



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 75 ■ Sayı/Number 3 ■ Yıl/Year 2018

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

Hüseyin İLTER, Genel Müdür (General Director)

EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Hasan IRMAK

EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

Demet CANSARAN-DUMAN

Hülya ŞİMŞEK

Pınar KAYNAR

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Mehmet Kürşat DERİCİ

Fatih BAKIR

Mestan EMEK

Fehminaz TEMEL

Selin NAR-ÖTGÜN

Dilek YAĞCI-ÇAĞLAYIK

Şule ŞENSES-ERGÜL

Arsun ESMER

Sibel KARACA

Gülsen TOPAKTAŞ

TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Utku ERCÖMART

Zeynep KÖSEOĞLU

Selahattin TAŞOĞLU

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ

GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayımlanır / Published four times per year

Asitsiz kağıt kullanılmıştır / Acid free paper is used

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü / General Directorate of Public Health
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı /
Administrative and Financial Affairs Department

Baskı ve Cilt / Press and Binding :

Artı6 MEDYA
Maltepe mah. Özveren cad. 13/A/Değirmentepe/Kızılay-ANKARA
Tel: +90 312 299 37 41
e-posta: filmcikis@yahoo.com

Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

Basım Tarihi / Date of Publication :

2018

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, İsveç	Kosta Y. MUMCUOĞLU, İsrail
Anna PAPA, Yunanistan	Manfred WEIDMANN, İngiltere
Aziz SANCAR, ABD	Paul HEYMAN, Belçika
Cristina DOMINGO, Almanya	Pauline MWINZI, Kenya
Daniel MOTLHANKA, Botswana	Roberto Caneta VILLAFRANCE, Küba
Dwight D. BOWMAN, ABD	Sıraç DİLBER, İsveç
Isme HUMOLLI, Kosova	Susana RODRIGUEZ-COUTO, İspanya
Isuf DEDUSHAJ, Kosova	Takashi AKAMATSU, Japonya
Iva CHRISTOVA, Bulgaristan	Varalakshmi ELANGO, Hindistan
Johan LINDH, İsveç	

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara	Cemal SAYDAM, Ankara
Abdülkadir HALKMAN, Ankara	Çağatay GÜLER, Ankara
Ahmet ÇARHAN, Ankara	Delia Teresa SPONZA, İzmir
Ahmet KART, Ankara	Demet CANSARAN DUMAN, Ankara
Akçahan GEPEĞREMEN, Bolu	Dilek ASLAN, Ankara
Ali ALBAY, Ankara	Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, İstanbul
Ali Kudret ADILOĞLU, Ankara	Diler ASLAN, Denizli
Ali Naci YILDIZ, Ankara	Doğın YÜCEL, Ankara
Alp ERGÖR, İzmir	Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara
Alper AKÇALI, Çanakkale	Emrah RUH, Kıbrıs
Aşkın YAŞAR, Ankara	Ender YARSAN, Ankara
Ateş KARA, Ankara	Erhan ESER, Manisa
Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir	Erkan YILMAZ, Ankara
Aykut ÖZKUL, Ankara	Fatih BAKIR, Ankara
Ayşegül GÖZALAN, Ankara	Fehminaz TEMEL, Ankara
Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Çorum	Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara
Banu ÇAKIR, Ankara	Fügen YÖRÜK, Ankara
Bayram ŞAHİN, Ankara	Gönül ŞAHİN, Ankara
Bekir ÇELEBİ, Ankara	Görkem MERGEN, Ankara
Belgin ÜNAL, İzmir	Gül ERGÖR, İzmir
Berrin ESEN, Ankara	Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara
Birce TABAN, Ankara	Gülberk UÇAR, Ankara
Bülent ALTEN, Ankara	Gülnur TARHAN, Adıyaman
Celal F. GÖKÇAY, Ankara	Hakan ABACIOĞLU, İzmir

