin altında, üre düzeyleri ise 17-50 mg/dl'nin aralığındaydı. Kontrol grubuyla PAH grubunun serum kreatinin ve üre düzeyleri arasındaki farklılıkta istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir (p>0,05). Bu bulgular, PAH'lı hastalardaki yüksek homositrulin düzeylerinin MPO-bağımlı yolakla ilişkili olduğunu düşündürmekteydi. Degranülasyon esnasında nötrofillerden salınan en önemli enzimlerden birisi MPO'dur ve çeşitli çalışmalarla artmış MPO düzeylerinin kardiyovasküler olaylardaki artışla ilgili olduğu gösterilmiştir (30-32). MPO aterosklerotik lezyonlar dahil enflamasyon bölgelerinde yüksek düzeylerde ekspresse edilerek oksidatif hasarı

desteklemektedir. Aterosklerotik lezyonlarda MPO hipokloröz asit oluşturabilmek için ekstraselüler matriksle etkileşime girmektedir. Aterosklerotik lezyonlarda MPO'nun varlığı endotelyum apoptozu, yüzeysel erozyon ve lezyon rüptürü ile ilişkilidir. MPO, bir dizi ROS oluşumunu katalize eden lökosit türevli bir enzim olup doğuştan gelen bağışıklık yanıtının ayrılmaz bir bileşenidir. Ancak, MPO'dan türetilen oksidanların enflamasyon sırasında doku hasarına katkıda bulunduğu dair kanıtlar ortaya çıkmıştır ve MPO katalizli reaksiyonların ateroskleroz patogenezinde dahil olduğu düşünülmektedir (33). Dolayısıyla çalışmamızda, PAH'lı hastalarda yükselmiş homositrulin düzeylerinin aterosklerotik lezyonlarda MPO'nun artmış ekspresyonuna bağlı olarak karbamilasyon reaksiyonlarının amplifikasyonu ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Hızlanmış karbamilasyon reaksiyonları sonucunda lizine ekolarak diğer birçok proteinde karbamilasyona uğramaktadır. Bunlardan karbamilasyon LDL (c-LDL) ve HDL (c-HDL)'nin kardiyovasküler hastalıklardaki rolü kanıtlanmıştır. Son yıllarda, c-LDL'nin lektin benzeri okside LDL reseptörü-1 aktivasyonu yoluyla endotelial disfonksiyonu indüklediği, ROS sentezini arttırdığı ve eNO sentezini azalttığı gösterilmiştir. Dahası, c-LDL'nin makrofaj scavenger reseptörlere bağlanarak kolesterol birikimi ve köpük hücrelerin oluşumuna yol açtığı, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu arttırarak aterojenik özellik gösterdiği düşünülmektedir (9). HDL ateroskleroza karşı koruyucu rol oynasa da *in vitro* kanıtlar c-HDL'nin artmış düzeylerini endotele monositlerin adezyonunu kolaylaştırarak aterosklerotik plakların oluşmasını kolaylaştırabileceğini göstermektedir (34). Şuana kadar tanımlanmış en karakteristik ve en yaygın karbamilasyon ürünü homositrulin olduğundan çalışmamızda total karbamilasyonu değerlendirmek amacıyla homositrulin düzeyleri ölçülmüştür. Dolayısıyla artmış homositrulin düzeyleri diğer proteinlerinde karbamilasyonunun artmış olduğunu ve oluşan karbamilasyon ürünlerinin PAH patogenezinde önemli bir rol oynadığı bulgusunu desteklemektedir.

Sonuç olarak, bulgularımız serum homositrulin düzeylerinin PAH'lı hastalarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek olduğunu, homositrulinin PAH'ın erken teşhisinde yararlı bir markır olabileceğini ve 165,1 μmol / mol lizin düzeyinin PAH hastalığını eşit oranlarda risk faktörlerine sahip fakat PAH'ı olmayan bireylerden ayırt etmede kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak bu konuda daha geniş bir popülasyonda ileri çalışmalara gereksinim vardır. Çalışmamız, PAH'lı hastalarda benzer risk faktörlerine sahip bireylere karşı

homositrulin düzeylerinin çeşitli klinik ve biyolojik parametrelerle birlikte araştırılmasını hedefleyen kapsamlı bir çalışma olması ve homositrulinin kardiyovasküler hastalıkların patogenezindeki rolünün aydınlatılmasına yönelik çalışmalara katkı sağlaması bakımından avantajlıdır, ancak kısıtlı hasta sayısı, MPO aktivitesinin ölçülmemiş olması çalışmamızın dezavantajlarıydı. Daha geniş bir hasta grubunda homositrulin yolağıyla ilgili tüm parametreleri kapsamlı bir şekilde araştırmaya yönelik yeni çalışmalara gereksinim vardır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 22.04.2020 ve Karar No: 2020/168).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Shu J, Santulli G. Update on peripheral artery disease: Epidemiology and evidence-based facts. *Atherosclerosis*, 2018; 275:379-81.
2. Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ Res*, 2015; 116(9):1509-26.
3. Solomon C, Kullo I, Rooke T. Peripheral artery disease. *N Engl J Med*, 2016; 374:861-71.
4. Signorelli SS, Marino E, Scuto S, Di Raimondo D. Pathophysiology of peripheral arterial disease (PAD): a review on oxidative disorders. *Int J Mol Sci*, 2020; 21(12).
5. Eid MA, Mehta KS, Goodney PP. Epidemiology of peripheral artery disease. *Semin Vasc Surg*, 2021; 34(1):38-46.
6. Soyoye DO, Abiodun OO, Ikem RT, Kolawole BA, Akintomide AO. Diabetes and peripheral artery disease: A review. *World J Diabetes*, 2021; 12(6):827-38.
7. Serra R, Abramo A, Ielapi N, Procopio S, Marino P. Environmental pollution and peripheral artery disease. *Risk Manag Healthc Policy*, 2021; 14:2181-90.
8. Kim C, Yang YS, Ryu GW, Choi M. Risk factors associated with amputation-free survival for patients with peripheral arterial disease: a systematic review. *Eur J Cardiovasc Nurs*, 2021; 20(4):295-304.
9. Verbrugge FH, Tang WHW, Hazen SL. Protein carbamylation and cardiovascular disease. *Kidney Int*, 2015; 88(3):474-8.
10. Shi J, van Veelen PA, Mahler M, Janssen GM, Drijfhout JW, Huizinga TW, et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmun Rev*, 2014; 13(3):225-30.
11. Delanghe S, Delanghe JR, Speeckaert R, Van Biesen W, Speeckaert MM. Mechanisms and consequences of carbamylation. *Nat Rev Nephrol*, 2017; 13(9):580-93.
12. Delanghe S, Delanghe JR, Speeckaert R, Van Biesen W, Speeckaert MM. Mechanisms and consequences of carbamylation. *Nat Rev Nephrol*, 2017; 13(9):580-93.
13. Teng N, Maghzal GJ, Talib J, Rashid I, Lau AK, Stocker R. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep*, 2017; 22(2):51-73.
14. Jaisson S, Desmons A, Doué M, Gorisse L, Pietrement C, Gillery P. Measurement of homocitrulline, a carbamylation-derived product, in serum and tissues by LC-MS/MS. *Curr Protoc Protein Sci*, 2018; 92.
15. Dietzen DJ, Weindel AL, Carayannopoulos MO, Landt M, Normansell ET, Reimschisel TE, et al. Rapid comprehensive amino acid analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: comparison to cation exchange with post-column ninhydrin detection. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008; 22(22):3481-8.
16. Chen L, Kashina A. Post-translational modifications of the protein termini. *Front Cell Dev Biol*, 2021; 9:719590.
17. Ramazi S, Zahiri J. Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database*, 2021; 2021:1-20.
18. Zhang H, Han W. Protein post-translational modifications in head and neck cancer. *Front Oncol*, 2020; 10(2124).
19. Chatterjee B, Thakur SS. Investigation of post-translational modifications in type 2 diabetes. *Clin Proteomics*, 2018; 15(32):1-11.

20. Gupta R, Sahu M, Srivastava D, Tiwari S, Ambasta RK, Kumar P. Post-translational modifications: Regulators of neurodegenerative proteinopathies. *Ageing Res Rev*, 2021; 68:101336.
21. Marquez J, Lee SR, Kim N, Han J. Post-translational modifications of cardiac mitochondrial proteins in cardiovascular disease: not lost in translation. *Korean Circ J*, 2016; 46(1):1-12.
22. Gao S, Zhao D, Wang M, Zhao F, Han X, Qi Y, et al. Association between circulating oxidized LDL and atherosclerotic cardiovascular disease: a meta-analysis of observational studies. *Can J Cardiol*, 2017; 33(12):1624-32.
23. Zimmermann R, Panzenböck U, Wintersperger A, Levak-Frank S, Graier W, Glatter O, et al. Lipoprotein Lipase Mediates the Uptake of Glycated LDL in Fibroblasts, Endothelial Cells, and Macrophages. *Diabetes*, 2001; 50(7):1643-53.
24. Poznyak AV, Nikiforov NG, Markin AM, Kashirskikh DA, Myasoedova VA, Gerasimova EV, et al. Overview of OxLDL and its impact on cardiovascular health: focus on atherosclerosis. *Front Pharmacol*, 2020; 11:613780.
25. de Vos LC, Lefrandt JD, Dullaart RP, Zeebregts CJ, Smit AJ. Advanced glycation end products: An emerging biomarker for adverse outcome in patients with peripheral artery disease. *Atherosclerosis*, 2016; 254:291-9.
26. Gorisse L, Pietrement C, Vuiblet V, Schmelzer C, Köhler M, Duca L, et al. Protein carbamylation is a hallmark of aging. *Proc Natl Acad Sci*, 2015; 113:201517096.
27. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Hörkkö S, Barnard J, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med*, 2007; 13(10):1176-84.
28. Tang WHW, Shrestha K, Wang Z, Borowski AG, Troughton RW, Klein AL, et al. Protein carbamylation in chronic systolic heart failure: relationship with renal impairment and adverse long-term outcomes. *J Card Fail*, 2013; 19(4):219-24.
29. Jaisson S, Kerkeni M, Santos-Weiss IC, Addad F, Hammami M, Gillery P. Increased serum homocitrulline concentrations are associated with the severity of coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med*, 2015; 53(1):103-10.
30. Ramachandra CJA, Ja KPMM, Chua J, Cong S, Shim W, Hausenloy DJ. Myeloperoxidase as a multifaceted target for cardiovascular protection. *antioxidants & redox signaling*, 2019; 32(15):1135-49.
31. Kimak E, Zięba B, Duma D, Solski J. Myeloperoxidase level and inflammatory markers and lipid and lipoprotein parameters in stable coronary artery disease. *Lipids Health Dis*. 2018;17(1):71.
32. Roth Flach RJ, Su C, Bollinger E, Cortes C, Robertson AW, Opsahl AC, et al. Myeloperoxidase inhibition in mice alters atherosclerotic lesion composition. *PLoS One*, 2019; 14(3):e0214150.
33. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005; 25(6):1102-11.
34. Chen Z, Ding S, Wang YP, Chen L, Mao JY, Yang Y, et al. Association of carbamylated high-density lipoprotein with coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus: carbamylated high-density lipoprotein of patients promotes monocyte adhesion. *J Transl Med*, 2020; 18(1):460.

Geriatrik hastalarda idrar yolu enfeksiyonları ve etkenlerinin değerlendirilmesi

Evaluation of urinary tract infections and causative agents in geriatric patients

Müge AYHAN¹ (ID), Ayşe KAYA KALEM² (ID), İmran HASANOĞLU² (ID), Bircan KAYAASLAN² (ID), Rahmet GÜNER² (ID)

ÖZET

Amaç: İdrar yolu enfeksiyonları yaşlı hastalarda ikinci en sık görülen ve bakterilere bağlı gelişen bir hastalıktır. İmmün sistemin yaşlanması, eşlik eden hastalıklar ve çeşitli fizyolojik değişiklikler nedeni ile yaşla birlikte bu tür enfeksiyonlara yatkınlık gelişebilmektedir. Ampirik tedavi seçimi için bu hasta grubunda üreyen etkenlerin ve direnç durumunun bilinmesi önemlidir. Bu çalışmada, kliniğimize idrar yolu enfeksiyonu nedeni ile yatırılan hastalarda hasta özellikleri, üreyen etkenler ve bu etkenlerin direnç durumlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Ankara Şehir Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği'ne Mart 2019-Mart 2020 tarihleri arasında idrar yolu enfeksiyonu tanısı ile yatırılan 65 yaş üzeri hastalar demografik özellikleri, kültür sonuçları ve etkenlerin direnç durumu yönüyle geriye dönük olarak hasta yatış bilgileri, hasta dosyaları ve hastane bilgi işlem sistemi üzerindeki tüm tıbbi kayıtları incelenerek değerlendirilmiştir.

ABSTRACT

Objective: Urinary tract infections are the second most common disease in elderly patients and the most common disease related to bacteria. Due to the immune senescence, comorbid diseases and various physiological changes, susceptibility to such infections may develop with age. It is important to know the common pathogens and resistance profile in this patient population for empirical treatment selection. We aimed to evaluate patient characteristics, causative microorganisms and their resistance in elderly patients hospitalized in our clinic due to urinary tract infection.

Methods: Patients who were older than 65 years and hospitalized in Ankara City Hospital Infectious Diseases and Clinical Microbiology clinic with a diagnosis of urinary tract infection between March 2019 and March 2020 were retrospectively evaluated. Hospitalization information, patient files and all medical records on the hospital information processing system in terms of demographic characteristics, culture results and resistance status of the pathogens were screened.

¹Ankara Şehir Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara
²Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Müge AYHAN

Ankara Şehir Hastanesi Nöroloji Ortopedi Binası Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği B1 Katı Bilkent / Çankaya / Ankara - Türkiye E-posta / E-mail : dr.mugeayhan@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 05.02.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 09.03.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.19971

Ayhan M, Kaya Kalem A, Hasanoğlu İ, Kayaaslan B, Güner R. Geriatrik hastalarda idrar yolu enfeksiyonları ve etkenlerinin değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 115 - 122

Bulgular: Çalışmaya toplam 118 hasta dahil edilmiş olup hastaların yaş ortalaması $74,65 \pm 7,4$ olarak belirlenmiştir. Komorbid hastalıklar olarak en sık hipertansiyon (%41,5), diyabet (%30,0) ve demans (%18,6) izlenmiştir. Üriner girişim öyküsü (%11,0) hastalarda en sık görülen komplike edici faktör olarak bulunmuştur. Hastalarda üreyen etkenlerin çoğunluğu (%86,0) Gram negatif bakteri olmuştur. En sık etkenler sırasıyla *Escherichia coli* (*E. coli*) (%59,0) ve *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (%17,0) olarak izlenirken, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) sıklığı *E. coli*'de %56,0 oranında, *K. pneumoniae*'da %40,0 ve karbapenem direnci *K. pneumoniae* suşlarında %20,0 olarak izlenmiştir. Hastaların %12,7'sinde 28. günde enfeksiyona bağlı mortalite izlenmiştir. Mortalite izlenen ve izlenmeyen hastalar direnç varlığı (GSBL/karbapenem direnci) ve etken dağılımı açısından karşılaştırılmış ve iki grup arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır (sırasıyla $p=0,573$ ve $p=0,161$).

Sonuç: İdrar yolu enfeksiyonları yaşlı popülasyonda en sık bakteriyemi nedenidir ve sıklıkla yatış gerektirir. Yaşlılık üriner inkontinans, idrar retansiyonu, üriner kateterizasyon gerektiren hastane yatışları, bakımevinde kalma ve immün yaşlanma gibi nedenlerle idrar yolu enfeksiyonu gelişimi için başlıca risk faktörlerinden biridir. Bunun yanında giderek artan direnç ile birlikte tedavisinde güçlük yaşanabilmekte ve önemli morbidite ve mortaliteye neden olabilmektedir. Çalışmamızda izole edilen etkenlerde direnç oldukça yüksek oranda izlenmiştir. Ampirik tedavi seçiminde bu durum göz önünde bulundurulmalıdır. Her merkez kendi özel hasta popülasyonlarında izlenen enfeksiyon etkenlerini ve direnç profilleri takibini periyodik olarak gerçekleştirmeli ve hem direnci azaltmak hem de etkin tedavi sağlamak amacı ile kendi çözüm stratejilerini oluşturmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Üriner sistem enfeksiyonları, *E. coli*, *K. pneumoniae*, antimikrobiyal direnci, geriatrik

Results: A total of 118 patients were included in the study and the mean age of the patients was 74.65 ± 7.4 . hypertension (41.5%), diabetes (30.0%) and dementia (18.6%) were the most common comorbid diseases. Urinary procedure history (11.0%) was the most common complicating factor in the patients. Majority (86.0%) of the causative agents were Gram-negative bacteria. *Escherichia coli* (*E. coli*) (59.0%) and *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (17.0%) were the most commonly isolated pathogens, respectively. While extended spectrum beta-lactamase (ESBL) was observed as 56.0% in *E. coli* and 40.0% in *K. pneumoniae*, carbapenem resistance was observed at a rate of 20.0% in *K. pneumoniae* strains. Patients with and without mortality were compared in terms of the presence of resistance (ESBL / carbapenem resistance) and distribution of the infectious agents, and there was no statistically significant difference between the two groups ($p=0.573$ and $p=0.161$, respectively).

Conclusion: Urinary tract infections are the most common cause of bacteremia in the elderly population and often require hospitalization. Aging is one of the major risk factors for the development of urinary tract infections due to reasons such as urinary incontinence, urinary retention, hospitalizations requiring urinary catheterization, staying in a nursing home and immune aging. It can cause significant morbidity and mortality. In our study, resistance rates were high in the isolated specimens. This should be take into consideration during choosing empiric treatment. Each center should periodically monitor infectious agents and their resistance profiles which observed in their specific patient populations and should develop their own solution strategies to reduce antimicrobial resistance and provide effective treatment to their patients.

Key Words: Urinary tract infections, *E. coli*, *K. pneumoniae*, antimicrobial resistance, geriatric

GİRİŞ

İdrar yolu enfeksiyonları, erişkinlerde en sık izlenen bakteriyel enfeksiyon sebebi olup, her iki cinsiyet ve tüm yaş gruplarında izlenebilmektedir. Dünyada yılda yaklaşık 150 milyon üriner sistem enfeksiyonu gelişirken tedavi maliyetinin de 150 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (1). Geriatrik popülasyonda üriner enfeksiyonlar ikinci en sık görülen enfeksiyöz olan ve ayaktan başvuran hastalarda bakterilere bağlı gelişen en sık hastalıktır (2). Bağışıklık sisteminin yaşlanması, eşlik eden hastalıklar ve çeşitli fizyolojik mekanizmalardaki bozulmalar nedeni ile geriatrik yaş grubunda çeşitli enfeksiyonlara karşı bir yatkınlık gelişebilmektedir (3,4). Yaşlanma genitoüriner anatomiye, mesane boşaltımı fizyolojisini de bozarak üriner enfeksiyonlara yatkınlığı arttırabilmektedir (4). Ampirik tedavi seçiminde üreyen etkenlerin ve direnç profillerinin bilinmesi, doğru tedavi seçeneklerini belirlemek için önemlidir.

Bu çalışmada, kliniğimize idrar yolu enfeksiyonu nedeni ile yatırılan 65 yaş üstü hastalarda klinik özelliklerinin, üreyen etkenlerinin ve etkenlerde direnç durumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara Şehir Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği'ne Mart-2019-Mart 2020 tarihleri arasında yatırılan hastalar geriye dönük olarak değerlendirilmiş ve idrar yolu enfeksiyonu tanısı ile yatırılan 65 yaş üstü hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

Halsizlik veya 38 °C üzeri ateş, idrara sıkışma hissi, disüri veya suprapubik ağrı varlığı, idrar kaçırma hissi, idrar sıklığında artış, bilinçte kötüleşme ve bakım ihtiyacında artış ve idrarda lökositüri ve üriner kateteri olmayan hastada 10^3 cfu/ml, üriner kateteri olan hastada 10^5 cfu/ml ve iki türden fazla olmayan üreme varlığı idrar yolu enfeksiyonu olarak kabul edilmiştir (5,6). Ateş, hipotansiyon, oral alımda azalma, bilinç değişikliği, performans durumunda

öncekine göre gerileme gibi bulgulardan en az birinin varlığı halinde hastalar yatırılarak izlenmiştir.

Tüm idrar izolatlarında etkenler ve antimikrobiyal duyarlılık testleri merkez mikrobiyoloji laboratuvarında Vitek® 2 (bioMerieux/ France) tam otomatize sistemi ile çalışılmış ve antibiyotik duyarlılığı The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir (7).

Hastalara ait yaş, cinsiyet, bilinen ek hastalıklar gibi demografik bilgileri, üreyen etken ve direnç durumu gibi bilgileri bilgi işlem sistemi ve hasta dosyaları üzerinden temin edilerek hasta bilgi formlarına bir araştırmacı tarafından kaydedilmiştir.

Bu çalışma Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay Tarihi: 18.09.2019, Karar Sayısı: 96). Retrospektif bir çalışma olması nedeni ile hastalardan bilgilendirilmiş gönüllü olur formu alınmamıştır.

İstatistiksel analiz

Çalışma için istatistiksel analiz SPSS versiyon 26.0.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Hastalara ait yaş, cinsiyet, ek hastalıklar, üriner enfeksiyon için komplike edici faktörler, hastada gelişen sonuç, 28.günde tüm nedenlere bağlı mortalite oranları, üreyen etkenler, enterik etkenlerde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) ve karbapenem direnci sayısı ve yüzdesi olarak bildirilmiştir. Direnç izlenen ve izlenmeyen hastalar mortalite açısından Ki-kare testi ile karşılaştırılmıştır. Analizlerde $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Toplam 118 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların %51,6'sı erkek olup, yaş ortalaması 74,65 \pm 7,4 olarak bulunmuştur. En sık komorbid hastalıklar hipertansiyon (%41,5, n=49), diyabet (%30,0, n=36) ve demans (%18,6, n=22) olarak tespit edilmiştir. Hastaların %5,0'inin bakımevinde kalma öyküsü izlenmiştir.

Hastalarda üriner sistem enfeksiyonu için en sık

komplike edici faktörler üriner girişim öyküsü 13 (%11,0) olarak bulunmuştur. Hastaların çoğunda (%72,0) yatış esnasında ateş izlenmiş olup hastaların %29,0'unda bakteriyemi görülmüştür. Hastaların çoğu 106 (%89,0) tedavisi tamamlanıp taburcu edilmiştir. Hastaların üçünde (%2,5) serviste yatış sırasında ölüm izlenmiştir. 28. günde tüm nedenlere bağlı mortalite 16 (%13,5) bulunmuştur (Tablo 1).

Hastaların 15'inde idrar kültüründe üreme belirlenmemiştir. Üreme olan hastalarda en sık izlenen etkenler sırası ile *E. coli* (%58,4, n=69) ve *K.*

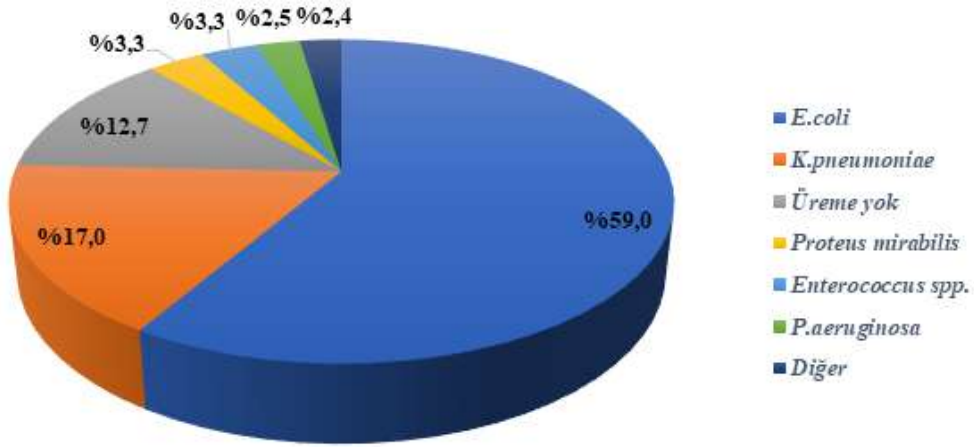
pneumoniae (%17,0, n=20) olarak izlenmiştir (Şekil 1).

GSBL sıklığı *E. coli*'de %56,0, *K. pneumoniae*'da %40,0 olarak izlenirken, karbapenem direnci ise *K. pneumoniae*'de %20,0 oranında görülmüştür.

Mortalite izlenen ve izlenmeyen hastalar direnç varlığı (GSBL/karbapenem direnci) ve etken dağılımı açısından karşılaştırılmış ve iki grup arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir (sırasıyla p=0,573 ve p=0,161) (Tablo 2).

Tablo 1. Geriatrik üriner sistem enfeksiyonu bulunan hastaların özellikleri

Kadın	57 (%48,3)
Erkek	61 (%51,6)
Yaş (Ortalama ± SS)	74,65 ± 7,4
Komorbid Hastalıklar	103 (%87,0)
Hipertansiyon	49 (%41,6)
Diyabet	36 (%30,0)
Demans	22 (%18,6)
KOAH	18 (%15,2)
Koroner Arter Hastalığı	17 (%14,4)
Kalp Yetmezliği	15 (%12,7)
Nörolojik hastalık	13 (%11,0)
Üriner dışı malignite	7 (%5,9)
KBH	6 (%5,0)
Romatolojik hastalık	6 (%5,0)
Bakımevinde kalma	6 (%5,0)
Üriner enfeksiyon öyküsü	37 (%31,0)
Komplike edici faktör	
Üriner girişim öyküsü	13 (%11,0)
Benign Prostat Hiperplazisi (BPH)	12 (%10,0)
Üriner kateter varlığı	9 (%7,6)
Üriner malignite	8 (%6,7)
Antibiyotik kullanım öyküsü	5 (%4,2)
Rekürren üriner sistem enfeksiyonu (ÜSE)	4 (%3,3)
Nefrolityazis	3 (%2,5)
Böbrek nakli	3 (%2,5)
Yatışta ateş	86 (%72,0)
Bakteriyemi varlığı	35 (%29,0)
28. günde tüm nedenlere bağlı mortalite	16 (%13,5)



Şekil 1. Hastalarda üreyen etkenlerin dağılımı

Tablo 2. Mortalite izlenen ve izlenmeyen hastalarda direnç durumu ve etken dağılımının değerlendirilmesi

	Mortalite izlenen hastalar	Mortalite izlenmeyen hastalar	p değeri
Direnç varlığı (GSBL/Karbapenem direnci)	10	6	0,573
Etken dağılımı			
<i>E. coli</i>	8	61	0,161
<i>K. pneumoniae</i>	4	16	
Üreme yok	2	13	
<i>Proteus mirabilis</i>	0	4	
<i>Enterococcus spp.</i>	2	2	
<i>P. aeruginosa</i>	0	3	
Diğer	0	3	

TARTIŞMA ve SONUÇ

Sosyoekonomik ve tıp alanında yaşanan gelişmeler insanlarda beklenen yaşam süresinde artışla sonuçlanmıştır. Yaşlı nüfusun artışı ile birlikte yaşlanmaya bağlı gelişebilecek sağlık sorunlarında da artış izlenmiştir (8). Üriner sistem enfeksiyonları,

yaşlılarda en sık bakteriyemi nedeni iken yüksek oranda da yatış gerektirir (9). Amerika Birleşik Devletleri'nde geriatrik popülasyonda üriner sistem enfeksiyonları her yıl yedi milyon poliklinik başvurusu, bir milyon acil servis başvurusu ve toplam hastaneye yatışların %25,0'ini oluşturarak 100.000 hastane yatışından sorumludur.