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Haluk VAHABOĞLU, İstanbul

Hasan IRMAK, Ankara

Hasan TEZER, Ankara

Hayrettin AKDENİZ, Bolu

Hilal ÖZDAĞ, Ankara

Hülya ŞİMŞEK, Ankara

Hürrem BODUR, Ankara

Işıl MARAL, İstanbul

İ. Mehmet Ali ÖKTEM, İzmir

İpek MUMCUOĞLU, Ankara

İrfan EROL, Ankara

İrfan ŞENCAN, Ankara

İsmail CEYHAN, Ankara

Kemal Osman MEMİKOĞLU, Ankara

Koray ERGÜNAY, Ankara

Levent AKIN, Ankara

Mahinur AKKAYA, Ankara

Mehmet Ali ONUR, Ankara

Mehmet Kürşat DERİCİ, Çorum

Mestan EMEK, Antalya

Metin KORKMAZ, İzmir

Mithat ŞAHİN, Kars

Muhsin AKBABA, Adana

Murat DİZBAY, Ankara

Mustafa AKSOY, Ankara

Mustafa ERTEK, Ankara

Mustafa Necmi İLHAN, Ankara

Mustafa Kasım KARAHOCAGİL, Kırşehir

Mustafa Kemal BAŞARALI, Ankara

Mustafa KAVUTÇU, Ankara

Mükerrem KAYA, Erzurum

Nazan YARDIM, Ankara

Nazime MERCAN, Denizli

Nazmi ÖZER, Ankara

Nilay ÇÖPLÜ, Ankara

Nur AKSAKAL, Ankara

Nur Münevver PINAR, Ankara

Nuran ESEN, İzmir

Oğuz GÜRSOY, Denizli

Orhan BAYLAN, İstanbul

Orhan YILMAZ, Ankara

Özlem KURT AZAP, Ankara

Pınar KAYNAR, Ankara

Pınar OKYAY, Aydın

Rahmet GÜNER, Ankara

Recep AKDUR, Ankara

Recep KEŞLİ, Afyonkarahisar

Recep ÖZTÜRK, İstanbul

Rıza DURMAZ, Ankara

S. Aykut AYTAÇ, Ankara

Saime ŞAHİNÖZ, Gümüşhane

Sami AYDOĞAN, Kayseri

Sarp ÜNER, Ankara

Seçil ÖZKAN, Ankara

Seda KARASU YALÇIN, Bolu

Seda TEZCAN, Mersin

Selçuk KAYA, Trabzon

Selçuk KILIÇ, Ankara

Selim KILIÇ, Ankara

Selin NAR ÖTGÜN, Ankara

Sema BURGAZ, Ankara

Semra Ayşe GÜREŞER, Çorum

Sercan ULUSOY, İzmir

Sultan ESER, İzmir

Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa

Sümer ARAS, Ankara

Şule SENSES ERGÜL, Ankara

Tevfik PINAR, Kırıkkale

Turan BUZGAN, Ankara

Yeşim ÖZBAŞ, Ankara

Yunus Emre BEYHAN, Van

Zafer ECEVİT, Ankara

Zafer KARAER, Ankara

Zati VATANSEVER, Kars

Zeynep GÜLAY, İzmir

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

Dergide yayımlanmak üzere gönderilen yazılar, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi yazım kurallarına göre hazırlanmalıdır. Başvurular www.turkhijyen.org adresinden “Çevrimiçi Makale Gönder, Takip Et, Değerlendir Programı” aracılığıyla on line olarak yapılabilir.

Gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallara uyum aranır. Kurallara uymayan yazılar daha ileri bir incelemeye gerek görülmezsin yazılarına iade edilir.

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

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

- Yazının başlığı kısa olmalı ve küçük harfle yazılmalıdır.
- Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.
- Çalışma bilimsel bir kuruluş ve/veya fon ile desteklenmişse dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka belirtilmelidir.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11. Araştırma yazıları;

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

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

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

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

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

Süreli 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 numaraları.

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

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

• Dergi eki için örnek: Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional splenia: 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 Immune Response. 5th ed. New York: Harper and Row, 1974.