Üriner inkontinans, idrar retansiyonu, üriner kateterizasyon gerektiren hastane yatışları, bakımevinde kalma ve immün yaşlanma gibi nedenlerle yaşlanma üriner enfeksiyon gelişimi için başlıca risk faktörlerinden biridir (10). Yapılan bir çalışmada, toplam 246 hasta retrospektif olarak değerlendirilmiş ve geriatrik üriner sistem enfeksiyon gelişimi için risk faktörleri rekürren üriner sistem enfeksiyonu öyküsü, üriner kateter bulunması, son 12 ay içinde antibiyotik kullanımı öyküsü ve bası yarası varlığı olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada demans, diyabet, prostat hipertrofisi, üriner inkontinans ve üriner kateter kullanımı gibi çeşitli kronik hastalık ve durumlar çalışma popülasyonunda sık izlenmiştir (11). Çalışmamızda hastaların %87'sinde en az bir komorbid hastalık görülmüştür. En sık izlenen komorbid hastalıklar sırasıyla hipertansiyon (%41,6) ve diyabet (%30,0) olarak bulunmuştur. Komplike edici faktörler olan ve üriner sistem enfeksiyonuna artmış yatkınlık ile ilişkili olan üriner girişim öyküsü, BPH ve üriner kateter varlığı hastalarımızda da sık izlenmiştir.

Üriner sistem enfeksiyon öyküsü bu hasta grubunda enfeksiyon gelişimi için en güçlü risk faktörlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda da üriner sistem enfeksiyonu ile izlenen geriatrik hasta grubunda üriner enfeksiyon öyküsünün sıklıkla izlendiği bildirilmiştir (3,12,13). Bu çalışmalarla benzer şekilde çalışmamızda da hastaların %31,0'inde üriner sistem enfeksiyon öyküsü izlenmiştir.

Yapılan birçok çalışmada, yaşlı popülasyonda ateş üriner sistem enfeksiyonunda en sık izlenen belirti olarak bildirilmiştir (2,9,14). Çalışmamızda da uyumlu şekilde hastaların büyük çoğunluğunda (%72,0) yatış esnasında ateş şikâyeti görülmüştür.

Yaşlı popülasyonda en sık izlenen enfeksiyon etkeni sıklıkla *E. coli* ve *K. pneumoniae* olmuştur. Çalışmalarda da sıklıkla aynı etken bildirilmiştir (1,11). Mahes ve ark. (2), yaptığı çalışmada etkenlerin %77,0'si *E. coli* olarak izlenirken bu suşların %56,2'sinde GSBL bildirilmiştir. Çalışmalarda üriner sistem enfeksiyonu etkenlerinde GSBL sıklığı

%26,6 ve %48,3 gibi değişen oranlarda bildirilmiştir (15,16). Çalışmamızda da en sık izlenen etkenler *E. coli* ve *K. pneumoniae* olarak izlenirken GSBL, *E. coli* suşlarında %56,0 oranında *K. pneumoniae* suşlarında %40,0 oranında görülmüştür. Karbapenem direnci ise sadece *K. pneumoniae* suşlarında ve %20,0 oranında tespit edilmiştir. GSBL oranı literatürdeki çalışmalara göre yüksek olduğu bulunmuştur. Bu durumun, hastaların %31,0'inde üriner enfeksiyon öyküsü bulunması nedeni ile öncesinde antibiyotik kullanma öyküsünün bulunması ve toplumda antibiyotik kullanımının sıklığı nedeni ile olabileceği düşünülmüştür (17,18).

Genel popülasyonda yapılan bir çalışmada, GSBL üreten ve üretmeyen üriner enfeksiyonlar arasında kısa süreli ve uzun süreli mortalite açısından istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir (19). Yaşlı hastalarda yapılan ve idrar yolu enfeksiyonlarını değerlendiren toplam 204 hasta içeren bir çalışmada, hastaların %17,7'sinde herhangi bir çoklu antibiyotik direnci izlenmiş ve hastaların %17,6'sında ölüm görülmüştür. Çoklu antibiyotik direnci varlığı hastanede kalış süresinde artışa neden olurken mortalite ile istatistiksel bir ilişki izlenmemiştir (20). Çalışmamızda da mortalite izlenen ve izlenmeyen hastaların direnç durumu ve etken dağılımı yönü ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Retrospektif bir çalışma oluşu, çalışmaya dahil edilen hasta sayısının az oluşu, bu hasta grubunda risk faktörlerinin diğer gruplar ile karşılaştırılarak değerlendirilmemiş oluşu, mortalite izlenen hasta sayısı az olduğundan direnç gruplarına göre etkin şekilde karşılaştırılmaması çalışmanın başlıca kısıtlılıklarıdır. Ancak üriner enfeksiyonun sık görüldüğü geriatrik popülasyonda özellikle üreyen etkenlerin ve direnç profillerinin bilinmesi seçilecek ampirik tedavilerin uygunluğunu arttıracaktır. İzlenen direnç oranlarının yüksek olması nedeni ile antibiyotik kullanım politikalarının her hastanede gözden geçirilmesi, üçüncü kuşak sefalosporinlerin ve karbapenemlerin gereksiz kullanımından kaçınılması

gibi müdahaleler ve dirençli üremelerin düzenli sürveyansı ile bu direnç artışının kontrol altına alınması bir toplum sağlığı acilidir. Hastanemizde hem geriatrik hem de genel popülasyonda üriner sistem enfeksiyonu önleme demetlerine uyum ile üriner kateteri bulunan hastalarda kateter endikasyon durumunun yerinde ve sürekli denetlenmesi ve üriner enfeksiyon oranlarının azalması amaçlanmaktadır. Hastanemizde izlenen

GSBL ve karbapenem direnci, özellikle geriatrik ve bahsedilen riskli gruplarda ampirik tedavi başlanırken göz önünde bulundurulmaktadır. Etken ve direnç izlemlerinin her merkezde periyodik olarak değerlendirilerek sürdürülmesi ve hizmet verdiği hasta popülasyonuna göre bu direnç durumu göz önünde bulundurularak kendi çözüm ve yaklaşım önerilerini geliştirmesi gerekmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih: 18.09.2019 ve Karar No: 96).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Kadanalı A. Üriner sistem enfeksiyonları. *Eurasian J Med*, 2006; 38: 119-23.
2. Mahesh E, Medha Y, Indumathi VA, Kumar PS, Khan MW, Punith K. Community-acquired urinary tract infection in the elderly. *Br J Medical Pract*, 2011; 4 (1): 6-9.

3. Alpay Y, Aykin N, Korkmaz P, Gulduren HM, Caglan FC. Urinary tract infections in the geriatric patients. *Pakistan J Med Sci*, 2018; 34: 67-72.
4. Yoshikawa TT, Norman DC. Geriatric infectious diseases: Current concepts on diagnosis and management. *J Am Geriatr Soc*, 2017; 65: 631-41.

5. Girard R, Gaujard S, Pergay V, Pornon P, Martin Gaujard G, Vieux C, et al. Controlling urinary tract infections associated with intermittent bladder catheterization in geriatric hospitals. *J Hosp Infect*, 2015; 90: 240-7.
6. Urinary tract infection (Catheter-associated urinary tract infection [CAUTI] and non catheter-associated urinary tract infection [UTI]). <https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/7pscscauticurrent.pdf>, (Erişim tarihi : 01.02.2021).
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. <http://www.eucast.org/>, (Erişim tarihi: 22.02.2021).
8. Demiray T, Yılmaz K, Aydemir Ö, Köroğlu M, Özbek A, Halis F, et al. Microbiological evaluation of urinary tract infections in elderly men with benign prostatic hyperplasia. *Turk J Geriatr*, 2016; 19 (3): 183-8.
9. Rebelo M, Pereira B, Lima J, Decq-Mota J, Vieira JD, Costa JN. Predictors of in-hospital mortality in elderly patients with bacteraemia admitted to an internal medicine ward. *Int Arch Med*, 2011; 4: 33.
10. Ruben FL, Dearwater SR, Norden CW, Kuller LH, Gartner K, Shalley A, et al. Clinical infections in the noninstitutionalized geriatric age group: methods utilized and incidence of infections. The Pittsburgh Good Health Study. *Am J Epidemiol*, 1995; 141 (2): 145-57.
11. Wojszel ZB, Toczyńska-Silkiewicz M. Urinary tract infections in a geriatric sub-acute ward-health correlates and atypical presentations. *Eur Geriatr Med*, 2018; 9: 659-67.
12. Girard R, Gaujard S, Pergay V, Pornon P, Martin-Gaujard G, Bourguignon L. Risk factors for urinary tract infections in geriatric hospitals. *J Hosp Infect*, 2017; 97: 74-8.
13. Cortes-Penfield NW, Trautner BW, Jump RLP. Urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria in older adults. *Infect Dis Clin North Am*, 2017; 31: 673-88.
14. Yahav D, Eliakim-Raz N, Leibovici L, Paul M. Bloodstream infections in older patients. *Virulence*, 2016; 7: 341-52.
15. Tankhiwale SS, Jalgaonkar SV, Ahamad S, Hassani U. Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates. *Indian J Med Res*, 2004; 120: 553-6.
16. Khurana S, Taneja N, Sharma M. Extended spectrum beta lactamases mediated resistance in urinary tract isolates of family enterobacteriaceae. *Indian J Med Res*, 2002; 116: 145-9.
17. Yıldız İ, Varkal MA, Ünüvar E. Cephalosporin antibiotics and antibiotic resistance in three decades. *J Child*, 2014; 14 (1): 22-7.
18. Zhu FH, Rodado MP, Asmar BI, Salimnia H, Thomas R, Abdel-Haq N. Risk factors for community acquired urinary tract infections caused by extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in children: a case control study. *Infect Dis (Lond)*, 2019; 51: 802-9.
19. Richelsen R, Smit J, Schönheyder HC, Laxsen Anru P, Gutiérrez-Gutiérrez B, Rodríguez-Báño J, et al. Outcome of community-onset ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia and urinary tract infection: A population-based cohort study in Denmark. *J Antimicrob Chemother*, 2020; 75: 3656-64.
20. Ioannou P, Plexousaki M, Dimogerontas K, Aftzi V, Drougkaki M, Konidaki M, et al. Characteristics of urinary tract infections in older patients in a tertiary hospital in Greece. *Geriatr Gerontol Int*, 2020; 20: 1228-33.

Intravitreal enjeksiyon odası ile günübirlik ameliyathane odasının hava kalitesinin ve mikrobiyal yükünün değerlendirilmesi

Evaluation of air quality and microbial tests of the intravitreal injection room and the outpatient operating room

Erol HAVUZ¹ (ID), Seda GÜDÜL HAVUZ² (ID)

ÖZET

Amaç: İntravitreal enjeksiyonlar oftalmolojide sık kullanılan tedavi yöntemlerinden biri olmakla beraber görme kaybı ile sonuçlanabilen ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Çalışmamızda, intravitreal enjeksiyonların yapıldığı intravitreal enjeksiyon odası (İEO) ile günübirlik ameliyathane odasının (GAO) partikül, ventilasyon ve mikrobiyal yükünün değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: İEO ve GAO için ısıtma, havalandırma ve hava durumu "Heating Ventilating and Air Conditioning" (HVAC) performans test sonuçları incelenmiştir. Filtrelerin hava akış ve debileri balometre cihazı ile tespit edilmiştir. Bu ölçüm için filtre boyutlarına uygun başlıklar kullanılmıştır. Ortamların sıcaklık ve nemi, termo higrometre cihazı ile ölçülmüştür. Mikrobiyolojik kontaminasyon, pasif örnek toplama yöntemiyle ortam kültürleri alınarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla yerden bir metre yüksekte ve enjeksiyon alanından bir metre uzakta masa üzerine eozin metilen mavisi (EMB) agar, kanlı agar ve Sabouraud %2 dekstroz agar besiyerleri bir saat boyunca açık bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası üreyen kolonilerin tanımlanması yapılarak benzer koloniler sayılmıştır. Koloni sayısına göre ortamın metreküpünde mikrobiyal yükünün belirlenmesinde

ABSTRACT

Objective: Intravitreal injections are one of the most commonly used treatment methods in ophthalmology, but they can cause serious infections that may result in vision loss. In our study, it was aimed to evaluate the particle, ventilation and microbial load of the intravitreal injection room (IVIR) and the outpatient operating room (OPR) where intravitreal injections were performed.

Methods: Heating Ventilating and Air Conditioning (HVAC) performance test results for IVIR and OPR were examined. The air flow and flow rates of the filters were determined with a balometer device. For this measurement, hood suitable for filter sizes were used. The temperature and humidity of the environments were measured with a thermo-hygrometer device. Microbiological contamination was assessed by obtaining media cultures using the passive sample collection method. For this purpose, eosin methylene blue (EMB), blood agar and Sabouraud 2% dextrose agar medium petri dishes were left open for one hour on the table one meter above the ground and one meter away from the injection site. Colonies that reproduced after incubation were identified and similar colonies were counted. By using Omeliansky's formula to determine the microbial

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Samsun
²Bafra Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Bafra, Samsun



İletişim / Corresponding Author : Erol HAVUZ
SBÜ Göz Hast., Samsun EAH, Kadıköy Mah., Barış Blv. No:199, İlkadım / Samsun - Türkiye
E-posta / E-mail : erolhavuz@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 03.08.2021
Kabul Tarihi / Accepted : 25.10.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.65390

Havuz E, GÜDÜL Havuz S. İntravitreal enjeksiyon odası ile günübirlik ameliyathane odasının hava kalitesinin ve mikrobiyal yükünün değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 123 - 132

Omeliansky's formülü kullanılmış ve sonuç, koloni oluşturan ünite (cfu/m³) olarak bildirilmiştir.

Bulgular: Metreküpde 0,5 µm büyüklüğündeki partikül sayısı İEO'da 6.350.606, GAO'da ise 85.648 olarak tespit edilmiştir. Saatte hava değişim oranı "Air Change per/hour" (ACH) ve "International Organization for Standardization" (ISO) sınıfı, İEO için sırasıyla 2.0 ve ISO 9 olarak bulunurken, GAO için 56.2 ve ISO 7 olarak saptanmıştır. Ortamdaki bakteriyal yoğunluk İEO'da 484.86 cfu/m³ olarak oldukça yüksek saptanırken, GAO'da 65.11 cfu/m³ olarak bulunmuştur. İEO ve GAO'da *Staphylococcus epidermidis*, *Pantoea* spp. ve *Enterobacter cloacae* üremiş olup fungal patojen üremediği tespit edilmiştir.

Sonuç: İEO, GAO'ya göre enfeksiyon açısından daha riskli olarak saptanmıştır. İntravitreal enjeksiyonlarda, lokal antisepsi kurallarına sıkı uyum, ultraviyole lambalarının enjeksiyon yapılmadığı zamanlarda açık tutulması ve göz içi enjeksiyonun yapılacağı ortamlarda saatteki hava değişim oranının yüksek olması çok önemlidir. Enfeksiyon gelişimini önlemek açısından intravitreal enjeksiyonların, özel olarak tasarlanmış pozitif basınçlı odalarda yapılması çok daha güvenli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: İntravitreal enjeksiyon odası, gününbirlik ameliyathane odası, hava kalitesi, mikrobiyal yük

load per cubic meter of medium according to the number of colonies, the result was reported as colony forming units (cfu/m³).

Results: The number of 0.5 µm particles per cubic meter was determined as 6,350,606 in the IVIR and 85,648 in the OPR. ACT and the "International Organization for Standardization" (ISO) class were found to be 2.0 and ISO 9 for IVIR, respectively, while 56.2 and ISO 7 for OPR. The bacterial density in the medium was found to be quite high as 484.86 cfu/m³ in IVIR, while it was found as 65.11 cfu/m³ in OPR. *Staphylococcus epidermidis*, *Pantoea* spp. and *Enterobacter cloacae* were grown in IVIR and OPR, and no fungal pathogens were detected.

Conclusion: IVIR was found to be risky in terms of infection according to OPR. In intravitreal injections, it is very important to comply with the local antiseptics rules, keep the ultraviolet lamps on when the injection is not made, and have a high rate of air change per hour in the environments where the intraocular injection will be made. It will be much safer to make intravitreal injections in specially designed positive pressure rooms in order to prevent the development of infection.

Key Words: Intravitreal injection room, outpatient operating room, air quality, microbial load

GEREÇ ve YÖNTEM

Intravitreal enjeksiyon, oftalmolojide en yaygın uygulanan cerrahi işlemlerdendir (1). Retina hastalıklarında kullanılan çeşitli ilaçlar, intravitreal enjeksiyon yoluyla verilerek, hem doğrudan hedef dokuya ulaştırılmakta hem de önemli sistemik yan etkilerin ortaya çıkması önlenmektedir (2). Günümüzde intravitreal enjeksiyonlar, ameliyathane odalarında, özel temiz odalarda ve ofis koşullarında yapılmaktadır.

Intravitreal enjeksiyon yoluyla verilen tedaviler, hızlı ve etkili olmakla birlikte endoftalmi gibi çok ciddi komplikasyonlara da yol açabilmektedir (3). Endoftalminin tedavisinde, intravitreal enjeksiyon yoluyla verilen antibiyotiklere ve/veya pars plana vitrektomi ameliyatlarına rağmen bazen prognoz kötüleşmekte ve görme kaybı ile sonuçlanabilmektedir. Endoftalmi meydana gelme sıklığı; antisepsi şartları, işlem esnasında konuşma, uygulanan ilaç, intravitreal enjeksiyondan sonra antibiyotik kullanımı ve enjeksiyonun yapıldığı

ortam gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (4-6). İntravitreal enjeksiyonların ameliyathane veya ofis koşullarında yapılmasına göre ortaya çıkan endoftalmi oranları üzerine yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir. Ofis şartlarında intravitreal enjeksiyon esnasında konjonktival %2,5 povidon-iyot uygulanması, maske, steril eldiven, kapak spekülümü ve özel örtülerin kullanımı koşulları sağlandığında endoftalmi sıklığı %0 - %0,050 olarak bildirilmiştir (7, 8). Ameliyathane odasında aynı antisepsi kuralları uygulandığında, intravitreal enjeksiyonlarda endoftalmi oranları %0 ile %0,016 olarak daha düşük oranda saptanmıştır (6, 9). Yapılan çalışmalara göre, ofis şartlarında uygulanan intravitreal enjeksiyonun ameliyathane ortamında yapılanlara göre nispeten daha yüksek oranda endoftalmiye neden olduğu bildirilmekle birlikte, ofis ortamında antisepsi kurallarına sıkı sıkıya uyulduğunda ameliyathane ortamı ile benzer sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir (10). İdeal olan intravitreal enjeksiyonların ameliyathane ortamında yapılmasıdır. Ancak çeşitli nedenlerle bu uygulama ofis şartlarında da yapılmaktadır. Ameliyathane kapasitelerinin kısıtlı olması, ameliyathane ortamının ön hazırlık gerektirmesi, bu nedenle daha fazla zamana ihtiyaç duyulması ve maliyet etkinlik gibi nedenlerle intravitreal enjeksiyonlar ofis şartlarında da yapılmaktadır. Sözü edilen bu olumsuzlukların üstesinden gelmek için son yıllarda göz kliniklerinin çoğunda, intravitreal enjeksiyon odası ya da özel temiz odalar kullanılmaya başlanmıştır. Bazı ülkelerde özel sigortası olmayan hastalar için düşük maliyet nedeniyle özellikle ofis şartları tercih edilirken, komplike vakalar ve özel sigortalı hastalar için ameliyathaneler tercih edilmektedir (11). Günübürlük ameliyathane odası (GAO), hem “International Organization for Standardization” (ISO) kriterlerini hem de yüksek hava değişim oranı/saat “Air Change per/hour” (ACH)’yi sağlayarak mikroorganizmalarla kontaminasyonu önlemekte ve enjeksiyon için güvenli bir ortam sağlamaktadır.

Bu çalışmada, intravitreal enjeksiyon odası (İEO) ve GAO’da mikrobiyolojik testler ve ısıtma havalandırma ve hava durumu “Heating Ventilating and Air Conditioning” (HVAC) performans testleri yapılarak bu odaların enfeksiyon açısından güvenilirliği araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ekim 2020-Haziran 2021 tarihleri arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göz Kliniğinde yapılmış olup etik kurul izni gerektiren araştırmalar kapsamında değildir. COVID 19 pandemi sürecinde kliniğimizde yılda ortalama 9500 enjeksiyon yapılmaktadır. Bu bakımdan kliniğimiz Samsun ve çevresindeki illerde en yüksek enjeksiyon sayısına sahip olan bir merkez konumundadır. Çalışmada, GAO ve İEO’nun HVAC performans, validasyon ve kalifikasyon testleri ile birlikte mikrobiyolojik analizler değerlendirilmiştir. Hastanemizde, temiz alanların periyodik olarak denetlenmesi yapılmaktadır. Merkezi havalandırma sistemindeki kaba ve hassas filtrelerin kirlilik düzeyleri test tarihinden önce kontrol edilmiş, rutin temizlik ve bakımları yapılmıştır. Havalandırma sisteminde bulunan hava difüzör ve hava akış laminatörlerinin hasarlı olmadığı teknik servis tarafından kontrol edilmiştir.

HVAC performans testlerinde; hava hızı, debi, hava değişim sayısı, partikül ölçümü, sıcaklık, nem ve hepa filtre sızdırmazlık durumu incelenmiştir. Ayrıca basınç farkı ve hava akış yönü DIN 1946/4:2008(12) standartlarına göre ölçülmüştür. İEO ve GAO’nun (Şekil 1) rutin temizliği yapıldıktan sonra odalara giriş-çıkış yapılmaksızın 12 saat boyunca sıcaklık, nem ve havalandırma sistemlerinin çalıştırılması sağlanmıştır. Göz içi enjeksiyonlar başladıktan bir saat sonra ölçümler alınmaya başlanmış, böylece aktif kullanım durumundaki veriler elde edilmiştir. Partikül sayısına göre temiz odaların klasifikasyonları ISO tarafından tanımlanan EN ISO 14644-1:2015 (13), EN ISO 14644-2:2015(14) ve EN ISO 14644-3:2006 (15) standartlarına



Şekil 1. İntravitreal enjeksiyon yapılan ortamlar. A- günübirlük ameliyathane, B- günübirlük ameliyathane odası, C- enjeksiyon odası, D- 111 kuralı gereği yerleştirilen besiyerleri

göre yapılmıştır. Balometre cihazı kullanılarak filtrelerin hava akışı ve debileri tespit edilmiştir. Partikül sayısı, aerosol partikül sayıcı ile ortamlardan alınan hava numunelerinde yapılmıştır. Numunelerin sayısı EN ISO 14644-1:2015 (13) kriterleri gereğince oda büyüklüğüne göre belirlenerek, GAO için 10, İEO için 6 numune alınmıştır. Sonuçlar alınan numunelerin ortalaması olarak belirlenmiştir. Filtrelerin 0.5 µm büyüklüğünde partikülleri tutma oranları EN 1822-2009 (16) EN 779 test standartlarına (17) göre belirlenmiştir. Nem ve sıcaklık termo higrometre cihazı ile ölçülmüş ve ISO 14644-2:2015 ve ISO 14644-3:2006 standartlarına göre değerlendirilmiştir. Ortam havasından pasif yöntemle örnek alınarak mikrobiyal kontrolü yapılmıştır. Bu amaç için açık petri yöntemi

uygulanmıştır. Eozin metilen mavisi (EMB) agar, kanlı agar ve Sabouraud %2 dekstroz agar besiyerli ikişer tane kullanılmıştır. Petrilerin ortama yerleştirilmesinde 1/1/1 kuralı uygulanmıştır (Şekil 1D). Besiyerleri, yerden bir metre yükseklikte, intravitreal enjeksiyon yapılan masadan bir metre uzaklıkta bulunan başka bir masa üzerine konulup, bir saat bekletilmek suretiyle göz içi enjeksiyonların uygulandığı süre boyunca açık bırakılmıştır. Dokuz cm çapındaki petriler, 36 ± 1 °C'de 24 saat ve funguslar açısından 25 °C'de üç gün inkübe edildikten sonra koloni varlığı açısından değerlendirilmiştir. Besiyerlerinde üreyen benzer koloniler ayrı ayrı sayılmıştır (Şekil 2). İki petride üreyen benzer koloniler sayılarak ortalaması alınmıştır. Ortam havasındaki mikrobiyal yoğunluk,

metreküpde koloni oluşturan birim “colony forming unit”(cfu) olarak Omeliansky’s formülüne göre tespit edilmiştir.

$$N = \frac{5a \cdot 10000}{b \cdot t}$$

$N = \text{cfu}$, $a = \text{petrideki koloni sayısı}$, $b = \text{santimetre cinsinsinden petri alanı}$, $t = \text{geçen zaman (dakika)}$ (18). Bakterilerin tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler ve Vitek-2 (BioMerieux, Fransa) yarı otomatik bakteri tanımlama sistemi kullanılmıştır.