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

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

Web adresi: Eğer doğrudan “web” adresi referans olarak kullanılacaksa adres birlikte parantez içinde bilgiye ulaşılan tarihte belirtilmelidir. Web erişimli makalelerin referans olarak metin içinde verilmesi gerektiğinde DOI (Digital Object Identifier) numarası verilmesi şarttır.

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

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

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

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

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

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

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

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

16. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

17. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü

Tel : (0312) 565 55 80

Faks : (0312) 565 55 91

e-posta : thsk.thdbd@saglik.gov.tr

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

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

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

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

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

- The title should be short and written in lower case.
- The short title should not exceed 40 characters.
- The study supported by a fund or scientific organisation must be mentioned in a footnote or in the acknowledgements.
- The study presented in a conference/symposium must be mentioned with the type of presentation in footnotes or in the acknowledgements.

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

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

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

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

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

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

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

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

11. Research Articles;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Example of standard journal article: Demirci M, Unlü M, Sahin U. A case of hydatid cyst diagnosed by kinyoun staining of lung bronco-alveolar fluid. *Türkiye Parazitoloj 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 papevars: Entrala E, Mascaro C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, Izmir-Turkey. 1994.

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

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

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

12. Research articles should have up to 40 references.

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

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

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

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

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

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

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

General Directorate of Public Health

Tel : +90 312 565 55 80

Fax : +90 312 565 55 91

e-mail : thsk.thdbd@saglik.gov.tr

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

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

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

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

EDITORIAL POLICY

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

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

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

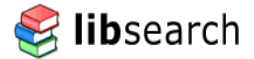
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne
www.turkhijyen.org adresinden online olarak makale gönderilebilir

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



Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi (Türk Hij Den Biyol Derg); CAB Abstracts (Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, Diagnosis of Human Diseases, Tropical Diseases Bulletin, Global Health, AgBiotech, Veterinary Abstracts, Food Contamination, Residues and Toxicology, Human Toxicology and Poisoning), DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Ulrichsweb and Serials Solutions, NewJour, Genamics JournalSeek, Academic Journals Database, Scirus Scientific Database, Ovid Link Solver, BASE (Bielefeld Academic Search Engine), EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Libsearch, Medoanet, SCOPUS, CrossRef, Türkiye Atıf Dizini, Akademik Türk Dergileri İndeksi, Türk - Medline ve TUBITAK-ULAKBİM Türk Tıp Dizini'nde dizinlenmektedir.

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (Türk Hij Den Biyol Derg) is indexed in CAB Abstracts (Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, Diagnosis of Human Diseases, Tropical Diseases Bulletin, Global Health, AgBiotech, Veterinary Abstracts, Food Contamination, Residues and Toxicology, Human Toxicology and Poisoning), DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Ulrichsweb and Serials Solutions, NewJour, Genamics JournalSeek, Academic Journals Database, Scirus Scientific Database, Ovid Link Solver, BASE (Bielefeld Academic Search Engine), EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Libsearch, Medoanet, SCOPUS, CrossRef, Türkiye Atıf Dizini, Turkish Academic Journals Index, Türk - Medline, and TUBITAK - ULAKBİM Türk Tıp Dizini.