Şekil 2. A-Kanlı agar, B-EMB besiyerinde kolonilerin görünümü

BULGULAR

GAO ve İEO’ya ait HVAC performans, validasyon ve kalifikasyon sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 1’de verilmiştir. GAO ve İEO’da ortam havasında mikrobiyal kontaminasyonu değerlendirmek için mikrobiyolojik kontrol yapılmıştır. Kanlı agar ve EMB agarda, *S. epidermidis*, *Pantoea* spp. ve *E. cloacae* üremiştir. Koloni sayısı, GAO havasında 65.11 cfu/m³ iken İEO’da 484.86 cfu/m³ olarak saptanmıştır. Fungal kontaminasyon görülmemiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda, İEO’nun ortam havasının bakteriyel yoğunluğu 484.86 cfu/m³ olup, temiz hava şartlarını yeterince sağlayamadığı buna karşın GAO’nun 65.11 cfu/m³ ile kabul edilebilir aralıkta olduğu görülmüştür. İntravitreal enjeksiyon yapılan alanlarda olması gereken hava kalitesi, partikül sayısı ve havadaki biyoyükün tolere edilebileceği sınır ile ilgili uluslararası bir rehber halen bulunmamaktadır. “The Royal College of Ophthalmologists” tarafından

2009 yılında yayımlanan “İntravitreal Enjeksiyon Prosedürü için Yönergeler” adlı kılavuzda sadece genel gereksinimler bildirilmiş olup, ortam havası konusunda bir referans aralığı verilmemiştir. Amerika Birleşik Devletlerinde, American Federal Standard 209E (19), İngiltere’de British standard 5295 (20) ve başka ülkeler de ameliyathaneler ve temiz odaları için kendi standartlarını oluşturmuşlardır. Mevcut standartlar EN ISO 14644-1:2015’e uyumlu hale getirilmektedir (13). Günümüzde ortopedi ve kalp cerrahisi ameliyathaneleri dışındaki ameliyathanelerde asgari şart olarak; havanın saatte 20 kez değişimi ve ortam mikrobiyal yükünün 50-150 cfu/m³ olması sağlanmalıdır. Çok temiz (ultraclean) hava şartlarının sağlandığı ameliyathanelerde bu değer <10 cfu/m³ olmalıdır (21, 22). Çalışmamızda, İEO’nun metreküpdeki cfu miktarının yüksek çıkmasının çeşitli nedenleri olabilir. Ölçümlerin, hastalara enjeksiyon yapılmaya başladıktan bir saat sonra, odaya giriş çıkışların çok olduğu en yoğun çalışma saatlerinde başlatılmış olması mikrobiyal yükün fazla çıkmasında bir etken olmuş olabilir.

Tablo 1. Günübirlük ameliyathane odası ve intravitreal injeksiyon odasına ait HAVC performans test sonuçları

	Günübirlük ameliyathane	Enjeksiyon odası	Ameliyathaneler için kabul kriterleri	
Alanların özellikleri				
Alan (m ²)	45	32	-	
Hacim (m ³)	135	105	-	
Filtreler	HEPA*	Havalandırma filtresi		
Toplam sayısı	4	2	-	
Filtre tipi	H13	G4, F7	-	
Hava debisi (m ³ / h)	2531	210	-	
Saatte hava değişimi (ACT)	56,2	2	≥15	
Ameliyathane odası klasifikasyonu				
Sınıf	ISO 7	ISO 9	ISO 7	
Particle Counting (0,5 µm/m ³)	85.648	6.350.606	352.000	
Fark basıncı (Pa)	16	2	6-30	
Hava akım yönü	İçeriden dışarıya	İçeriden dışarıya	İçeriden dışarıya	
0.5 µ büyüklüğünde partikülleri tutma oranları				
	HEPA Filtre	Havalandırma filtresi	Filtre	Etkinlik %
	99,95	G4	H13	99,95(Ý)
		F7	G4	5-25(ý)
			F7	70-85(ý)
Sıcaklık (°C)	21,8	21,9	18-23,8	
Nem (%)	44,5	52	30-60	

* High efficiency air filters , Ý : EN1822-2009 (16) ý : EN779 Test Standartları (17)

Hava, ameliyathanelere, santrallerde bir ön filtreleme, ardından hassas filtrelemelerden geçip, en sonunda da hepa filtrelerle üç veya dört kez filtrelendikten sonra ulaşmaktadır. Standart hasta ve poliklinik odalarında olduğu gibi İEO'ya da hava G4 torba ile ön filtreleme, F7 filtreleri ile hassas filtreleme işleminden geçtikten sonra ulaşmaktadır.

Ayrıca ACH oranının ve fark basıncının düşük olması, hepa filtrenin bulunmaması yüksek cfu/m³ saptanmasında etkili faktörlerdir. Partikül sayısının yüksek olarak saptanmasında, enjeksiyon için hastaların sürekli olarak içeri girmesi, yatması ve kalkması gibi fiziksel aktivitelerin fazla olması etken olabilir.

Ayrıca koridor ile İEO arasında hava basınç farkının düşük çıkması, dışarıdan içeriye doğru zayıf hava akımı olabileceğini düşündürmektedir. Yetersiz basınç farkı ile birlikte, filtre kirlenmesi ve kaçaklar olması durumunda temiz zannedilen ortamın nötr, hatta negatif basınçlı kirliliğe dönüşmüşü bildirilmektedir (23). Hava sirkülasyonunun az, nispeten durağan olduğu kütüphanelerde 367-2.595 cfu/m³ gibi yüksek değerler bildirilmiştir (18). Çalışmamıza başlamadan önce filtrelerin sağlam olduğu uzman kişiler tarafından değerlendirilmiş olup, hava debisinin düşük olmasına bağlı olarak fark basıncı düşük olarak saptanmıştır.

Partikül miktarı; ortamın ventilasyonuna, çalışan personel sayısına ve ortamda bulunan bazal partikül sayısına bağlıdır (21). Sağlık çalışanı sayısının artması havanın kontaminasyonuna ve cfu/m³ değerinin yükselmesine yol açmaktadır (24). Enjeksiyon odasında yalnızca hekim ve hemşire çalıştığı için hava kontaminasyonunun personel sayısından ziyade hastalara bağlı olduğu düşünülmektedir. Peşpeşe yapılan enjeksiyonlar nedeni ile hastalar tarafından da odaya partikül taşınması olasıdır. Bahsedilen tüm olumsuzluklara rağmen ofis şartlarında intravitreal enjeksiyonlara devam edilmektedir.

Endoftalmi sıklığının, ameliyathane ve ofis şartları ile ilişkisini ortaya koyan analizler incelendiğinde, sonuçlarda farklılıklar görünmektedir. Endoftalmi gelişimi açısından iki ortam arasında bir fark olmadığını gösteren yayınların (1) yanında, ofis odasında endoftalmi gelişiminin daha az olduğunu (25), ya da ameliyathanenin daha güvenilir olduğunu belirten çalışmalar da bulunmaktadır (9). İntravitreal enjeksiyonlar, başlangıçta pek çok merkezde ameliyathanelerde yapılmakla beraber son yıllarda temiz oda ve ofis koşullarında yapılmaktadır (11). Günümüzde intravitreal enjeksiyonlar, Kanada'da %72 (26), Birleşik Krallık'ta ise %83 oranında ofis şartlarında veya temiz odalarda yapılmaktadır (27). Fransa'dan yapılan bir çalışmada, 316.576 intravitreal enjeksiyonun %96'sının özel enjeksiyon odasında yapıldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada, 25

oftalmoloji merkezinde enjeksiyon yapılan alanların yalnızca %40'ında hava ek olarak filtrelenmiştir. Buna rağmen endoftalmi sıklığı %0,021 gibi düşük oranlarda saptanmıştır (28).

Modern ameliyathane filtreleri, 5 µm büyüklüğündeki partikülleri %80-95 oranında temizlerken, hepa filtreli laminer akımlı sistemler ise 0,3 µm ve daha büyük partiküllerin %99,97'sini temizleyebilmektedir. Laminer akımın olduğu ameliyathane odalarında hepa filtreler vertikal olarak tavana monte edildiğinde cerrahi lambalara bağlı olarak türbülans oluşmakta ve hava akışı bozulmaktadır (22).

Havadaki partiküllerin enfeksiyonla ilişkisini gösteren ilk çalışmada, çok temiz hava kullanılan ameliyathane odalarının, konvansiyonel ventilasyon kullanılan ameliyathane odalarına göre enfeksiyon oranını önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir (29). Teorik olarak, havada asılı partiküllerin intravitreal enjeksiyondan sonra endoftalmiye yol açacağı hipotezinden hareketle, ameliyathanelerin daha güvenli olduğu kuşku götürmez bir gerçektir (11). Havada asılı duran durgun partiküller uzaklaştırılmalı ve durgunluk giderilmelidir. Havadaki mikrobiyal patojenlerin miktarı ile 5-7 µm büyüklüğündeki partiküller arasında bir kolerasyon olduğu gösterilmiştir (30). İntravitreal enjeksiyonun simüle edildiği bir çalışmada, mekanik ventilasyonun kullanılmadığı odalarda, mobil tek yönlü hava akım ekranı "ultraclean unidirectional airflow screen" (UDF) ile havada, oküler yüzeyde ve enjeksiyon için kullanılan masada bulunan partiküllerin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (21). Freiberg ve ark. (31), yüksek sterilite standartlarının sağlandığı laminer hava akımına sahip ameliyathane odalarının, intravitreal enjeksiyon serilerinde, endoftalmi sıklığının düşük olmasında etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

2019 yılında başlayan COVID-19 pandemisi, halen devam etmektedir. Hastayla yakın temas, enfeksiyonun bulaşı açısından göz hekimleri için çok önemli bir risk faktörüdür. İntravitreal enjeksiyon

riskli bir prosedürdür. Pandemi döneminde hekim ve hasta açısından bulaşı önlemeye yönelik güvenli intravitreal enjeksiyon rehberleri yayınlanmıştır. İntravitreal enjeksiyon yapan retina uzmanlarında COVID-19'un sıklığına dair henüz bir yayın bulunmamaktadır. Pandemiden önce kliniğimizde çok fazla intravitreal enjeksiyon yapılırken pandemide bazı hekimler güvenlik nedeni ile hiç enjeksiyon yapmamış bazıları da çok fazla enjeksiyon yapmak durumunda kalmıştır. Kliniğimizde intravitreal enjeksiyon yapan hekimlerimiz pandeminin ilk 18 ayında COVID-19'a yakalanmamış olup, kişisel koruyucu ekipman kullanımının COVID-19'a karşı korunmada oldukça etkili olduğunu düşünmekteyiz.

İntravitreal enjeksiyon işlemi mümkün olduğunca güvenli, etkili ve konforlu olmalıdır. Fagan ve Al-Qureshi (3), intravitreal enjeksiyonların yapıldığı yerlerin ventilasyon gereksinimlerin ne olacağı konusunda oftalmoloji alanında bir çalışma olmadığını belirtmektedir. İEO için cfu/m³ değerleri bildirilmemiş olsa da ameliyathaneler için cfu/m³ değerleri yayımlanmıştır (32, 33).

İEO'da HVAC performans ve mikrobiyolojik kontroller ilk kez incelendiği için çalışmamız

literatüre katkıda bulunacaktır. Endoftalmi sayısının ve intravitreal enjeksiyonların neden olduğu diğer komplikasyonların incelenmemiş olması bu çalışmanın kısıtlılığdır. Endoftalmi sıklığının çok düşük olması nedeniyle hem İEO'da hem de GAO'da çok geniş örnek büyüklüğü gerekir. Ameliyathanelerde, fazla sayıda intravitreal enjeksiyon yapılmadığı için her iki ortamı endoftalmi sıklığı açısından karşılaştırmak uygun görülmemektedir. Çalışmamızın ikinci kısıtlılığı ise günün farklı saatlerinde partikül sayımı ve mikrobiyolojik kontrolünün yapılamamış olmasıdır. Sabahları, gün sonuna göre daha az miktarda partikül ve mikrobiyal kontaminasyon söz konusu olabilir.

Sonuç olarak, İEO'da partikül sayısının çok yüksek oluşu ve buna bağlı ISO 9 sınıfında yer alması endoftalmi açısından bir risk faktörüdür. Ancak antisepsi şartlarının sağlanması ile bu önemli komplikasyondan kaçınılabilir. Yüksek pozitif basınç oluşturan, ACH oranının yüksek olduğu, koridor ile enjeksiyon alanı arasında bir alanın oluşturulduğu, özelleşmiş İEO'ların veya enjeksiyon kabinlerinin kullanıma girmesi ile güvenilir ve verimli bir şekilde intravitreal enjeksiyonlar uygulanabilir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma Etik Kurul İzni gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Bande MF, Mansilla R, Pata MP, Fernández M, Blanco-Teijeiro MJ, Piñero A, et al. Intravitreal injections of anti-VEGF agents and antibiotic prophylaxis for endophthalmitis: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.*, 2017;7(1): 1-6.
2. Doshi RR, Bakri SJ, Fung AE. Intravitreal injection technique. *Semin Ophthalmol*, 2011; 26(3):104-13.
3. Fagan XJ, Al-Qureshi S. Intravitreal injections: a review of the evidence for best practice. *Clin Exp Ophthalmol*, 2013;41(5):500-7.
4. Cheung CS, Wong AW, Lui A, Kertes PJ, Devenyi RG, Lam W-C. Incidence of endophthalmitis and use of antibiotic prophylaxis after intravitreal injections. *Ophthalmology*, 2012;119(8):1609-14.
5. Bhavsar AR, Sandler DR. Eliminating antibiotic prophylaxis for intravitreal injections: a consecutive series of 18,839 injections by a single surgeon. *Retina*, 2015;35(4):783-8.
6. Nentwich MM, Yactayo-Miranda Y, Schwarzbach F, Wolf A, Kampik A, de Kaspar HM. Endophthalmitis after intravitreal injection: decreasing incidence and clinical outcome-8-year results from a tertiary ophthalmic referral center. *Retina*, 2014;34(5):943-50.
7. Shimada H, Hattori T, Mori R, Nakashizuka H, Fujita K, Yuzawa M. Minimizing the endophthalmitis rate following intravitreal injections using 0.25% povidone-iodine irrigation and surgical mask. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2013;251(8):1885-90.
8. Mithal K, Mathai A, Pathengay A, Jalali S, Relhan N, Motukupally SR, et al. Endophthalmitis following intravitreal anti-VEGF injections in ambulatory surgical centre facility: incidence, management and outcome. *Br J Ophthalmol*, 2013;97(12):1609-12.
9. Brynskov T, Kemp H, Sørensen TL. No cases of endophthalmitis after 20,293 intravitreal injections in an operating room setting. *Retina*, 2014;34(5):951-7.
10. Merani R, Hunyor AP. Endophthalmitis following intravitreal anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) injection: a comprehensive review. *Int J Retin Vitreol*, 2015;1(1): 1-19.
11. Lau PE, Jenkins KS, Layton CJ. Current evidence for the prevention of endophthalmitis in anti-VEGF intravitreal injections. *J Ophthalmol*, 2018;8567912:1-8.
12. Deutsche Norm . DIN 1946-4: 2008-12. Ventilation and air conditioning—part 4. Access date: 27 May 2021. Available from: https://kupdf.net/download/din-din-1946-4_5c4ca74ce2b6f5a63fb94916_pdf.
13. EN ISO 14644-1:2015. Cleanrooms and associated controlled environments - Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration. Geneva: International Organization for Standardization. 2015.
14. EN ISO 14644-2:2015. Cleanrooms and associated controlled environments – Part 2: Monitoring to provide evidence of cleanroom performance related to air cleanliness by particle concentration. Geneva: International Organization for Standardization. 2015.
15. EN ISO 14644-3:2019. Cleanrooms and associated controlled environments - Part 3: Test methods. Geneva: International Organization for Standardization. 2019.
16. 1822-1 ESE. High efficiency air filters (EPA, HEPA and ULPA) - Part 1: Classification, performance testing, marking 2009. Access date: 12 June 2021. Available from: https://weerhuisje.eu/pdf/EN1822-1-2009_Highefficiencyairfilters_EPA_HEPA_ULPA_Part1_Classification_performance.pdf.
17. Hava Filtresi Çeşitleri Nelerdir ve Filtre Seçimi Nasıl Yapılır? <http://eximany.com/tr/post/hava-filtresi-cesitleri-nelerdir-ve-filtre-secimi-nasil-yapilir>. Erişim Tarihi: 01Temmuz 2021.

18. Hayleeyesus SF, Manaye AM. Microbiological quality of indoor air in University Libraries. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*, 2014;4:5312-57.
19. Federal Standard 209E: Airborne Particulate Cleanliness Classes in Cleanrooms and Clean Zones. Inst of Environmental Sciences. 1992. Access date: 18 June 2021. Available from: <http://www.iaqtechnology.com.my/site%20document/FEDERAL%20STANDARD%20209E%20FOR%20CLEANROOM%20-%20AN%20OBSOLETE%20DOCUMENT!.pdf>.
20. BS 5295-1:1989. Environmental Cleanliness in Enclosed Spaces Part 1: Specification for Clean Rooms and Clean Air Devices. UK: British Standards Institution. 1989.
21. Lapid-Gortzak R, Traversari R, van der Linden JW, Oberstein SYL, Lapid O, Schlingemann RO. Mobile ultra-clean unidirectional airflow screen reduces air contamination in a simulated setting for intravitreal injection. *Int Ophthalmol*, 2017;37(1):131-7.
22. Dharan S, Pittet D. Environmental controls in operating theatres. *J Hosp Infect*, 2002;51(2):79-84.
23. Kırbaç C. Ameliyathanelerde basınç ve hava akışı uygulaması. IX. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi. 06-09 Mayıs, İzmir -Türkiye. 2009.
24. Shaw LF, Chen IH, Chen CS, Wu HH, Lai LS, Chen YY, et al. Factors influencing microbial colonies in the air of operating rooms. *BMC Infect Dis*, 2018;18(1):1-8.
25. Tabandeh H, Boscia F, Sborgia A, Ciraci L, Dayani P, Mariotti C, et al. Endophthalmitis associated with intravitreal injections: office-based setting and operating room setting. *Retina*, 2014;34(1):18-23.
26. Xing L, Dorrepaal SJ, Gale J. Survey of intravitreal injection techniques and treatment protocols among retina specialists in Canada. *Can. J. Ophthalmol*, 2014;49(3):261-6.
27. Samia-Aly E, Cassels-Brown A, Morris DS, Stancliffe R, Somner JE. A survey of UK practice patterns in the delivery of intravitreal injections. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2015;35(4):450-4.
28. Dossarps D, Bron AM, Koehrer P, Aho-Glélé LS, Creuzot-Garcher C. Endophthalmitis after intravitreal injections: incidence, presentation, management, and visual outcome. *Am J Ophthalmol*, 2015;160(1):17-25.e1.
29. Lidwell O, Lowbury E, Whyte W, Blowers R, Stanley S, Lowe D. Effect of ultraclean air in operating rooms on deep sepsis in the joint after total hip or knee replacement: a randomised study. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1982;285(6334):10-4.
30. Seal D, Clark R. Electronic particle counting for evaluating the quality of air in operating theatres: a potential basis for standards? *J Appl Microbiol*, 1990;68(3):225-30.
31. Freiberg FJ, Brynskov T, Munk MR, Sørensen TL, Wolf S, Wirth MA, et al. Low endophthalmitis rates after intravitreal anti-vascular endothelial growth factor injections in an operation room: a retrospective multicenter study. *Retina*, 2017;37(12):2341-6.
32. Pasquarella C, Vitali P, Saccani E, Manotti P, Boccuni C, Ugolotti M, et al. Microbial air monitoring in operating theatres: experience at the University Hospital of Parma. *J Hosp Infect*, 2012;81(1):50-7.
33. Landrin A, Bissery A, Kac G. Monitoring air sampling in operating theatres: can particle counting replace microbiological sampling? *J Hosp Infect*, 2005;61(1):27-9.

Inula viscosa metanol ve hekzan ekstraktlarının antibakteriyel ve antikanserojenik etkilerinin incelenmesi

Investigation of the antibacterial and anticarcinogenic effects of *Inula viscosa* methanol and hexane extracts

Berna ERDAL¹ (ID), Bahar YILMAZ² (ID), Bensu BAYLAN³ (ID)

ÖZET

Amaç: *Inula viscosa*, *Asteraceae* familyasına ait çok yıllık tıbbi bir bitkidir. Bu çalışmada, *I. viscosa*'dan elde edilen metanol ve hekzan ekstraktlarının antibakteriyel ve antikanserojenik aktivitelerinin incelenmesi amaçlandı.

Yöntem: *I. viscosa* metanol (1,56-800 mg/ml) ve hekzan (0,19-100 mg/ml) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon metodu ile test edildi. Standart referans suş olarak; *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kullanıldı. Ekstraktların minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri her bir bakteri için mikrodilüsyon yöntemi ile yapıldı. MİK değeri, üremenin görülmediği en düşük ekstrakt konsantrasyonu olarak belirlendi. MİK sonrası tüm kuyucuklar için minimum bakterisit konsantrasyonları (MBK) saptandı. *I. viscosa*'nın antikanserojenik aktivitesi MTT testi ile araştırıldı. MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri ekstraktların IC₅₀ değerlerinde akridin oranj ve propidium iyodür ile boyanarak canlı, apoptotik ve nekrotik hücreler belirlendi.

ABSTRACT

Objective: *Inula viscosa* is a perennial medicinal plant belonging to the *Asteraceae* family. This study aimed at investigating the antibacterial and anticarcinogenic activities of methanol and hexane extracts derived from *I. viscosa*.

Methods: The antibacterial activity of different concentrations of *I. viscosa* methanol (1.56-800 mg/ml) and hexane (0.19-100 mg/ml) extracts was tested using the disc diffusion method. *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* were used as standard reference strains. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of the extracts were made for each bacteria using the microdilution method. MIC value was determined as the lowest extract concentration at which growth was not observed. Minimum bactericide concentrations (MBC) were determined for all wells after MIC. The anticarcinogenic activity of *I. viscosa* was examined using the MTT test. MDA-MB-231 and HT-29 cells were stained with acridine orange and propidium iodide at the IC₅₀ values of the extracts to determine the viable, apoptotic and necrotic cells.

* Bu çalışma International Congress of Medicine and Health Sciences (26-28 Nisan, 2021) ve 7. International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences (3-4 Eylül, 2021) kongrelerinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

¹Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tekirdağ

²Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünoloji AD, Tekirdağ

³Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tekirdağ



İletişim / Corresponding Author : Berna ERDAL

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Kampüs Caddesi No:1, 59030 Merkez / Tekirdağ - Türkiye

E-posta / E-mail : berdal@nku.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 06.12.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 17.02.2022

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.55798

Erdal B, Yılmaz B, Baylan B. *Inula viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının antibakteriyel ve antikanserojenik etkilerinin incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 133 - 144

Bulgular: Metanol ekstraktının *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* için zon çapları sırasıyla; 8, 16, 7 ve 9 mm olarak ölçüldü. Hekzan ekstraktının ise *M. luteus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* için zon çapları sırasıyla 14, 7 ve 9 mm olarak belirlendi. Metanol ekstraktının MİK değerleri *M. luteus* için 25 mg/ml, *L. monocytogenes* ve *K. pneumoniae* için 200 mg/ml ve *E. coli* için ise 400 mg/ml olduğu bulundu. Hekzan ekstraktının MİK değerleri *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* için 400 mg/ml, *M. luteus* için 100 mg/ml olduğu bulundu. MBK değerlerinin MİK değerleri ile benzer olduğu görüldü. IC50 değerleri metanol ekstraktının MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri için sırasıyla 25 mg/ml ve 200 mg/ml, hekzan ekstraktının 6,25 mg/ml ve 12,5 mg/ml olarak belirlendi. Konsantrasyon artışına bağlı olarak MDA-MB-231 ve HT-29 hücrelerinde nekrotik ve erken apoptotik hücrelerin varlığı görüldü.

Sonuç: *I. viscosa*'nın metanol ve hekzan ekstraktlarının çalışılan bakteriler üzerine antibakteriyel, MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri üzerine antikanserojenik aktivitesinin olduğu bulundu. Bu ekstraktların farklı kanser hücre hatları ve bakteri suşları üzerine etkilerinin yapılacak başka çalışmalarla gösterilmesinin tamamlayıcı tıp alanına katkı sağlayacağı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: *Inula viscosa*, Antibakteriyel, Antikanserojenik

Results: Zone diameters of the methanol extract for *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *E. coli* and *K. pneumoniae* were 8, 16, 7 and 9 mm, respectively. Zone diameters of the hexane extract for *M. luteus*, *E. coli* and *K. pneumoniae* were 14, 7 and 9 mm, respectively. MIC values of the methanol extract were 25 mg/ml for *M. luteus*, 200 mg/ml for *L. monocytogenes* and *K. pneumoniae*, and 400 mg/ml for *E. coli*. MIC values of the hexane extract were 400 mg/ml for *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*, and 100 mg/ml for *M. luteus*. MBC values were similar to MIC values. IC50 values for MDA-MB-231 and HT-29 cells were 25 mg/ml and 200 mg/ml for the methanol extract, and 6.25 mg/ml and 12.5 mg/ml for the hexane extract, respectively. Depending on increased concentration levels, the presence of necrotic and early apoptotic cells was observed among MDA-MB-231 and HT-29 cells.

Conclusion: Methanol and hexane extracts of *I. viscosa* were found to have antibacterial effects on the studied bacteria and anticarcinogenic activity on MDA-MB-231 and HT-29 cells. Conducting further studies to demonstrate the effects of these extracts on different cancer cell lines and bacterial strains will contribute to the field of complementary medicine.

Key Words: *Inula viscosa*, antibacterial, anticarcinogenic

GİRİŞ

Tıbbi bitkiler, fitokimyasal ve biyolojik özelliklerinden dolayı potansiyel terapötik ajanlar olarak halen araştırma konusu olmaya devam etmektedir. Özellikle küresel bir sağlık sorunu haline gelen antibiyotik direnci nedeniyle bu bitkilerin antimikrobiyal özellikleri araştırılmaktadır (1).

Doğada tabii olarak yetişen bazı bitkilerin özütleri ve uçucu yağlarının antibakteriyel aktivitesinin varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir (2,3).

Kanserle mücadelede kemoterapi en yaygın kullanılan yöntem olmasına rağmen bazı dezavantajlar (tedaviye yanıt alınamaması, ciddi toksisite ve çoklu ilaç direnci vb.) başarı yüzdesini düşürmektedir. Kemoterapideki bu sınırlılıklar,

kanser hücrelerinde apoptoz ve sinyal yolları üzerine etkili alternatif doğal tedavilerin araştırıldığı çalışmaların sayısını giderek arttırmaktadır (4,5).