İLETİŞİM

CORRESPONDENCE

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi Editörlüğü

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

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

Tel: 0312 565 55 80

Faks: 0312 565 55 91

e-posta: thsk.thdbd@saglik.gov.tr

http: www.hsgm.gov.tr

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Surveillance and Control of Invasive Aedes Species in The Eastern Black Sea Area of Turkey
Türkiyenin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde istilacı Aedes türlerinin izlenmesi ve kontrolü
Muhammet Mustafa AKINER, Berna DEMİRCİ, Hilal BEDİR, Murat ÖZTÜRK, Rıdvan DEMİRTAŞ, Ahmet Ferhat DOĞAN, Akgün GOKDEMİR, Seher TOPLUOĞLU, Unal ALTUG, Zehra Özlem KURTCEBE, Hasan IRMAK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.68736 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 225 - 238
2. Effects of colchicine on cell cycle arrest and MMP-2 mRNA expression in MCF-7 breast adenocarcinoma cells
Kolşisin'in MCF-7 insan meme adenokarsinoma hücrelerinde hücre döngüsü tutulumu ve MMP-2 mRNA ifade seviyesi üzerine etkisi
Filiz BAKAR-ATEŞ, Nuri ÖZMEN, Ecem KAYA-SEZGİNER, Emin Emre KURT
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.22755 (Dili: "İngilizce" - Language: "English") 239 - 244
3. Bruselloz ve atipik pnömoni şüpheli hastalarda Coxiella burnetii antikor varlığının ELISA ve IFA yöntemleri ile araştırılması
Detection of Coxiella burnetii antibodies in patients with suspicion of brucellosis and atypical pneumonia by ELISA and IFA methods
Alev ÇETİN-DURAN, Cem ERGON
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.23255 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 245 - 252
4. 2-pirazolin yapısındaki yeni bir bileşiğin sentezi, moleküler modellemesi ve monoaminoksidaz inhibitörü etkisinin araştırılması
Investigation of synthesis, molecular modelling and monoaminoxidase inhibitor activity of a new 2-pyrazoline compound
Begüm EVRANOS-AKSÖZ, Gülberk UÇAR, Kemal YELEKÇİ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.59219 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 253 - 264
5. Üçüncü basamak bir hastanede tespit edilen cerrahi alan enfeksiyonlarının değerlendirilmesi
Evaluation of surgical site infections detected in a tertiary care hospital
Halide ASLANER, Esragül AKINCI, Ayşe BUT, Dilek KANYILMAZ, Aliye BAŞTUĞ, Adalet AYPAK, Meltem Arzu YETKİN, Pınar ÖNGÜRÜ, Hürrem BODUR
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.77150 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 265 - 276
6. Bir hastane yemekhanesinde yaşanan gıda zehirlenmesinin incelenmesi
Investigation of food poisoning in a hospital cafeteria
Özlem TERZİ, Şule ÖZDEMİR, Mustafa Yasin SELÇUK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.60783 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 277 - 286
- Olgu Sunumu / Case Report
7. Psychoda albipennis'e bağlı tekrarlayan üriner miyazis
Recurrent urinary myiasis caused by Psychoda albipennis
Çiğdem TORUN-EDİS, Özlem EROL, Aycan GAZYAĞCI, Mehmet KAVAK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.59455 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 287 - 290
- Derleme / Review
8. Viral enfeksiyonlarda otofaji
Autophagy in viral infections
Onur ÜLGENALP, Bahattin Taylan KOÇ, Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.79923 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 291 - 304
9. Özel saklama koşulu gerektiren veya soğuk zincire tabi ilaçlar ve uygulamalar açısından değerlendirmeler
Drugs subject to special storage conditions or cold chain and evaluation in terms of applications
Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN, Asuman BOZKIR
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2018.67674 (Dili: "Türkçe" - Language: "Turkish") 305 - 322

Surveillance and Control of Invasive Aedes Species in The Eastern Black Sea Area of Turkey

Türkiyenin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde istilacı Aedes türlerinin izlenmesi ve kontrolü

Muhammet Mustafa AKINER¹, Berna DEMİRCİ², Hilal BEDİR³, Murat ÖZTÜRK¹, Rıdvan DEMİRTAŞ¹, Ahmet Ferhat DOĞAN⁴, Akgün GÖKDEMİR⁵, Seher TOPLUOĞLU⁶, Ünal ALTUĞ⁶, Zehra Özlem KURTCEBE⁶, Hasan IRMAK⁷

ABSTRACT

Objective: Invasive mosquito species are a huge problem world-wide and can cause serious mosquito borne disease epidemics. Recent surveys in Europe revealed that many autochthonous cases of chikungunya are related to the invasive *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* species. Extensive surveillance of these species and other invasive Aedine mosquito species is required for the prevention and timely response to possible outbreaks. This study focuses on surveillance and control operation success in the Eastern Black Sea region of Turkey.

Methods: This surveillance study was performed during the 2016-2017 vector active season. Three cities were surveyed according to ECDC and CDC guidelines. Control operations were performed during the second half of the 2017 active season under the supervision of the Turkish Ministry of Health's Zoonotic and Vector-borne Diseases Department. IGR, a Bti/Bs mix and liquid Bti were used for larval control. Different pyrethroids, nicotine mimics and natural products were used for

ÖZET

Amaç: İstilacı sivrisinek türleri tüm kıtalarda büyük problem olup birçok alanda sivrisinek kökenli ciddi hastalık salgınlarına neden olabilmektedir. Avrupa Kıtasındaki son araştırmalar, pek çok otonom chikungunya vakalarının, istilacı *Aedes albopictus* ve *Aedes aegypti* türleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu türlerin ve diğer istilacı Aedine sivrisinek türlerinin kapsamlı şekilde izlenmesi, muhtemel salgınları önlemek ve zamanında müdahale etmek için gereklidir. Bu çalışma, Doğu Karadeniz bölgesinde izleme ve kontrol çalışmalarının başarısı üzerine odaklanmıştır.

Yöntem: İzleme çalışması 2016-2017 vektör aktif sezonda ve üç şehirde ECDC ve CDC yönergelerine göre gerçekleştirilmiştir. Kontrol çalışmaları, 2017 vektör aktif sezonun ikinci yarısında T.C. Sağlık Bakanlığı Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi denetimi altında gerçekleştirilmiştir. Larva kontrolü için IGR, Bti/Bs karışımı ile sıvı Bti kullanılmıştır. Ergin kontrolü için farklı pyrethroidler, nikotini taklit eden maddeler ve doğal ürünler kullanılmıştır. Popülasyon dalgalanmaları

¹Recep Tayyip Erdogan University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Rize

²Kafkas University, Faculty of Arts and Sciences, Molecular Biology and Genetics Department, Kars

³Kafkas University, Faculty of Medicine, Medical Parasitology Department, Kars

⁴Turkish Ministry of Health, Provincial Health Directorate, Rize

⁵Turkish Ministry of Health, Provincial Health Directorate, Artvin

⁶General Directorate of Public Health, Zoonotic and Vector-Borne Diseases Department, Ankara

⁷General Directorate of Public Health, Ankara



İletişim/Corresponding Author : Muhammet Mustafa AKINER

RTE Üni. Fen Edebiyat Fak.Biyoloji Bölümü Zihni Derin Kampüsü, Fener 53100 Rize - Türkiye
Tel : +90 534 264 12 42 E-posta/ E-mail : akiner.m@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 16.02.2018
Kabul Tarihi / Accepted : 16.05.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.68736

Akiner MM, Demirci B, Bedir H, Öztürk M, Demirtaş R, Doğan AF, Gökdemir A, Topluoğlu S, Altuğ Ü, Kurtcebe ZÖ, Irmak H. Surveillance and control of invasive Aedes species in the Eastern Black Sea area of Turkey. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(3): 225-238

adult control. Six areas of *Ae. albopictus* and four areas of *Ae. aegypti* were selected for assessment of population fluctuations and control operations success.

Results: Twenty-two widely established and two locally established *Ae. albopictus* populations were detected in 2016. Four widely established and ten locally established *Ae. aegypti* populations were detected in that the same year. In 2017, 544 potential larval breeding sites were tested in three cities. Persistent infestations of *Ae. albopictus* were discovered in 194 of these locations. *Ae. aegypti* was detected in only 25 locations throughout the area. Population densities fluctuated during the season with two population peaks (June-minor, September-major) of *Ae. albopictus* in 2016. In contrast, population peaks were seen in August and October in *Ae. aegypti*. The average larval control success was 69%, but adult control success was only 46% for all areas throughout the season for *Ae. albopictus*. Similar results were observed for *Ae. aegypti*, with larval control success at 61% and adult control success at 37% after control operations were performed.