Güney Avrupa ile Güneybatı Asya floraları arasında köprü olması nedeniyle ülkemiz, terapötik amaçlı kullanılan endemik türler açısından oldukça zengindir (6). *Asteraceae* familyasına ait olan *Inula* bitkisinin dünya genelinde yaklaşık 100 türü olduğu bilinmektedir. Türkiye’de ise yedisi endemik olmak üzere 27 *Inula* türü bulunmaktadır. Bu türlerin çoğu kauçuk kaynağı, ilaç, yağ, sebze, pestisit ve peyzaj gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (7,8). Son yıllarda *Inula* türleri biyolojik aktiviteleri nedeniyle bilim dünyasının dikkatini çekti ve kimyasal özellikleri araştırıldığında yapısında birçok önemli biyoaktif bileşen içerdiği bulundu. Bu bileşenler; terpenik bileşikler (monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler ve triterpenler), flavonoidler, glikolipitler ve antranilik asit türevleridir (9,10). Bu bileşenlerin antiproliferatif, antioksidan, antitümoral, antimikrobiyal ve sitotoksik etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (11-13). Geleneksel tıpta; mide ülseri, anemi, diyabet, bronşiyal enfeksiyon, karaciğer ve deri hastalıklarının tedavisinde bu bitki yaygın olarak kullanılmaktadır (14-17).

Inula türlerinden biri olan ve halk arasında yapışkan anduz otu olarak bilinen *I. viscosa*, Akdeniz ve Ege bölgesinde yetişen tıbbi bir bitkidir. Ülkemizde farklı coğrafik bölgelerde yetişen *I. viscosa*’nın antitümoral ve sitotoksik etkileri farklı kanser türlerinde araştırılmaktadır (18,19). Aynı zamanda sahip olduğu flavonoidler ve terpenoidler gibi sekonder metabolitler sayesinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği de dikkati çekti (20,21).

Bu çalışmada; *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının; *L. monocytogenes*, *M. luteus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* standart referans bakteri suşları üzerine antibakteriyel, MDA-MB-231 (ATCC HTB-26™) meme kanseri ve HT-29 (ATCC HTB-38™) kolon kanseri hücre hatları üzerine antikanserojenik etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

1. *viscosa* ekstraktının hazırlanması

Manisa’nın Akhisar ilçesinden toplanan *I. viscosa*’nın aerial yapıları kurutulup toz haline getirilerek ezildi. Öğütülmüş bitki materyalleri, dönen bir çalkalayıcıda metanol (Katalog No: 106009; Merck, Almanya) ve hekzan (Katalog No: 10437; Merck, Almanya) çözeltileri kullanılarak 24 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi (22). Ekstraktlar, 40°C’de buharlaştırıldı ve daha sonra filtre kağıdından süzülerek liyofilize edildi ve deneysel kullanım için -20°C’de muhafaza edildi

Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi

Bakteri suşları

Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde Gram pozitif bakterilerden: *L. monocytogenes* ATCC 7644 ve *M. luteus* ATCC 10420; Gram negatif bakterilerden: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883 standart bakteri suşları kullanıldı.

Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) testi

Her bir bakteri suşu için MİK değerleri, katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (CAMHB) (Merck) kullanılarak EUCAST (2020) yönergelerine göre önerilen mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi (23). *I. viscosa* metanol (800-1,56 mg/ml) ve hekzan (100-0,19 mg/ml) ekstraktlarının farklı konsantrasyonları 96 kuyucuklu plakalara dilüe edilerek uygulandı. Bakteriyel süspansiyonlar 0.5 McFarland (1,5x10⁸ kob (koloni oluşturan birim) /ml) türbidite standardında uygun miktarlarda hazırlandı ve 10⁵ kob /ml’ye dilüe edilerek her kuyucuğa 10 µl eklendi. Plakalar, 37°C’de 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra spektrofotometre ile 630 nm dalga boyunda okutularak değerlendirilmesi yapıldı. Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak belirlendi. Her test üç kez tekrar edildi.

Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) testi

MİK testinde üreme gözlenmeyen kuyucuklardan alınan 2 µl örnekler Mueller Hinton Agara (Merck) ekildi. Besiyeri plakaları 37°C’de 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda üremeler

değerlendirilerek, mikrodilüsyon plaklarındaki üreme gözlenmeyen kuyucuklar ile karşılaştırıldı. Üreme gözlenmeyen bakteri konsantrasyonları MBK değeri olarak belirlendi.

Disk difüzyon metodu

Bakteri suşları %5 koyun kanlı agara (BES-LAB) inoküle edildikten sonra 37°C'de 18-20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası bakteri yoğunluğu Mueller Hinton Broth'ta 0,5 McFarland olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra Mueller Hinton Agar'a bakteri süspansiyonları inoküle edildi. *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonları 6 mm çaplı No.3 Whatman disklerle 100'er mikrolitre emprenye edildi. Diskler inoküle edilen petrilerin (150 mm) yüzeyine yerleştirildi ve 18-20 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Pozitif kontrol olarak Gentamicin (10 µg, Katalog No: CT0024B; Oxoid) diskleri kullanıldı. İnkübasyon sonunda zon çapları (milimetre) ölçüldü. Her test üç kez tekrar edildi.

Antitümorale aktivitenin belirlenmesi

Hücreler ve kültür koşulları

Antitümorale aktivitenin belirlenmesinde MDA-MB-231 ve HT-29 hücre hatları kullanıldı. Hücreler %10 fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS) (Gibco), %1 L-glutamine (Gibco), %1 penisilin/streptomycin (Gibco) içeren RPMI-1640 (Gibco) besi ortamında 37°C sıcaklıkta %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildi.

Hücre canlılığı analizi

Hücre canlılığını değerlendirmek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi kullanıldı. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara 3x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 100 µl ekildi ve %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında uygun dozlarda (metanol ekstraktı için: 800-1,56 mg/ml; hekzan 100-0,19 mg/ml) ekstrakt ve kemoterapötik ajan sisplatine (500-0,98 µg/ml) (MCE) maruz bırakıldı. 24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardaki besiyeri çekilerek yerine 100 µl fenol kırmızısı içermeyen RPMI (Sigma) eklendi. Daha sonra 1 mg/ml MTT (Katalog No: V13154; Vybrant® Invitrogen, ABD) reaktifinden her kuyucuğa 10 µl eklendi ve 4 saat 37°C' de %5'lik

CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda süpernatant atıldı ve formazan partikülleri dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma) kullanılarak çözündürüldü. Plaklar 570 nm dalga boyunda Multiskan GO mikropilaka okuyucu (ThermoScientific, Waltham, ABD) ile optik yoğunlukları (OD) ölçüldü. Canlı hücrelerin yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı: (%) = [100 × (örnek abs)/ (kontrol abs)] (24). Deney, üç kez tekrar edildi.

Akridin oranj / propidiyum iyodür (AO/PI) floresan boyama

I. viscosa'nın canlı ve ölü hücreler üzerine etkisini gözlemek için 10g sodyum-etilendiamintetraasetik asit (Na-EDTA), 4 mg propidium iyodür (PI) (Thermo Fisher Scientific) ve 50 ml FBS, 4 mg akridin oranj (AO) (Thermo Fisher Scientific) (2 ml 99% ETOH içinde çözülmüş) iyice karıştırıldı. Son hacim 200 ml olacak şekilde steril damıtılmış su eklenerek pipetaj yapıldı (25). Hücre sayısı 3x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara üç tekrarlı ekildi. Hücreler tutunması için 24 saat 5% CO₂ içeren 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakıldı. Belirlenen dozlarda *I. viscosa* ve sisplatin ile muamele edilen hücreler inkübe edildikten sonra AO/PI karışımından her kuyucuğa 10 µl eklenerek 5 dakika beklenildi. Farklı apoptotik özelliklere sahip hücreler floresan mikroskop (Leica, Almanya) kullanılarak morfolojik olarak değerlendirildi.

Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:29.06.2021 ve Karar No: 2021.192.06.22).

BULGULAR

Antibakteriyel Aktivitenin Belirlenmesi

Çalışmada, *I. viscosa* metanol (800-1,56 mg/ml) ve hekzan (100-0,19 mg/ml) ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının *L. monocytogenes* ATCC 7644, *M. luteus* ATCC 10240, *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 standart referans suşları üzerine antibakteriyel aktivitesi MİK ve disk difüzyon

yöntemi ile test edildi. Tablo 1’de gösterildiği gibi, *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının en düşük MİK ve MBK konsantrasyonları *M. luteus*’ta görüldü. Ayrıca, metanol ve hekzan ekstraktlarının MİK ve MBK sonuçlarının uyumlu olduğu bulundu.

I. viscosa metanol ve hekzan ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile antibakteriyel aktivite sonuçları Tablo 2 ve Şekil 1’de verildi. Kullanılan suşlarda farklılık görülmekle birlikte; metanol ekstraktının

800, 400 ve 200 mg/ml konsantrasyonlarda, hekzan ekstraktının ise 100 ve 50 mg/ml konsantrasyonlarda antibakteriyel aktivite sergilediği görüldü. Her iki ekstrakta en duyarlı olan bakterinin *M. luteus* olduğu belirlendi. Pozitif kontrol olarak kullanılan gentamisin EUCAST (2020) kriterlerine göre, standart bakteri suşlarında yüksek oranda duyarlılık gösterdi (Tablo 2, Şekil 1).

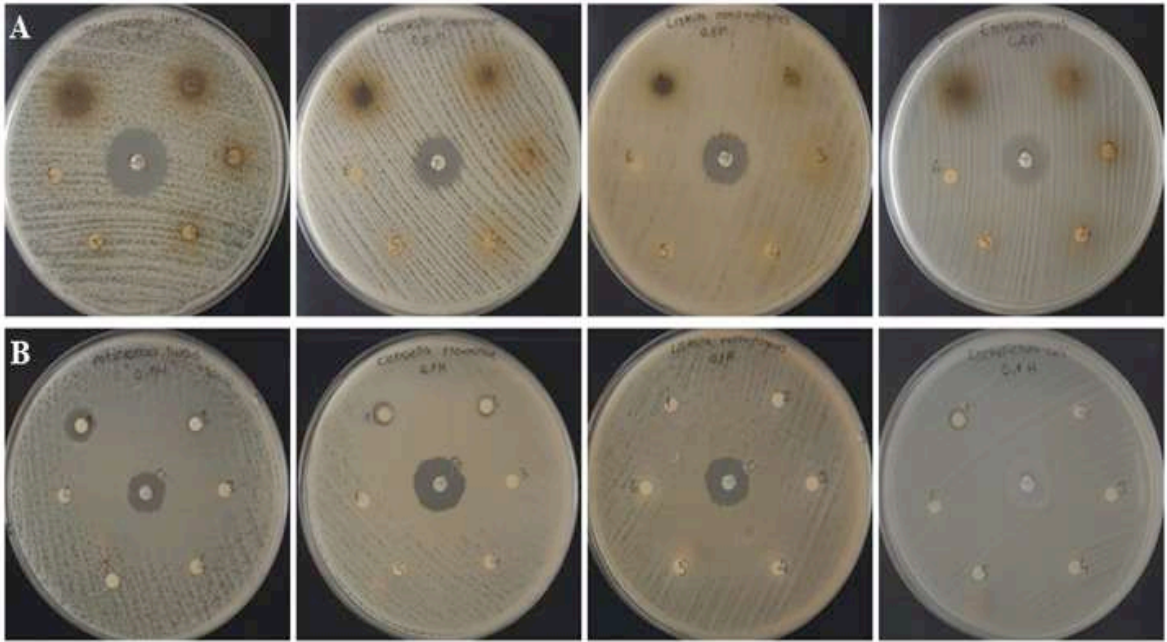
Tablo 1. *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının MİK ve MBK sonuçları (mg/ml)

Referans Standart Bakteri Suşu	Metanol Ekstraktı		Hekzan Ekstraktı	
	MİK	MBK	MİK	MBK
<i>L. monocytogenes</i>	200	200	400	400
<i>M. luteus</i>	25	25	100	200
<i>E. coli</i>	400	800	400	400
<i>K. pneumoniae</i>	200	200	400	400

Tablo 2. *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının inhibisyon zon çapları (mm)

Bakteri Suşları	İnhibisyon Zonları (mm) (Ortalama ± standart sapma)					
	Metanol Ekstraktı			Hekzan Ekstraktı		Gentamisin
	800 mg/ml	400 mg/ml	200 mg/ml	100 mg/ml	50 mg/ml	10 µg/ml
<i>L. monocytogenes</i>	8,033±0,075	ZY	ZY	ZY	ZY	21,027±0,140
<i>M. luteus</i>	16,06±0,161	13,013±0,162	9,077±0,120	14,01±0,185	8,003±0,130	29,997±0,176
<i>E. coli</i>	7,03±0,137	ZY	ZY	7,013±0,130	ZY	24,04±0,145
<i>K. pneumoniae</i>	9,043±0,148	7,047±0,163	ZY	9,017±0,141	8,007±0,155	21,993±0,156

ZY: Test edilen bakterilere karşı ekstrakt zon oluşturmadı.



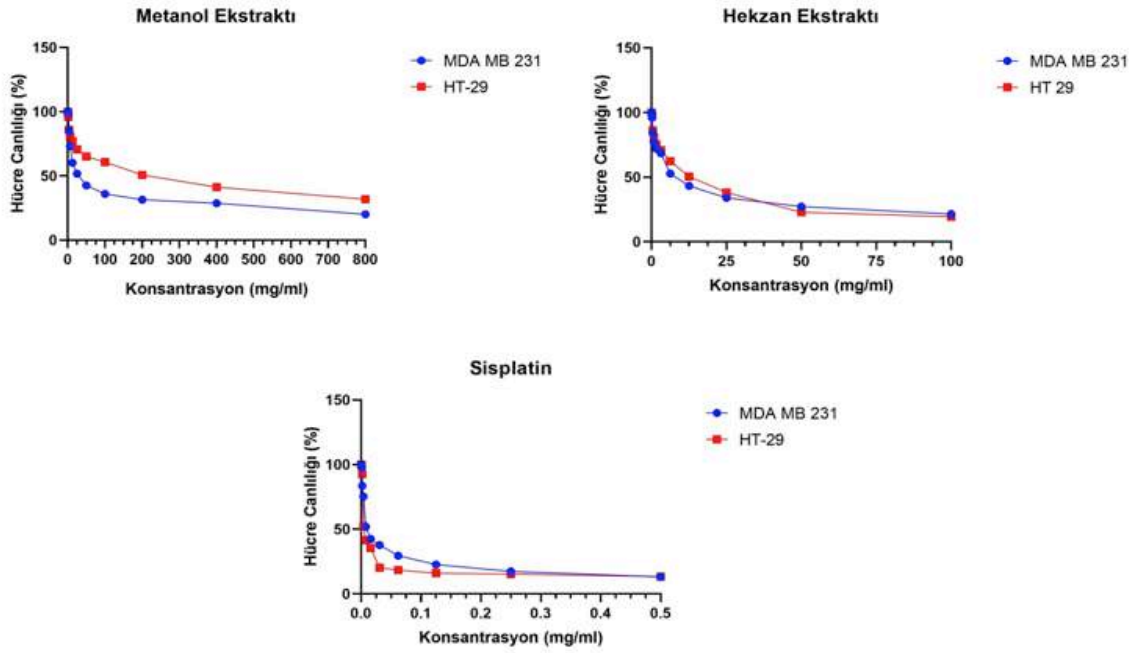
Şekil 1. *I. viscosa*'nın altı farklı konsantrasyonunun (A: Metanol Ekstraktı 800-25 mg/ml; B: Hekzan Ekstraktı 100-3, 125 mg/ml) disk difüzyon metodu ile iki Gram pozitif ve iki Gram negatif bakteriye karşı antibakteriyel aktivitesi

Antikarsinojenik aktivitenin belirlenmesi

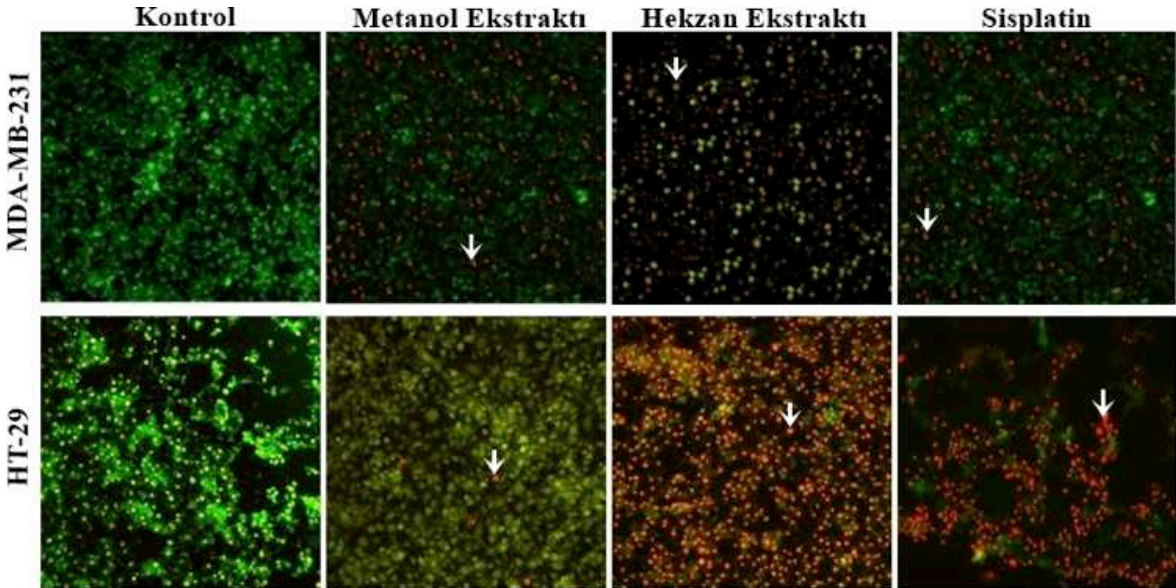
MTT testi sonucunda, *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri ile 24 saatlik inkübasyonu sonrasında konsantrasyona bağlı olarak kanser hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edildi. MDA-MB-231 hücreleri üzerine *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) sırasıyla 25 mg/ml ve 6,25 mg/ml olarak bulundu. HT-29 hücrelerinde ise *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 200 mg/ml ve 12,5 mg/ml olduğu görüldü. MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri aynı koşullar altında sisplatin ile muamele edildiğinde IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,008 mg/ml ve 0,004 mg/ml olduğu bulundu (Şekil 2). Yapılan MTT analizi sonucunda, *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının HT-29 hücrelerine kıyasla MDA-MB-231 hücrelerine karşı

önemli anti-proliferatif aktiviteye sahip olduğu görüldü. Ayrıca; iki hücre hattı üzerinde de hekzan ekstraktının metanol ekstraktına kıyasla daha etkili olduğu belirlendi.

Çalışmada, *I. viscosa* ekstraktlarının ve sisplatinin apoptotik etkinliğinin belirlenebilmesi için IC₅₀ değerlerinde AO/PI floresan boyama metodu uygulandı. Yeşil floresan veren hücreler AO ile boyanan canlı hücreler, turuncu/kırmızı floresan veren hücreler ise PI ile boyanan apoptotik hücrelerdir. *I. viscosa* ekstraktları uygulanan hücrelerde apoptoza uğrayan hücre sayısının, kontrol hücrelerine kıyasla yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 3). Ayrıca, MDA-MB-231 ve HT-29 hücrelerinin hekzan ekstraktı ile muamelesi sonrasındaki apoptotik hücre popülasyonlarının fazla olması MTT bulgularını desteklemektedir.



Şekil 2. *I. viscosa* ekstraktları ve sisplatinin MDA-MB-231 ve HT-29 hücre canlılığı üzerine etkileri



Şekil 3. *I. viscosa* ekstraktları ve sisplatin uygulanmış MDA-MB-231 ve HT-29 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri (40x). Şekil üzerindeki oklar apoptotik hücreleri göstermektedir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitki özütleri, içeriğinde bulunan aktif bileşikler sayesinde alternatif doğal tedavilerin temelini oluşturmaktadır. Son yıllarda, yaygın antibiyotik kullanımının artması sonucu gelişen antibakteriyel direnç ile mücadeleye yönelik aktif bitki ekstraktlarıyla yapılan in vitro çalışmalar önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, iki Gram pozitif (*L. monocytogenes* ve *M. luteus*), iki Gram negatif (*E. coli* ve *K. pneumoniae*) bakteri üzerine *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının antibakteriyel etkinliği araştırıldı. Çalışılan bakteriler üzerine hem metanol hem de hekzan ekstraktının değişen oranlarda antibakteriyel etkinlik gösterdi. En iyi etki ise *M. luteus* suşunda bulundu.

I. viscosa ekstraktlarının farklı bakteriler üzerine antimikrobiyal etkinliğini araştıran benzer çalışmalar bulunmaktadır (20,26-30). Yapılan bir çalışmada; *I. viscosa*'nın aerial yapılarından elde edilen metanol ekstraktının 3,125-50 mg/ml konsantrasyonlarındaki antibakteriyel etkisi, MİK ve disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı. *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus faecalis* suşları kullanılarak yapılan MİK testi sonucu ekstraktın en etkili olduğu bakterinin *E. faecalis* (6,25 mg/ml), disk difüzyon yöntemi sonucu ise *E. coli* (25 mg/ml) olduğu bulundu (28). *I. viscosa*'nın metanol, etanol ve su ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin incelendiği başka bir çalışmada; *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* bakterilerinin 250 µg/ml konsantrasyonda metanol ekstraktına karşı duyarlı olduğu sonucuna varıldı (29). Benzer bir çalışmada, *I. viscosa* metanol ekstraktının (15-480 mg/ml) disk difüzyon metoduyla antibakteriyel aktivitesi araştırıldı, bu ekstrakta en duyarlı bakterinin *Pseudomonas aeruginosa* olduğu tespit edildi (30). Tüm bu çalışma sonuçlarına bakılarak, *I. viscosa*'nın farklı ekstraktlarının değişen oranlarda

hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği görüldü..

Günümüzde kansere karşı yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesine ve uygulanmasına rağmen mevcut kanser tedavileri yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden tümör gelişimini inhibe edecek etkili, yan etkisi az ve/veya olmayan yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yarım asırdan beri bitkilerin sahip olduğu aktif bileşiklerin türevleri, modern klinik uygulamalarda kansere karşı kullanılmaktadır (31).

Bu çalışmada, MDA-MB-231 ve HT-29 hücreleri üzerine *I. viscosa* metanol ve hekzan ekstraktlarının IC50 konsantrasyonları belirlendi. Her iki hücre üzerine hekzan ekstraktının metanol ekstraktına kıyasla daha güçlü antikanserojenik aktiviteye sahip olduğu bulundu. Ayrıca her iki ekstraktın da HT-29 hücrelerine kıyasla MDA-MB-231 hücrelerine karşı önemli anti-proliferatif aktiviteye sahip olduğu görüldü. Ek olarak IC50 konsantrasyonlarında apoptoza uğrayan hücre sayısının kontrol hücrelerine kıyasla yüksek olduğu tespit edildi.

I. viscosa ekstraktlarının farklı hücre hatları üzerine antikanserojenik etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar mevcut olmasına rağmen bu çalışmada kullanılan hücre hatları ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı (32-36). Talib ve Mahasneh (34), *I. viscosa*'nın metanol, hekzan ve kloform ekstraktlarının Hep-2 (larinks karsinoması), MCF-7 (meme epitelyal adenokarsinoması) ve vero (Afrikan yeşil maymunu böbreği) hücre hatları üzerine antikanserojenik etkilerini araştırdı ve MCF-7 hücrelerine karşı metanol ekstraktının (IC50: 15,78 µg/ml) oldukça etkili olduğunu buldular. Yapılan başka bir çalışmada, *I. viscosa*'nın hekzan ve metanol ekstraktlarının MCF-7/S ve HT-1080 hücre hatları üzerine olan etkilerine bakıldı ve çalışma sonunda hekzan ekstraktının her iki hücre hattına da yakın IC50 değerlerinde (MCF-7/S 14,68 µg/ml; HT-1080 15,67 µg/ml) antikanserojenik aktivite gösterdiği tespit edildi (35). *I. viscosa*'nın sulu ekstraktlarının HCT116 ve Colo320 hücre hatları üzerine antikanserojenik etkilerinin araştırıldığı

diğer bir çalışmada, kolorektal kanser hücrelerine doz ve zamana bağlı olarak etkili olduğu saptandı (36). Bahsedilen çalışma sonuçlarına bakılarak, *I. viscosa* ekstraktlarının farklı hücre hatları üzerine antikarsinojenik aktivite gösterdiği sonucuna varılabilir.

Sonuç olarak; *I. viscosa*'nın metanol ve hekzan ekstraktlarının patojen mikroorganizmalar üzerine antibakteriyel, meme ve kolon kanser hücreleri üzerine ise antikarsinojenik özelliklerinin araştırılmasının klinik çalışmalara yön verecek olan alternatif tedaviye yenilikçi bir yaklaşım getireceği

kanısındayız. MDA-MB-231 ve HT-29 kanser hücre hatlarına ek olarak sağlıklı meme ve kolon hücre hattı üzerine bu ekstraktların etkinliğinin gösterilmemesi çalışmanın kısıtlayıcı yanıdır. *I. viscosa*'nın antibakteriyel ve antikanserojenik etkinliğinin tedavi sürecine olan katkıları hakkında yeterli bilgi sağlayabilmek adına daha fazla sayıda suşun ve/veya hücre hattının dahil edildiği geniş ölçekli çalışmalar ile bu çalışma sonuçlarının desteklenmesi gerekmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Tarih:29.06.2021 ve Karar No: 2021.192.06.22).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Tollu G, Erdoğan Eliuz EA. In vitro examination of toothpastes with Cinnamomum cassia methanolic extract. Turk Hij Den Biyol Derg, 2021; 78 (2): 197-204.
2. Gao J, Yu H, Guo W, Kong Y, Gu L, Li Q, et al. The anticancer effects of ferulic acid is associated with induction of cell cycle arrest and autophagy in cervical cancer cells. Cancer Cell Int, 2018; 13 (18): 102-10.
3. Mahmoudi H, Hosni K, Zaouali W, Amri I, Zargouni H, Hamida NB, et al. Comprehensive phytochemical analysis, antioxidant and antifungal activities of *Inula viscosa* Aiton leaves. J Food Saf, 2016; 36 (1): 77-88.
4. Yılmaz B, Erdal B. Anti-cancer activities of curcumin and propolis extracts on MCF-7 breast cancer cell line model. Med Sci, 2020; 9 (4): 877-84.
5. Colak DK, Egeli U, Eryılmaz IE, Aybastier O, Malyer H, Cecener G, et al. The Anticancer effect of *Inula viscosa* methanol extract by miRNAs' re-regulation: an in vitro study on human malignant melanoma cells. Nutr Cancer, 2021; 11: 1-14.
6. Mitić VD, Ilić MD, Stankov Jovanović VP, Djordjevic AS, Marković MS, Stojanović GS. Volatiles composition and antioxidant activity *Inula oculus-christi* L. from Serbia. Nat Prod Res, 2020;34(18):2698-2701.
7. Tepe HD, Ugurlu A, Yazgan I. Determination of phenolic compounds, organic volatile molecules and anti-cancer properties in *Inula viscosa* L., *Viscum album* L. and *Raphanus sativus* L. Sakarya Uni J Sci, 2021; 647-62.
8. Karanović DS, Zorić LN, Perić RD, Lazarević JM, Luković JŽ. Anatomical and micro-morphological analysis of the fruit and vegetative organs of *Inula oculus-christi* L. in the Pannonian part of Serbia. Matica Srpska J. Nat. Sci, 2016; 131: 55-62.
9. Qneibi M, Hanania M, Jaradat N, Emwas N, Radwan S. *Inula viscosa* (L.) Greuter, phytochemical composition, antioxidant, total phenolic content, total flavonoids content and neuroprotective effects. Eur J Integr Med,, 2021; 42. 101291.
10. Topakci N. Sticky elecampane , *Inula viscosa* (L .) aiton (Asteraceae). Int J Agric Innov Res, 2016; 5: 413-6.
11. Taviano MF, Rashed K, Filocamo A, Cacciola F, Dugo P, Mondello L, et al. Phenolic profile, antioxidant and antimicrobial properties of a hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Ficus vasta* Forssk. (Moraceae) growing in Egypt. BMC Compl Alt Med, 2018; 18 (1): 161.
12. Alalan L, Al-Shammaa I, Al-Nouri AS. Analysis of the chemical composition of essential oil extracted from Syrian *Inula viscosa* (L). J Chem Pharm Res, 2015; 7: 861-4.
13. Ren Y, Yu J, Douglas Kinghorn A. Development of anticancer agents from plant-derived sesquiterpene lactones. Curr. Med. Chem, 2016; 23, 2397-2420.
14. Marino A, Zengin G, Nostro A, Ginestra G, Dugo P, Cacciola F, et al. Antimicrobial activities, toxicity and phenolic composition of *Asphodeline anatolica* E. Tuzlaci leaves extracts from Turkey. Nat Prod Res, 2016; 30 (22): 2620-3.

15. Adzu B, Balogun OS, Sérgio ED, Donizeti AI, Mendes SR, Wagner SA, et al. Evaluation of the safety, gastroprotective activity and mechanism of action of standardised leaves infusion extract of *Copaifera malmei* Harms., J Ethnopharmacol, 2015; 175: 378-89.
16. El Yaagoubi OM, Lahmadi A, Bouyahya A, Filali H, Samaki H, El Antri S, et al. Antitumor effect of *Inula viscosa* extracts on DMBA-induced skin carcinoma are mediated by proteasome inhibition. BioMed Research International, 2021; 6687589.
17. El Omari N, El Menyiy N, Zengin G, Goh BH, Gallo M, Montesano D, et al. Anticancer and anti-inflammatory effects of tomentosin: cellular and molecular mechanisms. Separations, 2021; 8 (11), 207-21.
18. Keskin Çavdar H, Yıldırım Zİ, Fadiloğlu S. Evaluation of the effect of geographical origin and extraction solvents on bioactive and antioxidative properties of *Inula viscosa* L. grown in Turkey by chemometric approach. Eur Food Res Technol, 2021; 1-9.
19. Deveci E, Tel Çayan G, Karakurt S, Duru ME. Anticolorectal cancer effects of medicinal plants: *Euphorbia helioscopia*, *Ferula elaeochytris*, and *Sideritis albiflora*. Commagene J Biol, 2021; 73-7.
20. Gökbulut A, Özhana O, Satılmış B, Batçioğlu K, Günel S, Şarer E. Antioxidant and antimicrobial activities, and phenolic compounds of selected *Inula* species from Turkey. Nat Prod Commun, 2013; 8 (4): 475-8.
21. Bayar Y, Genc N. Total Phenolic, Total Flavonoids, antioxidant and antifungal activity of *Inula viscosa* extracts from Turkey. Indian Journals, 2021; 46-54.
22. Lee YH, Lee NK, Paik HD. Antimicrobial characterization of *Inula britannica* against *Helicobacter pylori* on gastric condition. J. Microbiol Biotechnol, 2016; 26 (6): 1011-7.
23. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021.
24. Karakaş D, Arı F, Ulukaya E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. Turk J Biol, 2017; 41: 919-25.
25. Seber ES, Sirin DY, Yetisyigit T, Bilgen T. Piperlongumine increases the apoptotic effect of doxorubicin and paclitaxel in a cervical cancer cell line. Niger J Clin Pract, 2020; 23 (3): 386-91.
26. Karygianni L, Cecere M, Skaltsounis AL, Argyropoulou A, Hellwig E, Aligiannis N, et al. High-level antimicrobial efficacy of representative Mediterranean natural plant extracts against oral microorganisms. BioMed Res Int, 2014; 839019.
27. Al-Snafi AE. Chemical constituents and pharmacological effect of *Inula graveolens* (Syn: *Dittrichia graveolens*)-A review. Indo American J Pharm Sci, 2018; 5 (4); 2183-90.
28. Larbi KS, Meddah B, Meddah ATT, Sonnet P. The Antibacterial effect of two medicinal plants *Inula viscosa*, *Anacyclus valentinus* (Asteraceae) and their synergistic interaction with antibiotic drugs. J Fundam Appl Sci, 2016; 8 (2): 244-55.
29. Mohti H, Taviano MF, Cacciola F, Dugo P, Mondello L, Marino A, et al. *Inula viscosa* (L.) Aiton leaves and flower buds: effect of extraction solvent/technique on their antioxidant ability, antimicrobial properties and phenolic profile. Nat Prod Res, 2020; 34 (1): 46-52.

30. Najefi RB, Asghari G, Abbas A. Antimicrobial activities of phenolic and non-phenolic fractions of *Inula viscosa* (L) Extract. *J Biol Act Prod Nat*, 2011; 1 (5-6): 325-331.
31. Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Pen X. Cancer chemoprevention by natural products: How far have we come? *Pharm Res*, 2010; 27: 950-61.
32. Hepokur C, Budak Y, Karayel HB, Selvi B, Yaylım İ. Investigation of cytotoxic effects of *Inula viscosa* extract *Cumhuriyet Sci J*, 2019; 40 (3): 578-82.
33. Fang XM, Liu B, Liu YB, Wang JJ, Wen JK, Li BH, et al. Acetylbritannilactone suppresses growth via upregulation of krüppel-like transcription factor 4 expression in HT-29 colorectal cancer cells. *Ocol Rep*, 2011; 26: 1181-87.
34. Talib WH, Mahasneh AM. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci Pharm*, 2010; 78 (1): 33-46.
35. Merghoub N, El Btaouri H, Benbacer L, Gmouh S, Trentesaux C, Brassart B, et al. *Inula viscosa* extracts induces telomere shortening and apoptosis in cancer cells and overcome drug resistance. *Nutr Cancer*, 2016; 68 (1): 131-43.
36. Bar-Shalom R, Bergman M, Grossman S, Azzam N, Sharvit L, Fares F. *Inula viscosa* Extract inhibits growth of colorectal cancer cells in vitro and in vivo through induction of apoptosis. *Front Oncol*, 2019; 9: 227.

Borik asitin dezenfektan etkinliğinin araştırılması

Investigation of disinfectant effectiveness of boric acid

Yasemin ZER¹ (ID), Fatma Nur KARABACAK¹ (ID), Ayşe BÜYÜKTAŞ MANAY¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Borik asit doğada bileşikler halinde bulunan ve birçok alanda etkinliği gösterilmiş olan bir elementtir. İnsan ve çevre için toksik olmaması ve doğal yollardan elde edildiğinden ekonomik olması dikkat çeken başlıca özelliklerindedir. Bu çalışma borik asidin dezenfektan etkinliğinin araştırılması amacı ile yapılmıştır.

Yöntem: Liyofilize borik asidin farklı konsantrasyonlarında (%1, 2, 4, 6) süspansiyonları hazırlanarak, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 izolatları ve kan kültürü örneklerinden izole edilen farklı direnç paternine sahip 20 farklı mikroorganizma (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Streptococcus mitis/oralis*) olmak üzere toplam 25 izolata karşı kalitatif süspansiyon yöntemi ile dezenfektan etkinliği araştırılmıştır. Kalitatif süspansiyon yönteminde; farklı konsantrasyondaki borik asit ile seçilen bakteriler 1, 2, 5, 10, 30 dakikalık sürelerde temas ettirilmiştir. Temas süreleri sonunda,

ABSTRACT

Objective: Boric acid is an element that is found as compounds in the nature and has been shown to be effective in many areas. Being non-toxic for human and the environment and economical due to obtained naturally are the main remarkable properties. This study was conducted to investigate the disinfectant efficiency of boric acid.

Methods: A suspension of lyophilized boric acid in different concentrations (1, 2, 4, 6%) was prepared then disinfectant activity against a total of 25 isolates including *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and 20 different microorganisms with different resistance pattern (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Streptococcus mitis/oralis*) isolated from blood samples was investigated by qualitative suspension method. In the qualitative suspension method; boric acid at different concentrations and selected bacteria were contacted for 1, 2, 5, 10, 30 minutes. At the end of the contact periods, neutralizing solution was added to stop the effects of

¹Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Gaziantep



İletişim / Corresponding Author : Yasemin ZER
Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Gaziantep - Türkiye
E-posta / E-mail : yaseminzer@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 20.06.2020
Kabul Tarihi / Accepted : 09.03.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.54251

Zer Y, Karabacak FN, Büyüktaş Manay A. Borik asitin dezenfektan etkinliğinin araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(1): 145 - 152

ekimlerden önce maddelerin etkilerinin durdurulması için nötralizan çözeltisi ilave edildi ve ardından tryptone soya agara ekim yapılmıştır. 48 saat inkübasyon sonunda bakterilerin üreyip üremedikleri değerlendirilmiştir.

Bulgular: Borik asidin %1 konsantrasyonda ve test edilen sürelerde etkinliği saptanmamıştır. %2 konsantrasyonda 5 dakikalık temasta bakterilerin çoğuna ve 10. dakikada tümüne, %4 konsantrasyonda 5. dakikadan itibaren tümüne ve %6 konsantrasyonda 1. dakikadan itibaren tümüne karşı etkin olduğu bulunmuştur. *Candida* spp. türlerinde %1 konsantrasyonda etkinlik saptanmazken, %2'lik konsantrasyonda 1. dakikadan itibaren tümüne etkin bulunmuştur.

Sonuç: Borik asidin düşük konsantrasyonda dâhi bakteri ve *Candida* spp. türlerine karşı etkili antimikrobiyal bir madde olduğu saptanmıştır. Dezenfeksiyon amacı ile kullanıma aday bu madde ile ilgili güvenlik, stabilite gibi değişkenlerin de irdelendiği çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Borik asit, dezenfektan etkinlik, klinik izolat, kalitatif süspansiyon yöntemi

the substances before culturing, and then cultured on tryptone soy agar. At the end of 48 hours incubation, After incubation, the bacteria were assessed for the presence or absence of proliferation.

Results: The efficacy of boric acid at a concentration of 1% and the tested durations was not determined. It was found that boric acid at a concentration of 2% with 5 minutes contact time was efficient against almost all bacteria and to all at 10th minute, to all at 4% concentration since 5th minute and to all at 6% concentration since 1st minute. While efficacy was not determined at 1% concentration in *Candida* spp. species, it found to be effective in all at the 2% concentration from the 1st minute.

Conclusion: It has been found that boric acid is an antimicrobial agent effective against bacteria and *Candida* spp. species even at low concentrations. It will be beneficial to carry out studies that examine variables such as safety and stability related to this substance, which is used for disinfection purposes.

Key Words: Boric acid, disinfectant efficiency, clinical isolate, qualitative suspension method

GİRİŞ

Bor, periyodik tabloda 3A grubunun ilk sırasında yer alan bir element olup yaklaşık 4000 yıldır insanlar tarafından farklı alanlarda kullanılmaktadır (1, 2). Havada, toprakta ve suda 250'nin üzerinde bor bileşiği bulunmaktadır. Borun oksijene ilgisinin yüksek olmasından ötürü borat olarak adlandırılan pek çok bor-oksijen bileşiği bulunur. Bor oksit (B_2O_3) ve borik asit (H_3BO_3) bu bileşikler içerisinde en basit yapıları olanlardır. Çevresel alanlarda bol miktarda bulunan bor rezervlerinin büyük bir kısmı da ülkemizde bulunmaktadır (2).

Bor elementinin okside edilmiş hali olan borik asit kimyasal yapısı itibari ile birçok molekül ile stabil birleşikler yapabilmekte olup, oluşan kompleks

ürünlerin farklı kullanım alanları vardır (2, 3). Bor bileşikleri; cam, seramik, temizlik, beyazlatma, kozmetik, metalurji, nükleer enerji, bilgisayar ve uçak sanayi, tarım ve sağlık alanı gibi alanlarda kullanılmaktadır. Bor, kalsiyum, magnezyum ve fosfor mineralleri ile D vitamininin vücutta korunmasına ve etkili bir şekilde kullanılmasına yardımcı olarak diş ve kemik sağlığının korunmasına katkıda bulunur. İnsan için eser elementlerden birisi olan bor vücutta çeşitli metabolik fonksiyonların gerçekleşmesinde de önemlidir (2, 4). Borun insan dokularında biyokimyasal etki mekanizması ile ilgili çok az veri bulunmaktadır. Düşük molekül ağırlığına sahip olması ve cis-hidroksil grubu içeren organik moleküller (polisakkaritler, adozin-5-fosfat, piridoksin, riboflavin, dehidroaskorbik asit, piridin

gibi) ile reaksiyona girmesinin biyolojik fonksiyonu için önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca borun hücre zarı fonksiyonlarında ve stabilitesinde, hormon reseptörleri ve transmembran sinyallerde etkili olabileceği düşünülmektedir (5). Medikal olarak bor bileşikleri osteoporoz ve romatoid artrit, Bor Nötron Yakalama Tedavisi (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) ile nükleere tıp alanında, yara ve yanık bakımında, antiseptik olarak lens solüsyonlarında, merhemlerde, gargaralarda ve göz damlalarında kullanılmaktadır. Ayrıca multiple myelom tedavisinde “Bortezomib” adlı, bor içeren ve Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylı bir ilaç kullanılmaktadır (2, 6-8).

Besin ve su ile bor alımı coğrafik koşullara ve diyetsetel özelliklere bağlı olarak değişse de günlük toplam 1-7 mg'dır. İnsanlar için borik asidin en düşük letal dozu ağız yolu ile alındığında 640 mg/kg, deri yoluyla alındığında 8600 mg/kg, enjeksiyonla alındığında 29 mg/kg'dır. İnsanların bir günde toplamda 500 mg daha fazla borik asit alması durumunda; sindirim sistemi bulguları (bulantı, kusma, ishal), merkezi sinir sistemi bulguları (baş ağrısı, karın ağrısı, baş dönmesi, oryantasyon bozukluğu, istemsiz kas kasmaları gibi), şok, halsizlik, ve deri döküntüleri görülebilir. Gıda ve içme suyu ile günlük alınan bor miktarı bu anlamda toksik değil anabolik etkinliğe sahiptir (6).

Dezenfektan maddelerin etkinliğini belirlemek için farklı kriterlere göre değişik testler kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan süspansiyon testleri kolay uygulanabilir ve ekonomik olması, temas süresi, sıcaklık, mikroorganizma türleri gibi aynı anda birçok değişkeni inceleyebilme olanağı sağlamaları nedeniyle tercih edilen testlerdir. Temel prensip, belli konsantrasyonda dezenfektanın standart bakteri süspansiyonu ile belirli sürede temas ettirilip, sürenin sonunda üzerine “nötralizan” olarak ifade edilen kimyasal maddelerle dezentektan etkinliğinin durdurulmasıdır. Dezenfektanın bakteriler üzerindeki etkisini durdurmak amacıyla değişik nötralizan maddeler kullanılabilir (9). Nötralizan ilavesinden sonra bakterinin katı

besiyerine yapılan pasajında kültürde üreme olması veya olmamasına göre değerlendirilerek, etkisiz veya etkili olduğu belirlenmektedir (10). Değişik ülkelerde dezenfektanların kullanım amacına ve etki etmesi beklenen değişik mikroorganizma gruplarına yönelik olarak farklı standartlar tanımlanmıştır. Türk Standartlar Enstitüsü tarafından kabul edilen TS EN 13727+A2 sayılı standard örnek olarak verilebilir (11). Çalışmamızda bir çok kullanım alanına sahip ve ülkemizde çok miktarda rezervi olan doğal bir maden borik asidin standart referans suşların izolatlarına ve kan kültürü örneklerinden izole edilen farklı mikroorganizmalara karşı dezenfektan etkisi ve etki süresinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Kasım 2019-Şubat 2020 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışma öncesi yerel etik kuruldan 2019/213 numaralı çalışma onayı alınmıştır.

Çalışılacak örnek grubunun oluşturulması: Laboratuvarın kültür koleksiyonunda bulunan standart bakteri izolatları ve çalışma grubu olarak belirlenerek -20 °C'de dondurulmuş olan klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmalar kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen mikroorganizmalar; *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. mutans* ATCC 25175 izolatları ve kan kültürü örneklerinden izole edilen 20 farklı mikroorganizma (tüm izolatlardan iki adet olmak üzere; *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *S. mitis/oralis*) olmak üzere toplam 25 izolat belirlenmiştir. Çalışmaya alınan kan kültürü örneklerinde BacT/ALERT 3D (Biomérieux, Fransa) sistemi kullanılmıştır. Bakterilerin tanımlanmaları ve antibiyotik duyarlılık testleri VITEK 2 Compact (bioMérieux, Fransa) sistemi ile yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility

Testing EUCAST) kriterlerine göre değerlendirilmiştir (12). Çalışmaya dahil edilen klinik örneklerle ait izolatlar; farklı gruplardan ve kendi gruplarında önemli direnç mekanizmaları göz önüne alınarak seçilmiştir;

-Gram negatif bakteriler çoklu ilaca direnci olan (üç veya daha fazla antimikrobiyal sınıfa dirençli) (13),

- *S. aureus* ve *S. epidermidis* sefoksitine dirençli (MRSA, MRSE),

- *E. faecalis* vankomisine dirençli (VRE),

-Antifungal etkinliğin araştırılması için de *C. albicans* ve *C. parapsilosis*.

Kalitatif süspansiyon yöntemi: Liyofilize borik asidin (Sigma, Almanya, >%99,5 konsantrasyon) steril serum fizyolojik (%0,9) içerisinde farklı konsantrasyonlarında (%1, 2, 4, 6) süspansiyonları testin çalışılacağı gün hazırlanmıştır. Seçilen mikroorganizmalar 1, 2, 5, 10 ve 30 dakikalık sürelerde farklı konsantrasyondaki borik asit ile temas ettirilmiştir (10). Araştırılan konsantrasyon ve sürede, mikroorganizma ve bor çözeltisinin temas ettirilmesinden sonra reaksiyonun durdurulması için nötralizan çözelti ilave edilmiştir. Nötralizan çözeltisi; saponin (Sigma, Almanya) %3, L-Cysteine (Sigma, Almanya) %0.1, L-Histidine (Sigma, Almanya) %0.1 ve tween 80 (Sigma, Almanya) %3 son konsantrasyonlarında olacak şekilde Tryptone Soya Broth (TSB) (Oxoid) ile hazırlanmış ve otoklavda steril edilerek kullanılmıştır.

Tryptone Soya Agarda (TSA) (Oxoid, İngiltere) üretilen mikroorganizmaların 24 saatlik kolonilerinden TSB'da 0,5 McFarland (10^8 kob/mL) bulanıklığında bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Her bakteri için test edilecek borik asit sulandırımından 1000 µL tüplere konularak hazırlanan bakteri süspansiyonundan 10 µL ilave edilmiş ve 1, 2, 5, 10 ve 30 dakika sürelerde oda ısısında bekletilmiştir. Sürelerin sonunda mikroorganizma ve borik asit karışımından 100 µL alınıp önceden her çalışma dakikası için ayrı olarak hazırlanmış olan 900 µL nötralizan madde içeren tüplere ilave edilmiştir. Bu

karışımından 10 µL alınıp TSA'ya ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra besiyerleri 37 °C'de 48 saat inkübe edildikten sonra üreme varlığı yönünden kontrol edilmiştir. Üreme varlığı test edilen konsantrasyon ve süre için borik asidin etkisiz olduğu, üreme olmaması etkili olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Çalışmada, negatif kontrol olarak; bakteri ilave edilmemiş borik asit süspansiyonu (%1 konsantrasyon) ve pozitif kontrol olarak; borik asit ilave edilmemiş 0,5 McFarland bulanıklığında mikroorganizma süspansiyonu kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya beş adet referans suş ATCC suşu ve 20'si kan kültürü örneklerinden izole edilmiş izolatlardan olmak üzere toplam 25 izolat dahil edilmiştir.

Borik asidin %1 konsantrasyonda ve test edilen sürelerde bakteri izolatlarına karşı etkinliği saptanmamıştır. %2 konsantrasyonda 5 dakikalık temasla bakterilerin çoğuna ve 10. dakikada tümüne, %4 konsantrasyonda 5. dakikadan itibaren tümüne ve %6 konsantrasyonda 1. dakikadan itibaren tümüne karşı etkin olduğu bulunmuştur. Test edilen her iki *Candida* spp. türünde de %1 konsantrasyonda etkinlik saptanmazken, %2, %4 ve %6 konsantrasyonda 1. dakikadan itibaren borik asidin etkin olduğu ve *Candida* spp. izolatlarının üremesini engellediği saptanmıştır (Tablo 1).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Dezenfeksiyon; cansız yüzeylerde bulunan patojen mikroorganizmaların öldürülmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu amaç için kullanılan dezenfektanların etki ettikleri mikroorganizma grupları farklı olup, kullanım amacına göre farklı etkinlik düzeyinde dezenfektanlar seçilmektedir. "İyi" olarak ifade edilen dezenfektanlarda antimikrobiyal etkinlik yanı sıra; kullanıcı ve çevreye toksik olmaması, ekonomik olması gibi nitelikler

Tablo 1. Borik asidin farklı konsantrasyonlarda ve farklı temas sürelerinde antimikrobiyal etkinliği

İzolant	%1 konsantrasyon Süre (dakika)					%2 konsantrasyon Süre (dakika)					%4 konsantrasyon Süre (dakika)					%6 konsantrasyon Süre (dakika)				
	1	2	5	10	30	1	2	5	10	30	1	2	5	10	30	1	2	5	10	30
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. baumannii</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> (MRSA)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> (MRSE)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> (VRE)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. mitis/oralis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Etkisiz, -: Etkili

de bulunmaktadır (14). Bu çalışmada, doğal bir element olan, toksik yan ürünleri bulunmayan ve ülkemizde çok miktarda bulunduğu ekonomik olabileceği düşünülen borik asidin antimikrobiyal

etkinliği araştırılarak, bu amaçla kullanımı açısından irdelenmesi amaçlanmıştır. Çoklu dirençli klinik izolatlardaki etkinliğin çalışılması bu çalışmanın farklılığını oluşturmaktadır.

Borik asidin antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesine yönelik *in vitro* çalışmalar yapılmıştır (7, 15). Baygar ve ark. (16) tarafından yapılan çalışmada, hidroksiapatit ve borik asidin *C. albicans* ATCC 10239, *S. aureus* ATCC 25923, *S. mutans* ATCC 25575 ve *Streptococcus sanguis* ATCC 10556 suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, hidroksiapatitin tek başına test edilen mikroorganizmalara karşı hiçbir antimikrobiyal etki göstermediği, buna karşın borik asidin 29 mm inhibisyon zonu olan *C. albicans*'a karşı oldukça aktif olduğu tespit edilmiştir. Kumara ve ark. (17) yapmış oldukları çalışmada, yara enfeksiyonlarına yol açtığı bilinen *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı üç asidik kimyasal maddenin (asetik asit, askorbik asit ve borik asit), etkilerini incelemişlerdir. Borik asidin %0,5, %0,75 ve %1 konsantrasyonlarda bakterisidal etki göstermediği, bununla birlikte 30 dakikadan sonra her üç asitin de (asetik asit, askorbik asit ve borik asit) bütün suşlara karşı bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Haesebrouck ve ark. (18), %2'lik borik asit ve %2'lik asetik asidin eşit miktarlarda karıştırılmasıyla elde edilen solüsyonun 1/2 ve 1/4'lük sulandırımalarında, 5×10^7 cfu/mL miktarındaki *Staphylococcus pseudintermedius*'u 30 dakikada inaktive ettiğini, borik asidin söz konusu aktivitesi için asetik asitle birlikte kombine edilmesinin daha etkili sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, 20 adet tek kanallı premolar diş örneği, *E. faecalis* ile kontamine edilerek borik asidin %2, 4 ve 6 oranlarındaki çözeltileri ile muamele edilmiş ve %6 konsantrasyonda güçlü antibakteriyel ve biyofilm etkisi olduğu bildirilmiştir. Çalışmada, kök kanal asepsisi amacıyla borik asidin yüksek konsantrasyon ve uzun süre muamele sonucunda kullanılabilirliğini

vurgulamışlardır (7). Yapılan başka bir çalışmada, borik asit ve boraksın yüksek dozlarda toksik olabileceği hipotezi ile, çeşitli standart bakteri izolatlarına (*S. aureus*, *Acinetobacter septicus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*) etkin olan minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) belirlenmiştir (19). Borik asidin yüksek konsantrasyonda riboz şekerine bağlanma afinitesi bulunmakta olup, yapısında riboz içeren ATP, NADP, RNA gibi biyolojik moleküllere bağlanma, hücrel protein sentezinin bozulması, mitokondrial fonksiyon bozukluğu, hücre bölünmesi ve gelişiminin bozulmasına neden olarak yüksek dozlarda toksik etkisi olabileceği belirtilmiştir. İlhan ve ark. (20) yapmış oldukları benzer bir çalışmada, *Listeria monocytogenes* ve *S. aureus*'un standart izolatları ile için MİK konsantrasyonunu belirlemişlerdir. MİK ve MBK araştırmalarının borik asidin sistemik kullanımına yönelik katkı sağlamayı hedeflemiştir. Nitekim borik asidin antimikrobiyal ilaç olarak kullanılmasına yönelik bazı faz çalışmaları da bulunmamaktadır. (21).