Conclusion: The study revealed the persistent rapid expansion and high population density of two invasive mosquito species in the infested areas. Control success was achieved at over 60% for larvae and around 40% for adults despite the limited time of this study. The low level of control operation success may be explained by many factors, but the principal factors are the geographical features of the region, climatic variations and restrictions on insecticide usage in tea plantation areas. Therefore, an urgent strategic plan is essential for integrated control strategies.

Key Words: *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, invasive mosquitoes, surveillance, population fluctuations, vector control

ve kontrol çalışmalarının başarısının değerlendirilmesi amacıyla *Ae. albopictus* için altı, *Ae. aegypti* için dört bölge seçilmiştir.

Bulgular: 2016 yılında yirmi iki yaygın ve iki yerel yerleşik *Ae. albopictus* popülasyonu saptanmıştır. 2016 yılında yaygın oranda yerleşik *Ae. aegypti* popülasyonu dört noktada, yerel yerleşik popülasyon on noktada bulunmuştur. 2017 yılında üç şehirde 544 muhtemel larva gelişim alanı kontrol edilmiş, 194 noktanın *Ae. albopictus* tarafından istila edildiği ve kalıcı olarak yer aldığı bulunmuş, *Ae. aegypti* ise tüm alanda 25 noktada bulunmuştur. 2016 yılında *Ae. albopictus* popülasyon yoğunlukları sezon boyunca dalgalanmış ve iki pik yapmıştır (Haziran'da küçük, Eylül'de büyük). Bu durumun aksine *Ae. aegypti* pikleri Ağustos ve Ekim aylarında görülmüştür. Tüm sezon boyunca tüm alanlarda *Ae. albopictus* için ortalama larva kontrol başarısı %69 fakat ergin kontrol başarısı %46 oranında bulunmuştur. *Ae. aegypti* için de hemen hemen benzer bir durum gözlenmiştir. Kontrol çalışmalarından sonra larva kontrol başarısı %61, ergin kontrol başarısı %37 oranında bulunmuştur.

Sonuç: Çalışma, istila bölgesinde istilacı iki türün kalıcı, hızlı yayılma biçimi gösterdiğini ve yüksek popülasyon yoğunluklu olduğunu göstermiştir. Kontrol çalışmaları kısıtlı bir zaman periyodu içinde olsa da başarı oranı larva için %60'ın üzerinde, ergin için %40 civarında bulunmuştur. Kontrol başarısının düşük seviyede kalması pek çok nedenle açıklanabilirse de ana faktörler, alanın coğrafik yapısı, iklimsel çeşitliliği ve çay ekim alanlarında kısıtlı insektisit kullanımındır. Bu nedenle entegre vektör mücadelesi için acilen stratejik plan yapılması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, istilacı sivrisinekler, izleme, popülasyon dalgalanması, vektör kontrolü

INTRODUCTION

Invasive mosquito species are defined by their potentiality to be introduced into and rapidly colonize new areas beyond their native territory. Generally, they are the cause of harmful effects on the environment, the economy and the health of animals or humans. Human movement and international trade facilities are the main reasons for their introduction to new areas. These invasive mosquito species are well adapted to dwelling amongst human settlements and buildings where they have access to abundant sources of host blood, resting places and larval breeding sites (1). The invasive *Aedes* species introduction to Europe is a well-known story; this invasion started with the Asian tiger mosquito (*Ae. albopictus*) in Albania in 1979 (2), and it was discovered in Italy in the 1990s (3). To date, *Ae. albopictus* has colonized almost all Mediterranean countries and many central European countries (4). The first recorded discovery of this species in Turkey was in 2011 in the Thrace region (5). By 2015, established populations were in the Eastern Black Sea region (6). The Asian bush mosquito, *Aedes japonicus*, is spreading in some Central European countries. *Aedes atropalpus* and *Aedes koreicus* have been introduced to limited areas in Europe (1). *Ae. aegypti* was established in Europe during the 17th-19th centuries, but during the second half of the 20th century, it disappeared in southern Europe. This species has since returned to Europe and established populations are located in Madeira, Russia, Abkhazia and Georgia¹. Recently, established populations were discovered on the eastern coast of the Black Sea in Turkey (6).