Çalışmamızda, borik asidin %1 konsantrasyonda ve test edilen sürelerde etkinliği saptanmamış, %6 konsantrasyonda ise 1. dakikadan itibaren tüm mikroorganizmalara karşı etkin olduğu bulunmuştur. *Candida* spp. türlerinde %1 konsantrasyonda etkinlik saptanmazken, %2'lik konsantrasyonda 1. dakikadan itibaren tümüne etkin bulunmuştur. Düşük konsantrasyonlarda dahi borik asidin *in vitro* olarak dirençli mikroorganizmalara karşı etkin olduğu bulunmuştur. Yapılacak ileri çalışmalarla, dezenfeksiyon spektrumunun belirlenmesinin etkinlik yanısıra güvenlik ve stabilite yönünden de araştırılmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:22.05.2019 ve Karar No: 2019/213).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Yılmaz, A. Her derde deva hazinemiz Bor, TUBİTAK-Bilim ve Teknik Dergisi, 2020: 38-41.
2. Yakıncı ZD, Kök M. Borun sağlık alanında kullanımı. İnönü Üni Sağlık Hiz Meslek Yük Okul Derg, 2016; 4: 36-44.
3. Peters JA. Interactions between boric acid derivative sandsaccharides in aqueousmedia: Structure sandstabilities of resultingesters, Coord Chem Rev, 2014; 268: 1-22.
4. Pizzorno L. Nothing boring a boutboron. Integr Med (Encinitas), 2015; 14 (4): 35-48.
5. Kabu M. Akosman MS. Biological effects of boron. Rev Environ Contam Toxicol, 2013; 225: 57-75.
6. Kuru R, Yarat A. Bor ve sağlığımıza olan etkilerine güncel bir bakış. Clin Exp Health Sci, 2017; 7 (3): 107-14.
7. Zan R, Hubbezoglu I, Ozdemir AK, Tunç T, Sumer Z, Alıcı O. Antibacterial effect of different concentration of boric acid against Enterococcus faecalis biofilms in rootcanal. Marmara Dent J, 2013; 1 (Suppl 2): 76-80.
8. Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü. <http://www.boren.gov.tr/tr> (Erişim Tarihi: 25.12.2020).
9. Abbasoğlu U. Dezenfektanların mikroorganizmalar üzerine etkinliğini ölçen testler. 3. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi. 02-04 Ekim, Samsun, 2003.
10. Abbasoğlu U. Dezenfektan direncini belirleyen testlere global bir bakış. Hangi testler hangi sıra ile yapılmalıdır? En ucuz ve kesin sonuç nasıl elde edilir? 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi. 20-24 Nisan, Samsun, 2005.
11. TS EN 13727+A2. Kimyasal dezenfektanlar ve antiseptikler - nicel süspansiyon deneyi - Tıbbi alanda bakteri öldürme etkinliğinin değerlendirilmesi için - Deney yöntemi ve gerekler (aşama 2, basamak 1)..

12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016.
13. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multi drug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 2012; 18: 268-81.
14. Abbasoğlu U. Dezenfektanlar: Sınıflama ve amaca uygun kullanım alanları 6. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 2009; 109-120.
15. Saita K , Nagaoka S, Shirosaki T, Horikawa M, Matsuda S, Ihara H. Preparation and characterization of dispersible chitosan particles with borate crosslinking and their antimicrobial and antifungal activity. *Carbohydr Res*, 2012; 349:52-8.
16. Baygar T, Boran R, Sarac N, Ugur A, Ceylan O, Guvensen NC, et al. Synergistic antimicrobial activity of boric acid and biosynthesized-hydroxyapatite against oral pathogenic microorganism. The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity, 05-08 July, Minsk - Belarus, 2017.
17. Kumara DUA, Fernando SSN, Kottahachchi J, Dissanayake DMBT, Athukorala GIDDAD, Chandrasiri NS, et al. Evaluation of bactericidal effect of three antiseptics on bacteria isolated from wounds. *J Wound Care*, 2015; 24 (1): 5-10.
18. Haesebrouck F, Baele M, De Keyser H, Hermans K, Pasmans F. Antimicrobial activity of an acetic and boric acid solution against *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr*, 2009; 78: 89-90.
19. Yılmaz MT. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turk J Med Sci*, 2012; 42: 1423-9.
20. İlhan İ, Ekin İH, Gülaydın Ö. Antimicrobial activity of boric acid solution against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Van Vet J*, 2019; 30 (3): 163-6.
21. Baker SJ, Ding CZ, Akama T, Zhang YK, Hernandez V, Xia Y. Therapeutic potential of boron-containing compounds. *Future Med Chem*, 2009; 1: 1275-88.

Yumurtalık kanserinde hedefe yönelik tedavi stratejilerinde moleküler mekanizmaların rolü

The role of molecular mechanisms in targeted therapy strategies in ovarian cancer

Betül ÇOLAK¹ (ID), Demet CANSARAN DUMAN¹ (ID), Erkan YILMAZ¹ (ID)

ÖZET

Kanser, kontrol edilemeyen hücre bölünmeleri sonucunda doku ve organlarda meydana gelen hasarların bütünüdür. Farklı görülme sıklığı ve ölüm oranları ile ilişkili birçok kanser türü vardır. Yumurtalık kanseri dünya genelinde yaygınlık olarak yedinci sırada gelmekte olup kansere bağlı ölüm nedeni olarak beşinci sırada gelmektedir. Kanser türlerinin kendi içinde standart tedavi yöntemleri olmasına rağmen bireyler bu tedavi yöntemlerine farklı cevaplar vermektedir. Geliştirilen tüm tedavi stratejilerine rağmen yumurtalık kanseri hala yüksek ölüm oranına sahiptir. Bu sebeple günümüzdeki tedavi yöntemlerinin etkinliğini engelleyen ilaca karşı oluşan direnç mekanizmalarını kavramak, yeni tedavi yöntemleri geliştirmek ve moleküler karakterizasyonunu belirlemek oldukça önemlidir. Son yıllarda oldukça gündeme gelen yumurtalık kanserinde hedefe yönelik terapi stratejileri geliştirilmesi kapsamında yolak analizleri üzerine odaklanılmıştır. Bu kapsamda onkoproteinlerin WNT, Hedgehog ve NOTCH sinyal yolağı gibi yolaklardaki etkinlik durumları değerlendirilmiştir. Ayrıca, son yıllarda etkinliği belirlenmiş Nanog proteini ve fotodinamik tedavi seçeneklerinin yumurtalık kanseri üzerindeki yenilikçi tedavi etkinliği detaylandırılmıştır. Yumurtalık kanseri tedavisinde mevcut ve geliştirilmesi

ABSTRACT

Cancer is a disease that occurs in tissues and organs as a result of uncontrolled cell divisions. There are numerous types of cancer related with different frequencies and mortality rate. Ovarian cancer is the seventh common type of cancer worldwide and is the fifth cause of cancer-related death. Although there are standard treatment methods for cancer types, people give different responses to these treatment methods. In spite of all the treatment strategy developed, ovarian cancer still has a high mortality rate. For this reason, it is very important to better understand the drug resistance mechanisms that prevent the effectiveness of today's treatment methods, to develop new treatment methods and the determination of molecular characterization. In recent years, research has focused on methods containing pathway analysis within the scope of developing targeted therapy strategies for ovarian cancer. In this context, the activity status of onco-proteins in pathways such as WNT, Hedgehog and NOTCH signaling pathways were evaluated. In addition, the innovative treatment efficiency of Nanog protein and photodynamic therapy options on ovarian cancer has been detailed in recent years. It will be possible to increase the quality of the healing process of

¹Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Demet CANSARAN DUMAN

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı, Tandoğan / Ankara - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 24.02.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.60362

Çolak B, Cansaran Duman D, Yılmaz E. Yumurtalık kanserinde hedefe yönelik tedavi stratejilerinde moleküler mekanizmaların rolü
Turk Hij Den Biol Derg, 2021; 79(1): 153 - 162

hâlâ devam eden tedavi yöntemlerinin moleküler karakterizasyonlarının aydınlatılması ile bu hastalıktan şikayeti olan hastaların iyileşme süreçlerinin kalitesinin artırılması mümkün hâlâ gelebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Yumurtalık kanseri, hedefe yönelik tedavi, moleküler karakterizasyon

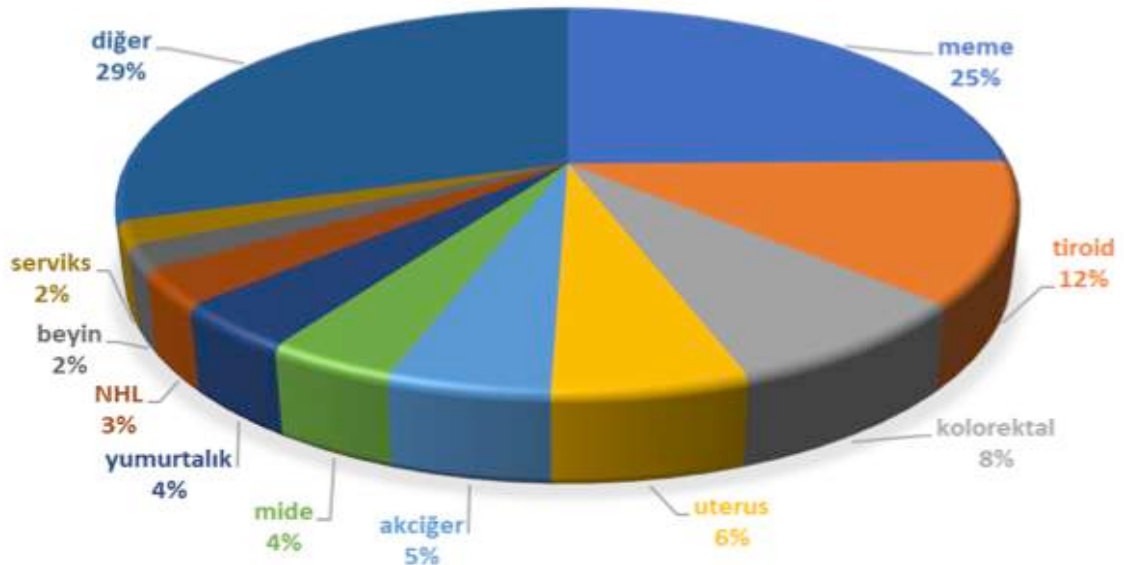
patients suffering from this disease by enlightening the molecular characterizations of the treatment methods that are available and still being developed in the treatment of ovarian cancer.

Key Words: Ovarian Cancer, targeted therapy strategies, molecular characterisation

GİRİŞ

Kanser, kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ve çoğalması olarak tanımlanan, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında olan oldukça karmaşık yapıya sahip bir hastalıktır (1). Kanser hücreleri büyümek için, normal bir hücrenin gerek duyduğu büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaz. Bu nedenle hücrenin normal büyüme süresine uymaz. Kanser türlerinin kendi içinde standart tedavileri olmasına rağmen

bireyler bu tedavilere farklı cevaplar vermektedir. Bu durum kanserin kişisel bir hastalık olduğunu gösterir. Erkekler ve kadınlarda akciğer kanseri en sık görülen ve ölüm ile sonuçlanan kanser türüdür. Prostat kanseri erkeklerde, meme kanseri ise kadınlarda ikinci sırada gelmektedir (2). Yumurtalık kanseri ise dünya genelinde yaygınlık olarak yedinci sırada gelmekte olup, kansere bağlı ölüm nedeni olarak beşinci sırada gelmektedir (3, 4). Kadınlarda görülen kanserlerin yüzde dağılımları Şekil 1’de verilmiştir.



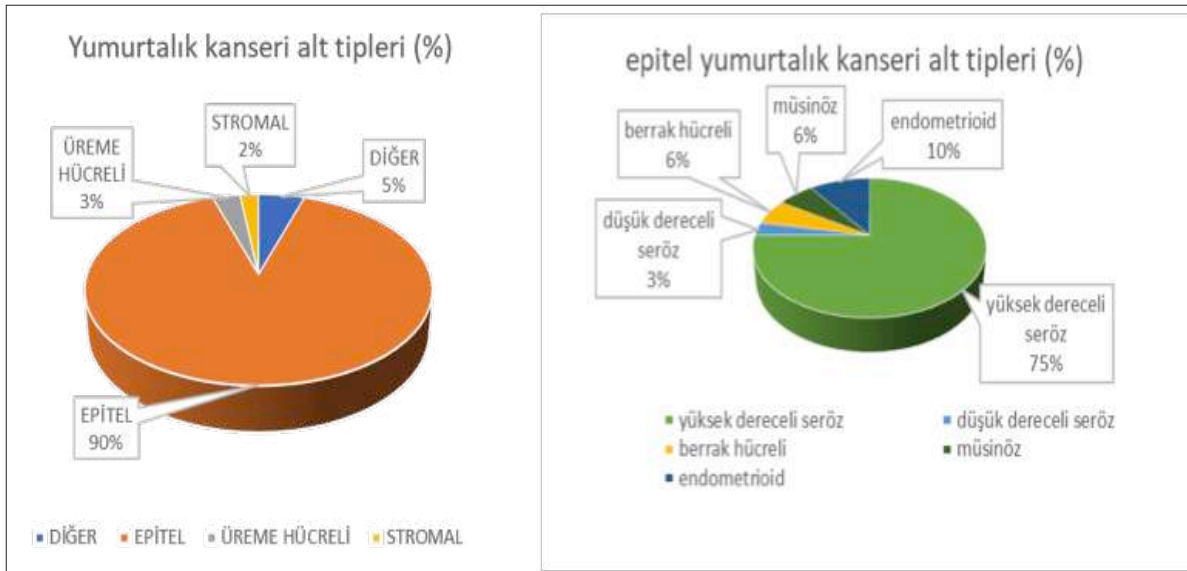
Şekil 1. Kadınlarda görülen kanserlerin yüzde dağılımları

Yumurtalık Kanseri Alt Tipleri

Tüm jinekolojik kanserlerde olduğu gibi yumurtalık kanserinde de erken teşhis, tedavi için umut vaat etmektedir. Ancak ileri evredeki bir yumurtalık kanserinde yüksek morbidite, erken teşhisin güçlüğü ve gelecek vadeden tarama araçlarının eksikliği nedeniyle hayatta kalma oranı oldukça düşüktür (5). Tümörleşme sürecinin başladığı yer, yumurtalık kanserinin türünü belirler. Yumurtalık kanserine neden olan bu tümörler temelde üç gruba ayrılır (6, 7). Bunlar epitel, stromal ve üreme hücreli tümörlerdir. Epitel tümörler tüm yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluştururlar. Tümörleşme süreçleri yumurtalıkların dışını kaplayan doku katmanında başlamaktadır. Stromal tümörlerin tümörleşme aşamaları ise yumurtalık dokusunda başlar. Yumurtalık dokusu hormon üreten hücreleri içermektedir. Hormonal sistemin hızlı yanıt özelliğinden dolayı bu tümörlerin teşhis edilmesi çoğunlukla diğer yumurtalık tümörlerinden daha çabuk olabilir. Erken teşhis kolaylığından ötürü stromal tümörler tüm yumurtalık tümörlerinin %2'sini oluşturmaktadır (7, 8). Üreme hücreli tümörler, yumurtalık hücrelerinde

başlamaktadır. Oldukça düşük görülme oranına sahip olan bu yumurtalık kanseri daha çok genç yaşlardaki kadınlarda görülmektedir (9). Bu gruplar dışında ender olarak hematolojik malignitelerin metastazlarına bağlı tutulumlarda görülebilir.

Epitel yumurtalık karsinomunun başlıca histolojik alt tipleri, seröz, berrak hücreli, müsinöz ve endometrioid tümörleri içerir. Bunlar tip 1 karsinomlar olarak adlandırılır. Yüksek dereceli seröz karsinomlar ise tip 2 karsinom olarak adlandırılır ve en yaygın olanıdır. Tipik olarak fallop tüpü ve yumurtalık sınırlarının ötesine yayıldıktan sonra teşhis edilir. Oldukça heterojen bir hastalıktır. Yumurtalık kanserinin yaklaşık olarak %68'ini yüksek dereceli seröz karsinomlar oluşturmaktadır ve geç teşhis edilmesi sebebiyle olumsuz prognoza sahiptirler. Vakaların yaklaşık %80'inde TP53 gen mutasyonları görülmektedir (10-13). Yüksek dereceli seröz karsinomların ise yaklaşık %90'ı BRCA1 ve BRCA2 genlerinde görülen mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (14). Yumurtalık kanserinin alt tiplerinin istatistiksel dağılımı Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Yumurtalık kanserinin alt tiplerinin istatistiksel dağılımı (9)

Yumurtalık Kanseri Tedavi Yöntemlerine Genel Bakış

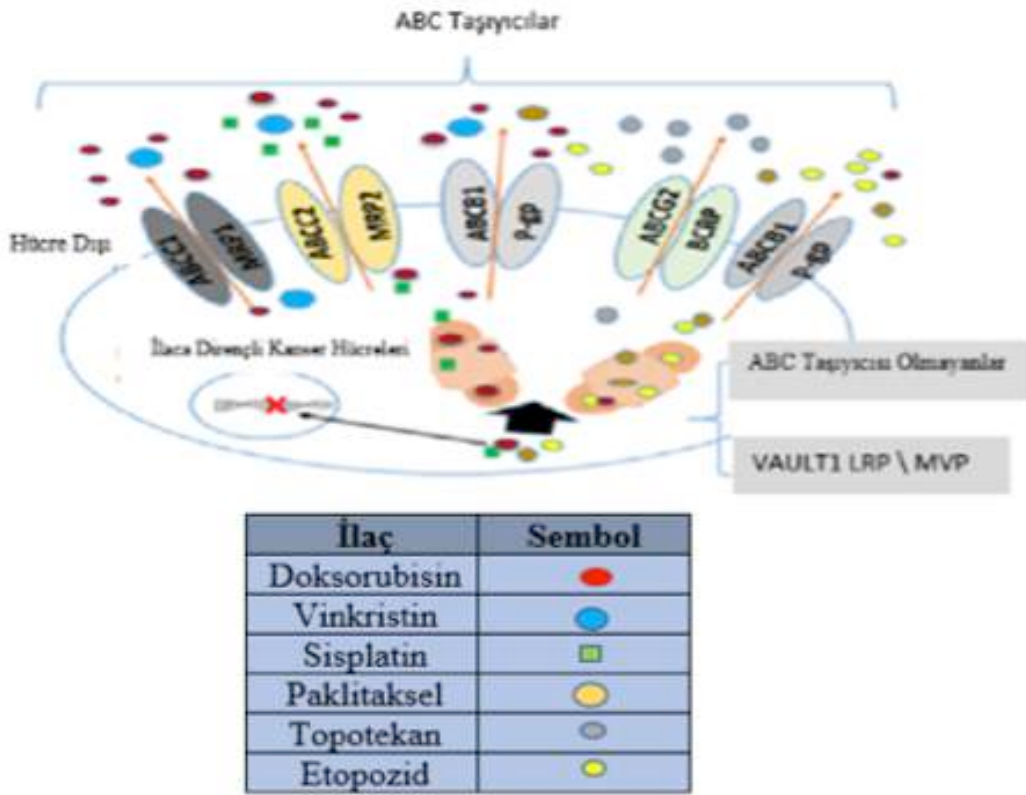
Yumurtalık kanseri tipik olarak nüks oranı yüksek bir malignitedir. Farklı kanser türleri için tedavi seçenekleri tümörün patolojik aşamasına bağlıdır. Güncel tedavi yöntemleri; cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyasyon terapisini birleştirmektedir. Kemoterapi tedavi sürecinin en önemli kısmını içerse de yenilikçi tedavilere ihtiyaç vardır. Bunlardan bazıları; kök hücre tedavisi, hormon tedavisi ve biyolojik yöntemlerdir. Biyolojik yöntemler kendi aralarında immünoterapi, antikor tedavileri, aşılar, inhibitörler ve gen terapisi olarak gruplandırılabilir. Her tedavi yönteminin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Ayrıca tedavi yöntemleri de kişiden kişiye değişmektedir. Bu durum kanserin kişisel bir hastalık olduğunu göstermektedir. Dolayısı ile kanserin tek ve kesin bir tedavisinden bahsetmek mümkün değildir. Uygun olan tedavi yöntemleri tek başına veya birlikte uygulanabilir (15).

Prostat, yumurtalık ve meme kanserleri heterojen yapıya sahiptir ve hasta da zaman içerisinde gelişen terapötik direnç sorunları ile karşı karşıyadır. Yumurtalık kanseri tedavisinde geleneksel ve yenilikçi tedavi yaklaşımları mevcut olsa da hastalarda zamanla ilaca bağlı direnç veya ilaç toksisitesi hastalığın seyrini hâlâ etkilemektedir. Kullanılan bu ilaçlar kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücreler üzerinde de toksik etki göstermektedir. Bu durum ise etkilenen sağlıklı hücrelerin bulunduğu organların zarar görmesine sebebiyet vermektedir.

Yumurtalık kanserinde ilaç direnci mekanizmasını anlamak için araştırmalar devam etmektedir. Artan DNA onarımını, yüzey P170-glikoproteininin ifade seviyesinin aşırı artışı, artan hücresel glutasyon seviyelerini (GSH) de içeren birçok mekanizma bulunmaktadır (16, 17). Kanser hücreleri, tedavide etkili olan ilaç dozlarını elimine edebilecek taşıma proteinleri üretebilirler. Klasik ilaç direnci, ATP'ye bağımlı glikoprotein Pgp'yi kodlayan yüksek düzeyde MDR-1 geninden kaynaklanmaktadır (17, 18). Pgp, ilacı hücrelerin dışına taşıyarak hücrelerdeki

sitotoksik ilaçların seviyelerinin azalmasına neden olur. Kemoterapi genellikle kanser hücrelerinde Pgp'nin ifade seviyesini düzenler ve bu durum ilaç direnci ile sonuçlanır. Pgp ifadesi olmayan hücrelerin direnç mekanizmasına karşı farklı yöntemleri vardır. İlaç direnci ile ilişkili protein (MRP)'nin seviyesinin hücre içinde artması, ilacı hücreden dışarı atan bir proteinin varlığı ile belirlenmiştir. MRP1, ABCC1'den kodlanırken; MRP2 de ABCC2'den kodlanır. Özellikle yumurtalık kanserinde yaygın olarak kullanılan sisplatin ile birçok kanser ilacına karşı direnç oluştururlar (17, 19). Yumurtalık kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapötik ajanlar ve onların direnç mekanizmasında rol alan proteinler Şekil 3'teki gibi ifade edilmektedir (17).

Maya ve memeli sisteminde bakır taşıyıcı CTR1, platin bileşiklerinin alımına aracılık eden taşıyıcılardan biridir (20). Sisplatin, CTR1'in hızlı bozulmasıyla hücresel akışını azaltır ve bu da ilaç direncine neden olur. Hücreler tarafından CTR1 ifade seviyesinin artması, platin konsantrasyonunun artmasına ve sisplatine direncin azalmasına neden olur (21, 22). Bakır taşıyıcı ekspresyonu için bir modülatör olan bortezomib ile platin ilaçların kombinasyonu, platine dirençli katı tümörler için güncel bir seçenektir (23). Yumurtalık kanseri hücrelerinde sisplatine direnç gösteren hücrelerde birçok epigenetik değişiklik saptanmıştır ve bu durum direnç mekanizmasının anlaşılması için yeni yollar göstermiştir. Kanser hücresi popülasyonu içindeki bazı hücrelerin, potansiyel ölümcül maruziyetle popülasyonun ortadan kaldırılmasını önlemek için tersine çevrilebilir ilaç toleransı durumuna ulaştığı gözlenmiştir (24). Kromatin durumunu değiştirmek ve IGF-1'i devreye almak, insülin benzeri büyüme faktörü ilaç direncini artıracaktır. IGF-1 reseptör inhibitörleri ile tedavi sürecinin etkinliğin artması ile oluşan bu süreç önemli bir terapötik strateji olabilecektir. Ayrıca folat bağlayıcı gibi sitotoksik genleri inaktive ederek kanser hücrelerinde, DNA hipermetilasyonu çoklu ilaca dirençli fenotiplerin oluşturulmasında kritik rol oynar (25). ABCG2 tarafından kodlanan bir



Şekil 3. Yumurtalık kanserinde direnç mekanizması (17)

başka iyi bilinen taşıyıcı, meme kanserine dirençli proteinin yumurtalık ve göğüs kanserlerinde aşırı ifade edildiği bulunmuştur. Normal epitel hücrelerinin ilaca dirençli kanserli hücrelere dönüşme mekanizması epitelyal mezankimal geçişi aktive etmektir (26). Yumurtalık kanseri hastalarında zaman içerisinde oluşan ilaç direnci gibi birçok önemli etkeni etkin tedavi yöntemleri ile en aza indirip başarı oranı yüksek tedavi seçenekleri oluşturmak için hedefli çalışmalar her geçen gün artmaktadır.

Yumurtalık Kanserinde Hedefe Yönelik Terapi Stratejileri

Geliştirilen tüm tedavi stratejilerine rağmen, yumurtalık kanseri hala yüksek bir ölüm oranına sahiptir. Son yıllarda yumurtalık kanserinde hedefe yönelik terapi stratejileri kapsamında gerçekleştirilen

birçok çalışmada, odaklanılan yollar ve bu yollara özgü tedavi seçenekleri yer almaktadır. Ovaryum kanser hücrelerinde, kontrolsüz hücre proliferasyonu, hücre farklılaşmanın bloke edilmesi, apoptoz yolağı, değişmiş doku yapısı gibi kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerine sebep olmak üzere yolların aktivitesi artmış veya inaktif olabilir. Ovaryum kanserinde tedavisinde veya kemoterapilere karşı zamanla oluşan direnç nedeniyle yollarda oluşan farklılaşmaların moleküler karakterizasyonun belirlenmesi ile daha etkin tedavi yaklaşımlarının hastalara sunulması mümkün olabilmektedir. Bu çalışmamız ile ovaryum kanseri üzerine gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda belirlenen bazı yolların hastalık üzerindeki etkinliği hakkında bilgi verilmesi sağlanmıştır.

Apoptoz yolağı

Apoptoz, intrinsik ve ekstrinsik yol olmak üzere iki yolla gerçekleşir. Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, hücre içi Ca⁺⁺ düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise; büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS - FAS ligand aracılığı ile apoptoz, TNF aracılığı ile apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon)'dir. Her iki sinyal yolunda da kaspazlar görev almaktadır. Hücre içi sinyaller intrinsik apoptoz yolunu devreye sokarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yol ile apoptozu indüklerler (27-29).

Yumurtalık kanserinde, kanserli hücreleri öldürmek yerine onların gelişmesine olanak sağlayan bazı genler vardır. Bcl-2 ailesi proteinleri ve tirozin-protein kinazlar, sırasıyla iç ve dış apoptoz yollarında aktif iken, apoptoz inhibitörü proteinleri (IAP) hem iç hem dış apoptoz yolağında aktiftir. Bcl-2 anti-apoptotik proteini yumurtalık kanserinde oldukça yüksek konsantrasyonlar da ifade edilir (30-32). Ayrıca Bcl-X ve Mcl-1 ile birlikte kemoterapiye direnci modüle eder ve sağ kalımı azaltır (32, 33). Buna karşın, Bid, Bad, Bax ve Bak apoptozu indükleyerek ovaryum kanseri tedavisine yanıt verir ve sağ kalımı artırır. Ovaryum kanseri tedavisi için yapılan klinik çalışmalar, Bcl-2 inhibitörleri ile sisplatin yanıtı iyileştirmiş olduğunu belirlemiş ve elde edilen bu sonuç aynı zamanda yumurtalık kanseri çalışmalarının pre-klinik modellerinde de görülmüştür (17, 34, 35).

Bir başka anti-apoptotik gen ailesi, IAP proteinleridir. Survivin, yumurtalık ve diğer kanser hücrelerinde bulunan apoptotik proteinler için iyi karakterize edilmiş bir inhibitördür. Survivin hücre bölünmesinde önemli bir rol oynar ve böylece apoptozu kontrol eder. İfade seviyesi artan c-Met, hücre çoğalmasını, infiltrasyonunu, anjiyogenezi ve dayanıklılığını etkiler (17, 36, 37). c-MET'in anti-apoptotik aktivitesi, tedavinin kemodirenç seviyesine bağlıdır (38). Radyoterapi, c-Met ifadesini indükler ve hayatta kalma sürecini artıran sinyal

dizisini tetikleyerek ve tedavinin yanıtını artırır. Gerçekleştirilen bir çalışma kapsamında, yumurtalık kanseri hücreleri c-Met inhibitörleriyle tedavi edildiğinde, hücre proliferasyonunun önemli ölçüde azaldığı ve kanser hücrelerinin apoptozunun arttığı belirlenmiştir (39). Böylece, spesifik proteinler, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) aracılığı ile tümör genişlemesi ve metastazını engeller (39).

WNT Sinyal Yolağı

Wnt yolağı genel olarak canlıların yaşam döngüsü boyunca geçirdiği embriyonik ve erişkinlik aşamalarının tamamında; dokularda hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hareket yeteneğinde çok önemli rollere sahiptir (40, 41). Wnt sinyal yolağı üç bilinen mekanizma tarafından yürütülür. Bunlar; kanonikal yol olarak da adlandırılan Wnt β -katenin yolağı, Wnt/Ca yolağı ve Wnt düzlemsel hücre kutuplaşması yolağıdır. Yapılan çalışmaların sıklığı nedeniyle mekanizması en çok bilinen Wnt β -katenin yolağıdır (42). Wnt sinyal yolağı kök hücre biyolojisinde, organ veya doku rejenerasyonunda ve metabolik dengenin sağlanmasında oldukça önemlidir. Bu yolağın beklenmedik şekilde aktivasyonunun artması birçok tümör alt tipinin gelişimine yol açmıştır. Bu durum kanser kök hücrelerinin davranışını etkilemektedir. Kanser kök hücrelerinin ilaca direnç gösterebilme özelliğinden dolayı hastalıkların nüks ettiği öngörülmektedir. Bu sebeple Wnt sinyal yolağını etkileyen yeni terapötik ilaçların keşfi, kanser kök hücrelerin inaktifleştirilmesine ve dolaylı olarak da kanserin ortadan kaldırılmasına yönelik ümit verici ilerlemeler olarak kaydedilmektedir. Yumurtalık kanseri tedavisinde gelişen ilaç direncinde büyük rol oynadığı için bu yolak, terapötik etkinliğin belirlenmesinde aday bir hedef oluşturmaktadır. R-spondinler (RSPO) Wnt sinyalini başlatmasa da lösin açısından zengin tekrar içeren G-protein bağlı reseptörlere (LGR) bağlanarak, düşük doz Wnt proteinlerine verilen yanıtları artırabilirler (43). Fonksiyonel RSPO'lar, yumurtalık kanseri dâhil olmak üzere çeşitli malignitelerin hastadan türetilen tümör ksenograft modellerinde kanser hücrelerinin tümör

oluşumunu azalttığı gösterilen çoklu insan tümör tiplerinde ve anti-RSPO monoklonal antikolarında bulunmuştur (44). Kirpi (PORCN) inhibitörleri, farklı hedef oluşturarak Wnt yolağının sinyal mekanizmasını inhibe etmektedir. Bu mekanizma da ligandların taşınması, salgılanması ve aktivitesi için gerekli olan Wnt proteinlerinin modifikasyonlarından Asetiltransferaz PORCN sorumludur (45). WNT974, Wnt sinyal engellemesinin bir sonucu olarak asit kaynaklı yumurtalık kanseri hücreleri üzerinde sitostatik etkiler uyguladığı gösterilen seçici bir PORCN inhibitörüdür. Konvansiyonel kemoterapötik ilaç karboplatin ile kombine edildiğinde, WNT 974 uygulaması, tek ilaç tedavileri ile karşılaştırıldığında asit örneklerinde artmış sitotoksik etkilere ve hücre döngüsü durmasına neden olmuştur (46).

Son yıllarda, yumurtalık kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünde klinik deneylerle Wnt inhibitörlerinin mekanizması üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Bu çalışmalarda, Wnt sinyallesini antagonize eden Ipafricept olarak adlandırılan rekombinant bir füzyon proteininin varlığından söz edilmiştir. Yapılan birçok çalışmada, Ipafricept'in kanser kök hücrelerini baskılayıp, farklılaşmayı artırdığı gözlemlenmiştir. Yumurtalık kanserinde taksanlarla ilişkilendirilmiştir. Yine yakın dönemde yapılan çalışmalarda, platin tedavisine duyarlı olan yumurtalık kanseri hastalarında paklitaksel ve karboplatinle birlikte faz 1B denemesi yapılmıştır (47). Bu çalışmayı engelleyen en önemli unsur Ipafricept'in etkin olabildiği dozlarda hasta da kemik toksisitesi göstermesidir. Genel olarak hastalar tarafında iyi derecede tolere edilebilmesine rağmen bu durum göz ardı edilemez. PORCN ve diğer Wnt yolağı inhibitörleri ile ilgili klinik araştırmalar devam etmektedir (48).

Hedgehog Sinyal Yolağı

Omurgalılarda olgun Hh proteinleri, hücre membranına bağlı reseptörler olan Patched 1 ve Patched 2'nin ligandlarıdır ve bu reseptörlere bağlandıklarında Hh sinyal yolağı aktifleşmektedir. İnsan epididim proteininin (HE4) ekspresyonunun,

yumurtalık kanseri hücrelerinde Rab 23 ekspresyonu ile ilişkili olduğunu bilinmektedir (49). Rab 23, Sonic Hedgehog (Shh) sinyal yolunda önemli bir rol oynayan Ras ile ilgili küçük GTPase süper ailesinin bir üyesidir. 2001 yılında Eggenschwiler ve ark. (50), Rab23'ün Sonic Hedgehog sinyal yolunun önemli bir negatif düzenleyicisi olduğunu belirlemiştir ve Rab23'ün tümör baskılayıcı bir role sahip olduğunu tespit etmiştir. Rab 23, esas olarak Hedgehog sinyal yolu ve kanserle ilişkili sinyal yollarında zenginleştirilmiştir.

NOTCH Sinyal Yolağı

Notch yolağının kanserdeki rolü ile ilgili çalışmalar 1980'lerin sonlarına dayanmaktadır. Bu yolak ilk olarak akut T hücre lenfoblastik lösemisinde (T-ALL) tanımlanmıştır (51). Notch reseptörü ile ona uygun olan ligandın bağlanması Notch sinyalini aktive eder ve bu da kanser hücrelerinin çoğalmasına yol açmaktadır (52). Notch sinyal yolağının bu beklenmedik ifadesinin, yumurtalık karsinomasının ilerlemesi ile de ilişkili olduğu öne sürülmektedir. Yumurtalık kanseri dokusunda, Notch1 proteini oldukça yüksek seviyelerdedir (52). Notch yolağının etkinliği; farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi hücre için oldukça önemli olayların sinyal kaskadını başlatır (53). Bu yolak tümör immünitesi, kemoterapötik ilaç dirençliliği, anjiyogenez (54), kanser kök hücre (55), gibi durumlarda da etkin role sahiptir (56)..

Yumurtalık Kanseri Tedavisinde Yenilikçi Yaklaşımlar

Kanser insidansı, metastaz, ilaç direnci ve nüks, özellikle yumurtalık kanseri başta olmak üzere onkolojik hastalıkların kritik konularıdır. Direnç mekanizmasının üstesinden gelmek için mekanizmayı anlamak ve yeni stratejiler geliştirmeye ihtiyaç vardır. Nanog proteininin kanser kök hücreleri gibi çalıştığı bulunmuştur (57). Yumurtalık kanseri hücrelerinin zamanla geliştirdiği çoklu ilaç direnci tedavideki en önemli engellerden biri olmaktadır. Bu nedenle Nanog, somatik hücrelerin yeniden programlanmasında önemli bir araçtır ve aşırı ekspresyonu, yumurtalık kanseri hücrelerinde istila, ilerleme, hastalığın nüksetmesi ve kemoterapi direnci gibi süreçleri

tetikler. Tüm yumurtalık kanseri alt tiplerinde Nanog'un ifadesinin arttığı bilinmekle beraber en çok yüksek dereceli seröz karsinomlarda görülmektedir. Bu bilgiler ışığında, Nanog'un teşhiste biyobelirteç olarak kullanılabilmesi öngörülmektedir. Ayrıca, Nanog'un doğrudan hedeflenmesinin yumurtalık kanserinde tümör nüksü ve çoklu ilaç direncinin temel nedeni olan kanser kök hücrelerin kendini yenileme sürecini ortadan kaldıracaktır. Bu nedenle, kemorezistans için yumurtalık kanseri kök hücrelerde Nanog mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi ve kansere karşı daha etkin yaklaşımların ortaya çıkmasına yol açabilir (57).

Yukarıda bahsedilen tedavi yöntemlerine ek olarak farklı birkaç tedavi yöntemi mevcuttur. Bu yöntemler her bireye uygun olmadıklarından dolayı yaygın kullanımda değildir. Bu güncel tedavi yöntemlerinden ilki fotodinamik tedavidir. LED veya

lazer ışık kullanılarak yapılan bu uygulamada ışığa hassas ajanların uyarılması amaçlanmıştır. Bir diğer yöntem ise kanserli hücrelerin 50 °C-100 °C gibi yüksek derecelerde ısıtılarak protein ve lipid tabakasının yapısını bozularak öldürülmeye çalışılmasıdır. Bu yöntem radyofrekans ablasyon tedavisi olarak literatüre geçmiştir.

Sonuç olarak kanser çözümlenmesi ve tedavi süreci oldukça zor bir hastalıktır. Kanser tedavisini bu denli zor kılan ise karmaşık bir yapıya sahip bir hastalık olmasıdır. Dünya da birçok bilim insanı kansere karşı mücadele adına çeşitli tedavi yolları geliştirmektedir. Yumurtalık kanseri hedefli tedavi yaklaşımlarını ve moleküler karakterizasyonunu belirlemeye yönelik çalışmaların artması ile, yakın gelecekte yan etkisi olmayan ve yumurtalık kanseri tedavisi sürecinde hastanın yaşam kalitesini artıran stratejilerin geliştirilmesi mümkün hale getirecektir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

- Roy PS, Saikia BJ. Cancer and cure: a critical analysis. *Indian J Cancer*, 2016; 53 (3): 441-2.
- Torre LA, Siegel RG, Ward EM, Jemal A. global cancer incidence and mortality rates and trends-an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2016; 25 (1): 16-27.
- Ottevanger, PB. Ovarian cancer stem cells more questions than answers. *Semin Cancer Biol*, 2017; 44: 67-71.
- Keyvani V, Farshchian M, Esmaeili SA, Yari H, Moghbeli M, Nezhad SRK, et al. Ovarian cancer stem cells and targeted therapy. *J Ovarian Res*, 2019; 12 (1): 120.
- Türkiye Kanser İstatistikleri, 2010. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2010-yili-kanser-istatistikleri.html>, (Erişim Tarihi: 23.02.2020).
- Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Coté TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer*, 2003; 97 (10): 2631-42.
- Reid BM, Permeth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer. *Cancer Biol Med*, 2017; 14 (1):9-32.
- Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2006; 20 (2): 207-25.

9. Reavis HD, Drapkin R. The tubal epigenome an emerging target for ovarian cancer. *Pharmacol Therap*, 2020; 210: 107524.
10. Koshiyama M, Konishi I, Mandai M, Komatsu T, Yamamoto S, Nanbu K, et al. Immunohistochemical analysis of p53 protein and 72 kDa heat shock protein (HSP72) expression in ovarian carcinomas. Correlation with clinicopathology and sex steroid receptor status. *Virchows Arch*, 1995; 425 (6): 603-9.
11. Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Cane S, Bignotti E, et al. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int J Cancer*, 2004; 112 (1): 14-25.
12. Salani R, Kurman RJ, Giuntoli R, Gardner G, Bristow R, Wang TL, et al. Assessment of TP53 mutation using purified tissue samples of ovarian serous carcinomas reveals a higher mutation rate than previously reported and does not correlate with drug resistance. *Int J Gynecol Cancer*, 2008; 18 (3): 487-91.
13. Cho KR, Shih IM. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*, 2009; 4: 287-313.
14. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Subtypes of ovarian cancer and ovarian cancer screening. *Diagnostics*, 2017; 7 (1): 12.
15. Baykara O. Current modalities in treatment of cancer. *Balikesir Health Sci J*, 2016; 5: 154-65.
16. Johnson SW, Laub PB, Beesley JS, Ozols RF, Hamilton TC. Increased platinum-DNA damage tolerance is associated with cisplatin resistance and cross-resistance to various chemotherapeutic agents in unrelated human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, 1997; 57 (5): 850-6.
17. Chandra A, Pius C, Nabeel M, Nair M, Vishwanatha JK, Ahmad S, et al. Ovarian cancer: current status and strategies for improving therapeutic outcomes. *Cancer Med*, 2019; 8 (16): 7018-31.
18. Januchowski R, Sterzyńska K, Zaorska K, Sosińska P, Klejewski A, Brazert M, et al. Analysis of MDR genes expression and cross-resistance in eight drug resistant ovarian cancer cell lines. *J Ovarian Res*, 2016; 9 (1): 65.
19. Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*, 2003; 8 (5): 411-24.
20. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99 (22): 14298-302.
21. Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol*, 2006; 70 (4): 1390-4.
22. Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol*, 2010; 77 (6): 887-94.
23. Kilari D, Guancial E, Kim ES. Role of copper transporters in platinum resistance. *World J Clin Oncol*, 2016; 7 (1): 106-13.
24. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*, 2010; 141 (1): 69-80.
25. Chang X, Monitto CL, Demokan S, Kim MS, Chang SS, Zhong X, et al. Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers. *Cancer Res*, 2010; 70 (7): 2870-9.
26. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2 (6): 442-54.
27. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*, 2004; 116(2): 205-19.
28. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 2007; 87(1): 99-163.
29. Smaili SS. Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Biol Res*, 2003; 36(2): 183-90.
30. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2(6): 442-54.
31. Loriot Y. Radiosensitization by a novel Bcl-2 and Bcl-XL inhibitor S44563 in small-cell lung cancer. *Cell Death Dis*, 2014; 5(9): e1423.
32. Eliopoulos AG. The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl-2. *Oncogene*, 1995; 11(7): 1217-28.
33. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 2007; 26(9): 1324-37.

34. Wang H. Small-molecule inhibitor of Bcl-2 (TW-37) suppresses growth and enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *J Ovarian Res*, 2015; 8.
35. Zeitlin BD, Zeitlin IJ, Nör JE. Expanding circle of inhibition: small-molecule inhibitors of Bcl-2 as anticancer cell and antiangiogenic agents. *J Clin Oncol*, 2008; 26(25): 4180-88.
36. Lengyel E. C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu. *Int J Cancer*, 2005; 113(4): 678-82.
37. Di Renzo, MF. Overexpression of the Met/HGF receptor in ovarian cancer. *Int J Cancer*, 1994; 58(5): 658-62.
38. Gherardi E. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer*, 2012; 12(2): 89-103.
39. De Bacco F. Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2011; 103(8): 645-61.
40. Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003; 129 (4): 199-221.
41. Jager M, Dayraud C, Mialot A, Quéinnec E, Guyader H, Manuel M. Evidence for involvement of Wnt signalling in body polarities, cell proliferation, and the neuro-sensory system in an adult ctenophore. *PLoS One*, 2013; 8 (12): e84363.
42. Lien WH, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev*, 2014; 28 (14): 1517-32.
43. de Lau WBM, Snel B, Clevers HC. The R-spondin protein family. *Genome Biol*, 2012; 13 (3): 242.
44. Chartier C, Raval J, Axelrod F, Bond C, Cain J, Hoskins CD, et al. Therapeutic targeting of tumor-derived r-spondin attenuates β -catenin signaling and tumorigenesis in multiple cancer types. *Cancer Res*, 2016; 76 (3): 713-23.
45. Teeuwssen M, Fodde R. Wnt signaling in ovarian cancer stemness, EMT and therapy resistance. *J Clin Med*, 2019; 8 (10): 1658.
46. Boone JD, Arend RC, Johnston BE, Cooper SJ, Gilchrist SA, Oelschläger DK, et al. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in primary ovarian cancer with the porcupine inhibitor WNT974. *Lab Invest*, 2016 ;96 (2): 249-59.
47. Moore KN, Gunderson CC, Sabbatini P, Mcmeekin DS, Smaledone GM, Burger RA, et al. A phase 1b dose escalation study of ipafricept (OMP54F28) in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2019; 154 (2): 294-301.
48. Harb J, Lin PJ, Hao J. Recent development of wnt signaling pathway inhibitors for cancer therapeutics. *Curr Oncol Rep*, 2019; 21 (2): 12.
49. Gao L, Zheng M, Guo Q, Nie X, Li X, Hao Y, et al. Downregulation of Rab23 inhibits proliferation, invasion, and metastasis of human ovarian cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019; 116: 105617.
50. Eggenschwiler JT, Espinoza E, Anderson KV. Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature*, 2001; 412 (6843): 194-8.
51. Yağcı E, Güneş HV. Notch Sinyal Yolağı ve Karsinogenez. *Osmangazi J Med*, 2017; 39(1): 109-16.
52. Zasada MB, Piecuch A, Dittfeld A, Mielańczyk L, Michalski M, Wyrobiec G, et al. Notch signalling pathway as an oncogenic factor involved in cancer development. *Contemp Oncol*, 2016; 20 (4): 267-272.
53. Ohishi K, Finney BV, Flowers D, Anasetti C, Myerson D, Bernstein ID. Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1. *Blood*, 2000; 95 (9): 2847-54.
54. Dufraigne J, Funahashi Y, Kitajewski J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene*, 2008; 27 (38): 5132-7.
55. Harrison H, Simões BM, Rogerson L, Howell SJ, Landberg G, Clarke RB. Oestrogen increases the activity of oestrogen receptor negative breast cancer stem cells through paracrine EGFR and Notch signalling. *Breast Canc Res*, 2013; 15 (2): R21.
56. Iqbal W, Alkarim S, Alhejin A, Mukhtar H, Saini KS. Targeting signal transduction pathways of cancer stem cells for therapeutic opportunities of metastasis. *Oncotarget*, 2016; 7 (46): 76337-353.
57. Mahalaxmi I, Devi SM, Kaavya J, Arul N, Balachandar V, Santhy KS. New insight into NANOG: A novel therapeutic target for ovarian cancer (OC). *Europ J Pharmacol*, 2019; 852: 51-7.

Sağlık alanındaki biyoteknolojik ürünlerin üretimi için mantarların kullanımı

The use of fungi for the production of biotechnological products in the field of health

Şule Aybüke YAVUZ¹ (ID), Ülküye Dudu GÜL² (ID)

ÖZET

Biyoteknoloji, ekonomik değeri yüksek ürünlerin biyolojik materyaller kullanılarak üretilmesini amaçlayan disiplinler arası bir bilim dalıdır. Mantarlar; enzimlerin, vitaminlerin, polisakaritlerin, polihidrik alkollerin, pigmentlerin, lipidlerin ve glikolipidlerin üretimi gibi birçok endüstriyel işlemden kaynak olarak kullanılmaktadır. Bu ürünler ticari üretimleriyle sağlanan ekonomik değerlerinin yanı sıra biyoteknolojik çalışmalar açısından da potansiyel olarak değerlidir. İlk biyoteknolojik ürünler arasında maya ve mantarların kullanımı ile üretilen şarap ve bira gibi alkollü içecekler ile ekmekek ve peynir gibi temel besin maddeleri bulunmaktadır. Özellikle ilk antibiyotik keşfi ile mantarların sağlık biyoteknolojisinde ilaç ve benzeri maddelerin üretimi için kullanım olanakları araştırılmaya başlanmıştır. Mantar sekonder metabolitleri sağlığımız ve beslenmemiz için son derece önem arz etmesinin yanı sıra bu ürünler önemli bir ekonomik etkiye sahiptir. Son yıllarda biyoteknolojik üretimlerde moleküler biyoloji ve genetik çalışmalarla geliştirilen tekniklerin kullanımı sonucu oluşturulan modifiye organizmalar kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde mayaları ve konakçı olarak diğer mantarları içeren rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen mikrobiyal enzimlere ve

ABSTRACT

Biotechnology is an interdisciplinary science that aims to produce products of high economic value using biological materials. Fungi are used as a source in many industrial processes such as the production of enzymes, vitamins, polysaccharides, polyhydric alcohols, pigments, lipids and glycolipids. These products are potentially valuable in terms of biotechnological studies as well as the economic value provided by their commercial production. The first biotechnological products include alcoholic beverages such as wine and beer also, basic nutrients such as bread and cheese produced by the use of yeast and fungi. Especially with the discovery of the first antibiotic, the possibilities of using fungi for the production of drugs and similar substances in health biotechnology have been started to be investigated. Fungal secondary metabolites are extremely important for our health and nutrition and also have a significant economic impact. In recent years, modified organisms have been used in biotechnological production as a result of the use of techniques developed by molecular biology and genetic studies. Today, there has been a significant increase in production and marketing activities for microbial enzymes and pharmaceutical

¹Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Bölümü, Bilecik

²Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Bilecik



İletişim / Corresponding Author : Ülküye Dudu GÜL

Bilecik Şeyh Edebali Üni., Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Bilecik - Türkiye

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

Geliş Tarihi / Received : 02.01.2020

Kabul Tarihi / Accepted : 29.03.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.06982

Yavuz ŞA, Gül ÜD. Sağlık alanındaki biyoteknolojik ürünlerin üretimi için mantarların kullanımı.

Türk Hij Den Biol Derg, 2021; 79(1): 163 - 172

farmasötik ürünlere yönelik üretim ve pazarlama faaliyetlerinde belirgin bir artış meydana gelmiştir. Bugün, mantar biyolojisi küresel endüstride önemli bir yere sahiptir. Yeni keşfedilmiş türler üzerine genomik ve proteomik çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmanın amacı sağlık biyoteknolojisinde mantarların yerini ve kullanım alanlarını değerlendirmektir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda maya ve mantarların sağlık biyoteknolojisinde özellikle farmasötik ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanıldığı saptanmıştır. Mantar ve mayalar antitümör ve antimikrobiyal ilaç etken maddeleri, aşılarda ve hormonlar gibi çeşitli farmasötik ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak geliştirilen yeni mantar ve maya türlerinin hem daha verimli hem de etkin bir şekilde kullanılabildiği belirlenmiştir. Bunlara ilaveten yeni izole edilen ve özellikleri tam olarak belirlenmemiş birçok maya ve mantar türlerinin varlığının bilinmesi, sağlık biyoteknolojisinde yeni ürünlerin üretimi açısından umut vadetmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyoteknoloji, mantarlar, sağlık

products produced by recombinant DNA technology, including yeasts and other fungi as hosts. Today, fungal biology is an important participant in the global industry. Genomic and proteomic studies on newly discovered species are ongoing. The aim of this study is to examine the information in the literature about the use of fungi in health biotechnology. According to the results of this study, yeasts and fungi are widely used in health biotechnology, especially in the production of pharmaceutical products. Fungi and yeasts are used in the production of various pharmaceutical products such as antitumor and antimicrobial drug active substances, vaccines and hormones. In addition, it has been determined that new fungi and yeast species developed using recombinant DNA technologies can be used both more efficiently and effectively. In addition, the existence of newly isolated yeast and fungi species with many features not fully identified is promising for the production of new products in health biotechnology.

Key Words: Biotechnology, fungi, health

GİRİŞ

Mantarlar, ürünlerinin çeşitliliği açısından biyoteknolojik önem arz etmektedir. Son yıllarda özellikle sağlıkta kullanılan mantar ürünlerine ilgi artmaktadır. Mantar ürünleri hem düşük maliyetli elde edilmeleri hem de biyolojik uyumlu olmaları nedeniyle oldukça avantajlıdır. Literatürde mantarlardan antiviral, antiprotozoal, antifungal ve antibakteriyel özellikli ürünlerin üretildiği görülmektedir (1). Özellikle sağlık alanında kullanılan mantar ürünleri ekonomik değerlerinin yüksek olmalarından dolayı dünyada büyük bir pazar payına sahiptir. Bu çalışmanın amacı sağlık biyoteknolojisinde mantarların yerini ve kullanım alanlarını değerlendirmektir.

Hücre Fabrikaları Olarak Mantarlar

Çok eski zamanlardan beri hem küf mantarları hem de maya mantarları, bira, şarap, ekme ve peynir gibi ürünler üretmek için kullanılmıştır. Endüstriyel mikrobiyolojinin altın çağı olan 20. yüzyılda, fermantasyon işlemlerinden sayısız ürün elde edilmiş olup, bu ürünler çözücüler, antibiyotikler, enzimler, vitaminler, amino asitler, polimerler ve diğer birçok faydalı bileşiklerdir (2). Moleküler biyoloji tekniklerinin geliştirilmesi, maya ve küflerin, homolog ve heterolog (özellikle memeli) proteinlerin yanı sıra antibiyotikler, pigmentler ve yağ asitleri gibi diğer metabolitlerin üretimi için mikrobiyal hücre fabrikaları olarak kullanılması için yeni yollar sağlamıştır. Konakçı suşlar ABD Gıda ve İlaç

İdaresi (FDA) tarafından bilinen GRAS GRAS (Generally Recognized As Safe - Genel olarak Güvenli Kabul Edilir) statüsünde olanlardan seçilmektedir. Bu statüye sahip olan birkaç mantar türü şu anda rekombinant protein ve metabolitlerin büyük ölçekli üretimi için

kullanılmaktadır (3). Mantar hücreleri biyoteknolojik ürünlerin üretiminde kullanılan fabrikalar gibi çalışmaktadır. Biyoteknolojide kullanılan mantar türleri ve ürettikleri ürünlere ait bilgiler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Biyoteknolojide fabrika olarak kullanılan mantar türleri

Mantar Türü	Biyoteknolojik İşlevi	Elde Edilen Ürünler	Kaynakça
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Farmasötik Protein Endüstrisi	İnterferonlar, Hepatit B aşısı üretimi	(4) (5,6)
<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Rhizomucor miehi</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Gıda Endüstrisi	Proteinaz üretimi Lipaz üretimi	(7)
<i>Humicola lanuginosa</i>	Deterjan Endüstrisi	Lipaz, Proteaz, Oksidaz ve Peroksidaz üretimi	(8) (9)
<i>Penicillium notatum</i>	Antibiyotikler	Penisilin	(10)
<i>Tolypocladium nivenum</i>	İmmünoşüpresif Ajan	Siklosporin A	(11)
<i>Taxomyces andreanae</i>	Antitümör Ajan	Taksol	(12)
<i>Gibberella zeae</i> <i>Gibberella fujikuroi</i>	Mikotoksinler	Zearelanone Gibberellik asit	(13) (14)

Sağlık Biyoteknolojisinde Mantarların Kullanımı

Mantarların ürettiği ve sağlık alanında kullanılan önemli ürünler arasında biyofarmasötikler, bazı enzimler, antibiyotikler, immünoşüpresif ajanlar, antitümör ajanlar ve bazı mikotoksinler bulunmaktadır.

- Farmasötik Proteinler

Mantarlar tarafından üretilen biyofarmasötikler içinde terapötik proteinler bulunmaktadır(15). Sağlık alanında tedavi amaçlı kullanılan bu önemli proteinlerin üretimi için mayalar kullanılmaktadır (16). Mayalar kullanılarak üretilen biyofarmasötik

proteinler Tablo 2’de sunulmuştur. Bir gıda organizması olan *S. cerevisiae* farmasötik proteinlerin üretimi için güvenli bir ev sahibi olarak kabul edilmektedir. Bu mayanın hızla büyütülebilmesi ile yüksek hücre yoğunluğuna kısa sürede ulaşabilmesi ve ürettiği heterolog proteinleri hücre dışına salgılayabilmesi gibi kullanım avantajlarının yanı sıra genetiği hakkındaki bilgiler diğer tüm ökaryotlardan daha ileri düzeydedir (17). Memeli genleri, insan interferonu (4), insan epidermal büyüme faktörü (18) ve insan hemoglobini (19) dahil olmak üzere *S. cerevisiae*’de klonlanmış ve eksprese edilmiştir. Ticari olarak en önemli maya rekombinant işlemi, ilk güvenli hepatit

B aşısı üretimi ile sonuçlanan, hepatit B virüsünün yüzey antijenlerini kodlayan genlerin ifade edilmesi şeklinde olmuştur (5,6).

Farmasötik protein üretimi çalışmalarında *Pichia pastoris* en yaygın kullanılan ifade sistemlerinden birisidir (16,19,20). *P. pastoris* hücreleri kullanılarak yapılan birçok hücre içi veya hücre dışı rekombinant ürün örneği vardır (16,19,21-23). Bu mükemmel ekspresyon sisteminin en önemli dezavantajı GRAS dışı statüsünde olmasıdır. Buna rağmen bu maya tarafından yapılan bazı ürünler faz III klinik çalışmalarında değerlendirilmektedir.

Filamentli mantarlarda rekombinant heterolog proteinlerin üretimi için moleküler tekniklerinin zahmetli olmasının aksine mayalarda belirgin başarılar elde edilmiştir. Mantara ait olmayan proteinlerin üretim seviyeleri, mantarın homolog proteinlerinin üretiminden daha düşüktür. Bu durum transkripsiyon, translasyon, sekresyon ve hücre dışı bozulmayı etkileyen faktörlerden kaynaklanmaktadır (3,24-26). Gen füzyonu, mantar konaklarında mantar dışı proteinler üretme girişiminde ilk tercih olmuş ve bu strateji ile memeli interlökinleri, lizozomları ve loktoferrinleri üretilmiştir (27-30).

Farmasötik uygulamaları olan birçok protein için stabilite, uygun katlanma ve farmakokinetik için N-glikozilasyon gereklidir ancak bir proteinin glikozilasyonu, hücrelerin içinde büyüdüğü ortam gibi faktörlere bağlı olarak da değişebilir (31). Her ne kadar mayadaki O-bağlı glikozilasyon, yüksek ökaryotlardakinden oldukça farklı olsa da N-bağlı glikozilasyon benzerlik göstermektedir (17). Maya rekombinant proteinlerinde olduğu gibi memeli polipeptitlerinde de endoplazmik retikulumda bir çekirdek oligosakarit ünitesi bulunur (32).

Üç glikoz tortusu ve bir mannoz çıkarılır ve mayalarla yüksek ökaryotlar arasında sapma olan golgide çekirdek oligosakaritin işlenmesi devam eder. Hiperglikosilasyonun görülmemesine ve düşük mannozlu yan zincirlerin oluştuğu görülmesine rağmen, kalıplardaki glikozilasyon konusunda çok az araştırma yapılmıştır (32-34).

Daha öncede belirtildiği üzere biyofarmasötiklerin üretimi için hayvan ve insan kökenli kaynaklar kullanılmaktaydı. Son yıllarda pazara sunulan yeni biyofarmasötik ürünlerin çoğunluğu rekombinant ekspresyon sistemleri kullanılarak elde edilmektedir. Mayalar en sık kullanılan ekspresyon sistemlerini temsil etmektedir. Zymogenetics isimli biyoteknoloji şirketi 1980'lerin başlarında ticari boyutta rekombinant insan insulini üretimi için konak olarak *S. cerevisiae*'yi geliştirmiş ve 1987'de Novolin isimi altında bu ürün Novo Nordisk Şirketi tarafından pazara sunulmuştur. Günümüzde geliştirilmiş bu *S. cerevisiae* mayasını kullanarak insülin üreten bu platform dünyadaki insülin tedarikinin yarısını tamamlamaktadır. Son on yıllık süreçte başarılı bir şekilde biyobenzer ürün üretimi nedeni ile ilgi çeken *Pichia pastoris* isimli mantar türünün 3 g/L kapasiteye sahip rekombinant insan insulini üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir (35,36). Dünyanın dördüncü en büyük insülin ürünleri tedarikçisi olan Biocon şirketi konak olarak *P. pastoris*'i kullanmaktadır (37). Bu bağlamda rekombinant insülin üretimi maya temelli biyofarmasötiklerin ekspresyonu ve üretimine iyi bir örnek teşkil etmektedir.

Son yıllarda, birçok yeni biyofarmasötik adayı olan ürünler çeşitli platformlar tarafından *S. cerevisiae*, *P. pastoris* ve *Hansenula polymorpha* gibi mantar türleri kullanılarak üretilmektedir (38-42). Örneğin; 2012 yılında Okriplazmin FDA tarafından maya temelli biyofarmasötik olarak onaylanmış ve ThromboGenics firması tarafından Jetrea adı ile satılmıştır (43). *P. pastoris* isimli mantar türünde eksprese edilen ve glikozile bir proteaz olan Okriplazmin semptomatik vitreomaküler yapışma (vitreomacular adhesion) tedavisinde kullanım için onaylanmıştır (44). Günümüzde maya temelli birçok biyofarmasötik pazarlama ve kullanım için onay almıştır (Tablo 2) (45).

Çok sayıda maya temelli yeni biyofarmasötik ürünün geliştirilmesi için klinik çalışmalar ise devam etmektedir. Ablynx *P. pastoris*'te eksprese edilen nanobody tabanlı terapötik üretimine odaklanmış en az iki klinik program olduğunu bildirmiştir (46). Alder

biyofarmasötik şirketi ise kendi laboratuvarlarında *P. pastoris* gen ekspresyon sistemini kullanarak ALD518 (BMS-945429) isimli interlökin-6'yı (IL-6) ve ALD403 isimli kaslasyonin geni ile ilişkili peptidi hedefleyen iki klinik antikör geliştirdiğini raporlamıştır (47). ALD518 (BMS-945429) olarak üretilen insan antikoru Fc glikosilasyonu içermeyecek şekilde tasarlanmıştır. Bununla birlikte, bu ürünün yarı ömrü korunmuştur ve pazara sunulan diğer glikosile antikörlerle karşılaştırabilmektedir (48,49).

P. pastoris mayası kullanılarak başarılı bir şekilde gerçekleşen antikör ekspresyonunun bu ikinci örneği, aynı maya türü ile daha karmaşık biyofarmasötiklerin üretimine doğru bir yönelime ilgiyi arttırmıştır. Bunun sonucunda da antikörler ve terapötik proteinler dahil olmak üzere insan benzeri glikosilasyon paternlerine sahip biyofarmasötiklerin *P. pastoris* mayası kullanılarak üretimlerinin yapıldığı ile ilgi çok sayıda raporlar bulunmaktadır (50-59).

Tablo 2. Pazarlama için onay almış önemli bazı maya temelli biyofarmasötikler (45)

Orjin organizma	Konakçı organizma	Ürün
İnsan papilomavirüs	<i>S. cerevisiae</i>	Gardasil (İnsan papilomavirüs alt birim aşısı)
İnsan cDNA	<i>S. cerevisiae</i>	Glukagon
Hepatit virüs	<i>S. cerevisiae</i>	Hepatit B alt birim aşısı
Hepatit virüs	<i>P. pastoris</i>	Hepatit B alt birim aşısı
Hepatit virüs	<i>H. polymorpha</i>	Hepatit B alt birim aşısı
İnsan cDNA	<i>S. cerevisiae</i>	Lökin1 (rekombinant insan granülosit makrofaj-koloni uyarma faktörü)
İnsan cDNA	<i>S. cerevisiae</i>	Regranex (rekombinant insan trombosit türevli büyüme faktörü)
İnsan cDNA	<i>P. pastoris</i>	Kalbitor (kallikrein inhibitörü)

- Antibiyotikler

Düşük mol kütesine sahip olan antibiyotikler, bazı organizmalar tarafından sekonder metabolit olarak sentezlenir ve çok düşük derişimlerde bile diğer mikroorganizmaların büyümesini inhibe etme özelliğine sahiptir (60). Mantarlar, türlerine özgü olarak, antimikrobiyal etkili antagonistik maddeler, fenolik bileşikler, pürin ve pirimidinler, terpenoitler, kinonlar ve fenil propanoit türevi bileşikler sentezleyebilirler (61). *Penicillium notatum* tarafından salgılanan lizozimin bakteriler üzerindeki öldürücü etkisi, Alexander Fleming tarafından, 1928 yılında keşfedilmiş ve penisilin antibiyotiği olarak kayda geçmiştir (10). 1995 yılında

bilinen 12.000 antibiyotiğin yaklaşık %22'si filamentli mantarlar tarafından üretilmiştir ve bunlar arasında doğal penisilin G (benzilpenisilin), biyosentetik penisilin V (metilpenisilin), çok sayıda yarı sentetik penisilin (ampisilin ve metisilin) ve sefalosporinler bulunmaktadır (18,61). Bir çalışmada, *Russula delica* adı verilen makrofungi ekstrelerinden elde edilen etil asetatın, *Corynebacterium xerosis* üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (62). Mantarlar tarafından üretilen diğer antibiyotiklere ise fusidik asit ve klor içeren griseofulvin örnek olarak verilebilir (63). Ticari olarak en çok üretilen antibiyotik çeşitleri ve sentezlendiği mikroorganizmanın türü Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Ticari olarak üretilen bazı antibiyotik çeşitleri ve kaynak mikroorganizmanın türü

Mantar Türü	Antibiyotik
<i>P. notatum</i>	Penisilin
<i>Fusidium coccineum</i>	Fusidik asit
<i>Penicillium griseofulvin</i>	Griseofulvin

- İmmünoşüpresif ajanlar

İlk olarak, siklosporin A, *Tolypocladium nivenum* tarafından üretilen dar spektrumlu bir antifungal peptid olarak keşfedilmiştir (11). Günümüzde *Tolypocladium inflatum* olarak adlandırılmış olan mantar hücresi, 25'in üzerinde siklosporin bileşiği üretmektedir. Ancak bu bileşiklerden yalnızca iki tanesi immünoşüpresandır ve bunların dışındaki 17 tanesi antifungal özelliğe sahiptir. İlacın immünoşüpresif aktivitesinin keşfedilmesi kalp, karaciğer ve böbrek nakli ameliyatlarında kullanılmasına olanak sağlamış olup, böylece organ nakli alanında başarılı sonuçlar elde edilmesine imkan vermiştir (64). Son zamanlarda yapılan başka bir çalışmada ise immünoşüpresif ajan olarak işlev gören Siklosporin A'nın mantarlar kullanılarak batık fermantasyon yöntemi ile üretimi yapılmıştır (65).

- Antitümör ajanlar

Başlangıçta bitkilerde keşfedilmiş olan Taksol, doğal bir antikanser maddesidir (63). Mikrotübüllerin depolimerizasyonunu bloke ederek etki gösteren, meme ve yumurtalık kanseri tedavisi için onaylanmış tek ticari antitümör ilaç olan Taksol'ün, daha sonra yapılan çalışmalarda, *Taxomyces andreanae* tarafından da üretildiği gösterilmiştir (12). Son yıllarda yayınlanan bir çalışmaya göre farklı türlere ait deniz mantarları antritümör ajan olarak başarılı bulunmuştur (66).

- Mikotoksinler

Farklı *Claviceps* türleri tarafından üretilen ergot alkaloidleri, migren baş ağrısı, serebral dolaşım bozukluğu, uterus kasılması, doğum sonrası kanama

gibi birçok patolojinin tedavisinde ve erken gebelikte implantasyonun önlenmesinde kullanılmaktadır (62, 64).

Gibberella zeae tarafından üretilen Zearelanone, bir östrojendir ve indirgenmiş türevidir olan zeranol, sığır ve koyunlarda hem büyüme faktörü hem de yem verimini artıran bir anabolik ajan olarak kullanılmaktadır (13). Gibberellinler olarak bilinen fitotoksik mikotoksin grubunun bir üyesi olan Gibberellik asit, *Gibberella fujikuroi* tarafından üretilir. Gibberellinler, arpa maltını hızlandırmak, malt kalitesini arttırmak, sebze verimini arttırmak, marul ve şeker pancarı tohumundan mahsullerini elde etmek için gereken süreyi kısaltmak için kullanılır. Bunlar çiçeklenmeyi, tohum çimlenmesini ve kök uzamasını kontrol eden izoprenoid büyüme düzenleyicileridir (14).

Souç olarak; son birkaç yıl, mantarları hücre fabrikaları olarak kullanan büyük bir ilerleme süreci olmuştur. Hala üzerinde çalışılmakta olan dört temel alan bulunmaktadır. Bunlardan ilki, özellikle FDA tarafından GRAS statüsü verilen ve gıda endüstrisinde kullanılabilecek alternatif konakların geliştirilmesidir. İkinci temel alan ise filamentli mantarlarda fungal olmayan proteinlerin ekspresyonunu ve salgılanmasını geliştirmek için daha iyi moleküler tekniklerin geliştirilmesidir. Üçüncü temel alan, belirli biyosentetik yolları değiştirmek ve iyileştirmek için geliştirilen moleküler tekniklerin kullanılmasını içerir. Son temel alan da gen ekspresyonunun, yani genomik, proteomik ve metabolomik analizin geneliyle ilgili tekniklerin kullanmasıdır. Mantar biyoteknolojisinin

geleceği, hali hazırda mantarlar tarafından yapılan tüm katkıların, doğada bulunan mantar türlerinin %5'inden daha azıyla yapıldığı düşünüldüğü zaman cesaretlendiricidir. Karasal ve sucul ortamlar çoğunluğunu mantarların oluşturduğu binlerce bilinmeyen mikrobiyal tür içermektedir. Ayrıca bilinen mantar proteinlerinin yaklaşık %30-50'sinin işlevi henüz belirlenememiştir. Fonksiyonel genomik ve

biyoinformatik ile daha fazla fonksiyon belirlendikçe mantar ürünlerinin taranması için yeni hedefler ortaya çıkacaktır. Yönlendirilmiş evrim ile mantar enzimleri aktivite, özgüllük ve stabilite açısından geliştirilebilecektir. Mantarlarda kombinatoriyal biyosentez ile yeni sekonder metabolitlerin üretimi de gelecekte yapılacak çalışmalarda temel unsur olacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Solak MH, Kalmis E, Sağlam H, Kalyoncu F. Antimicrobial activity of two wild mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. and *Rhizopogon roseolus* (Corda) TM Fries collected from Turkey. *Phytother Res*, 2006;20(12):1085-7.
2. Demain AL. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999;52(4):455-63.
3. Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol*, 2002;20(5):200-6.
4. Hitzeman RA, Leung DW, Perry LJ, Kohr WJ, Levine HL, Goeddel DV. Secretion of human interferons by yeast. *Science*, 1983; 219(4585):620-5.
5. Miyahara A, Toh-Et A, Nozaki C, Hamadat F, Ohtomo N, Matsubara K. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983;80:1-5.
6. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 1982;298(5872):347-50.

7. Pariza MW, Johnson EA. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: Update for a new century. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2001;33(2):173-86.
8. Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. *VBiotechnol Appl Biochem*, 1999;29(2):119-31.
9. Carlsen S. Industrial use of enzymes; technical and economic barriers. In: Wolinak B, Scher M, editors. *Molecular biology in research and production of industrial enzymes*. 1th ed. Chicago: , 1990: 52-69.
10. Fleming A. On The antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in isolation of B. influenzae. *Br J Exp Pathol*, 1929;226-36.
11. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*, 1976;6(4):468-75.
12. Shuster JR, Connelley MB. Promoter-tagged restriction enzyme-mediated insertion [PT-REMI) mutagenesis in *Aspergillus niger*. *Mol Genet*, 1999;262(1):27-34.
13. Hidy PH, Baldwin RS, Greasham RL, Keith CL, McMullen JR. Zearalenone and some derivatives: production and biological activities. *Adv Appl Microbiol*. 1977;22(C):59-82.
14. Tudzynski B. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999;52(3):298-310.
15. Meehl MA, Stadheim TA. Biopharmaceutical discovery and production in yeast. *Curr Opin Biotechnol*, 2014; 30:120-7.
16. Gül ÜD. Sağlık alanında biyoteknolojik uygulamalar: kırmızı biyoteknoloji. *Bilecik Şeyh Edebali Üni Fen Bilim Derg*, 2014;2330:2148-330.
17. Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*. 1992;8(6):423-88.
18. Brake AJ, Merryweather JP, Coit DG, Heberlein UA, Masiarz FR, Mullenbach GT, et al. α -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984;81(15 I):4642-6.
19. Strohl RW. Industrial antibiotics: today and the future. In: Strohl RW, edit. *Biotechnology of Antibiotics*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1997; 1-47.
20. Higgins DR, Cregg JM. Introduction to *Pichia pastoris*. In: Higgins DR, Cregg JM, eds. *Pichia Protocols (Methods in Molecular Biology)*. New Jersey: Humana Press, 1998; 1-15.
21. Rosenfeld SA. Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. *Methods Enzymol*, 1999;306(1995):154-69.
22. Brierley RA. Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I). *Methods Mol Biol*, 1998;103:149-77.
23. Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 1993;11(8):905-10.
24. Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr Opin Biotechnol*, 1995;6(5):527-33.
25. Archer DB. Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. *Curr Opin Biotechnol*, 2000;11(5):478-83.
26. Gouka RJ, Punt PJ, Van Den Hondel CAMJJ. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: Progress, limitations and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997;47(1):1-11.
27. Verdoes JC, Punt PJ, van den Hondel CAMJJ. Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by Filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995;43(2):195-205.
28. Baron M, Tiraby G, Calmels T, Parriche M, Durand H. Efficient secretion of human lysozyme fused to the Sh ble phleomycin resistance protein by the fungus *Tolypocladium geodes*. *J Biotechnol*, 1992;24(3):253-66.

29. Broekhuijsen MP, Mattern IE, Contreras R, Kinghorn JR, van den Hondel CAMJJ. Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: Production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *J Biotechnol*, 1993;31(2):135-45.
30. Contreras R, Carrez D, Kinghorn JR, van den Hondel CAMJJ, Fiers W. Efficient KEX2-like processing of a glucoamylase-interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature Interleukin-6. *Bio/Technology*, 1991;9(4):378-81.
31. Jenkins N, Curling EMA. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme Microb Technol*, 1994;16(5):354-64.
32. Kukuruzinska MA, Bergh MLE, Jackson BJ. Protein glycosylation in yeast. *Annu Rev Biochem*, 1987 Jun;56(1):915-44.
33. Elbein AD, Mitchell M, Molyneux RJ. Effect of castanospermine on the structure and secretion of glycoprotein enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol*, 1984;160(1):67-75.
34. Maras M, van Die I, Contreras R, van den Hondel CAMJJ. Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycoconj J*, 1999;107:19-27.
35. Xie T, Liu Q, Xie F, Liu H, Zhang Y. Secretory expression of insulin precursor in *Pichia pastoris* and simple procedure for producing recombinant human insulin. *Prep Biochem Biotechnol*, 2008 Jul;38(3):308-17.
36. Gurramkonda C, Polez S, Skoko N, Adnan A, Gäbel T, Chugh D, et al. Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microb Cell Fact*, 2010; 12:9.
37. Biocon - India's largest biopharmaceutical compan. <https://biocon.com/>, (Erişim Tarihi: 19 Temmuz 2020).
38. Berlec A, Štrukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 40(3-4):257-74.
39. Çelik E, Çalık P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv* 2012;30(5):1108-18.
40. Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol*, 2013; 4: 217.
41. Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D. Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol*, 2012;824:329-58.
42. Spadiut O, Capone S, Krainer F, Spadiut O, Capone S, Krainer F, Glieder A, Herwig C. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends Biotechnol*, 2014;32(1):54-60.
43. Mullard A. 2012 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov*, 2013;12(2):87-90.
44. Syed YY, Dhillon S. Ocriplasmin: a review of its use in patients with symptomatic vitreomacular adhesion. Vol. 73, *Drugs*. Springer International Publishing; 2013. p. 1617-25.
45. Kavanagh K. *Fungi: Biology and Applications: Second Edition*. Wiley; 2011. 1-366 p.
46. '<https://www.ablynx.com/>' (Erişim Tarihi: 19 Temmuz 2020).
47. 'www.lundbeck.com/global/' (Erişim Tarihi: 19 Temmuz 2020).
48. Mease P, Strand V, Shalamberidze L, Dimic A, Raskina T, Xu L-A, et al. A Phase II, Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Study of BMS945429 (ALD518) in Patients with Rheumatoid Arthritis with an Inadequate Response to Methotrexate. *Ann Rheu Dis*, 2012; 71: 1183-9.
49. Jung ST, Kang TH, Kelton W, Georgiou G. Bypassing glycosylation: Engineering aglycosylated full-length IgG antibodies for human therapy. *Cur O Bio*, 2011; 22(6): 858-67.
50. Barnard GC, Kull A, Sharkey N, Shaikh SS, Rittenhour AM, Burnina I, Jet al. High-throughput screening and selection of yeast cell lines expressing monoclonal antibodies. *J Ind Microbiol*, 2010; 37: 961-71.

51. Potgieter TI, Cukan M, Drummond JE, Houston-Cummings NR, Jiang Y, Li F, et al. Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. *J biotechnology*, 2009; 139(4): 318-25.
52. Zha D. Glycoengineered pichia-based expression of monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol*, 2013;988:31-43.
53. Hamilton SR, Cook WJ, Gomathinayagam S, Burnina I, Bukowski J, Hopkins D, et al. Production of sialylated O-linked glycans in *Pichia pastoris*. *Glycobiol*, 2013; 23(10): 1192-1203.
54. Glycoproteins SRH. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. science.sciencemag.org [Internet]. 2014 [cited 2020 Jun 19];18. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/313/5792/1441.short>
55. Hamilton SR, Davidson RC, Sethuraman N, Nett JH, Jiang Y, Rios S, et al. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. 2014; 313(5792):1441-3.
56. Liu L, Li H, Hamilton SR, Gomathinayagam S, Rayfield WJ, van Maanen M, et al. The impact of sialic acids on the pharmacokinetics of a pegylated erythropoietin. *J Pharm Sci*, 2012;101(12):4414-8.
57. Liu L, Gomathinayagam S, Hamuro L, Prueksaritanont T, Wang W, Stadheim TA, et al. The impact of glycosylation on the pharmacokinetics of a TNFR2:Fc fusion protein expressed in glycoengineered *pichia pastoris*. *Pharm Res*, 2013;30(3):803-12.
58. Liu L, Stadheim A, Hamuro L, Pittman T, Wang W, Zha D, et al. Pharmacokinetics of IgG1 monoclonal antibodies produced in humanized *Pichia pastoris* with specific glycoforms: A comparative study with CHO produced materials. *Biologicals*, 2007; 39: 205-10.
59. Choi BK, Actor JK, Rios S, D'Anjou M, Stadheim TA, Warburton S, et al. Recombinant human lactoferrin expressed in glycoengineered *Pichia pastoris*: effect of terminal N-acetylneuraminic acid on in vitro secondary humoral immune response. *Glycoconj J*, 2008;25(6):581-93.
60. Öztürk A, Çopur Ö. Mantar Bileşenlerinin Teröpatik Etkileri. *Bahçe*, 2009;38(1):19-24.
61. Schmid RD, Verger R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chemie Int Ed*, 1998;37(12):1608-33.
62. Gül ÜD, Coşdan Ö, Eryılmaz M. Antimicrobial Activity of Medicinal Macrofungi. In: International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, 'Natural and Healthy Life' May, 9-12, Konya-Turkey 2017. (Proceeding Book, p. 1168).
63. Wall ME, Wani MC. Camptothecin and taxol: discovery to clinic--thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res*, 1995;55(4):753-60.
64. Janos B. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? *Biotechnologija*. 1995; 61:1004-12.
65. Anjum T, Iram W. Production of Cyclosporine A by Submerged Fermentation. In: Merillon JM., Ramawat K. (eds) *Fungal Metabolites*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. 2015.
66. Deshmukh SK, Prakash V, Ranjan N. Marine fungi: a source of potential anticancer compounds. *Front Microbiol*, 2017; 8: 2536.

TELİF HAKKI DEVİR FORMU / COPYRIGHT TRANSFER FORM



HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Makale Türü/Article Type:/...../20...

(...) Araştırma/Research (..) Derleme/Review (..) Olgu Sunumu/Case Report

(..) Editöre Mektup/Letter to Editor (..) Teknik Rapor/Technical Report

Makale Başlığı/Article Entitled :

Sayın Editör,

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 rights and copyrights,
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 gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below or deliver personally

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology
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