Ae. albopictus (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) is a competent vector of grave arboviral infections including dengue fever, yellow fever, chikungunya, and Zika (7-10). There have been many studies made about the rapid expansion of *Ae. albopictus* (6, 11, 12). This species has rapidly spread from native tropical and subtropical areas of Southeast Asia to Europe, Africa, America, and Australia in a few decades of the 20th century although the normal

dispersal ability is only around 800-900 meters (13-15).

Ae. aegypti is commonly known as the yellow fever mosquito and is a vector of dengue, chikungunya and Zika virus diseases. It originated from Africa and has two genetically distinct forms: *Ae. aegypti formosus*, the zoophilic tree hole mosquito, and *Ae. Aegypti*, the domestic form (16-17). *Ae. aegypti* has spread from Africa to tropical and subtropical regions of the World (17). It was detected in Europe, especially along the Mediterranean coast, in the first half of the 20th century, but it disappeared from continental Europe after World War II (6). It recolonized on Madeira Island, in the southern part of Russia, and in Georgia after five or six decades, and it has recently been reported in the Netherlands (18-19). In 2015, it was discovered on the Eastern Black Sea coast of Turkey with an expanding east-west pattern from Georgia to Turkey (6). Due to intense commercial and passenger flux, the World Health Organization (WHO) and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) have recommended the implementation of vector control measures and surveillance facilities to hinder the vector's expansion throughout the continent (20-21).

Recent surveys of invasive mosquitoes indicate that the *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* are the most prevalent species in Europe (22). These two species are able to transmit chikungunya, Zika virus and dengue fever; none of which have a specific cure or vaccine. Furthermore, *Ae. albopictus* is a bridging vector between animals and humans for some pathogens (23). Therefore, efficient vector control strategies and operations are important tools for the prevention of these diseases and possible epidemics.

In Turkey, mosquito control activities started in the first years of the Republic in 1925 with antilarval operations together with malaria control campaigns. There is no information about mosquito control activities from 1930-1945. Through the years, numerous larvicides and adulticides have

been used for mosquito control in Turkey. DDT was first introduced as residual spraying in 1946; hereby, chemical control activities began in Turkey (24). Mosquito control activities have been conducted by the Turkish Ministry of Health, municipalities (particularly *Culex pipiens* control in and around cities), and by private companies in touristic areas.

This study aimed to report the surveillance of two invasive mosquito species during the active seasons of 2016-17 and to assess the mosquito control operations in the Eastern Black Sea region in the same period.

MATERIAL and METHOD

The entire Middle and Eastern Black Sea region was surveyed from Sarp, a village which is an entry point from Georgia, to the Amasya Province for invasive mosquito species during the active vector season (from May to October) in 2016. Study and control areas were comprised of three cities which were selected according to the surveillance study. All three cities are located in Turkey (Artvin, Rize and

Trabzon Provinces and Districts) near the Georgian border (Fig. 1). Possible larval habitats were checked biweekly in order to determine vector presence, persistence, and spread from June through October.

An active surveillance study was conducted in 2016-17 and different collection techniques were used (larval searches with a larval dipper and human landing catches by mouth aspirator for adults) according to ECDC¹ and CDC (Center for Disease Control and Prevention) (25) guidelines. For larval collections, the same used tires were utilized each time for larvae collection, and for adult collections, individuals remained in the same location for the human landing catches. First, used tire storage areas and their surrounding areas were checked. Secondly, thrown used tires or waste tires used for various purposes which can create larval breeding areas (man-made containers) were inspected for larvae. Thirdly, cemeteries and their surrounding areas were examined. Larval collection was performed with larval dippers and a count consisted of the total larvae for three dips. Human landing catches were conducted a



Figure 1. Study and control operations areas during the 2016-17 active vector seasons

period of ten minutes per individual. All three cities were examined throughout the months for vector spread and the presence of colonized populations. Population count studies were conducted to assess abundance and in order to determine the usage, application frequency, and effectiveness of different control agents. Six locations for *Ae. albopictus* and four locations for *Ae. aegypti* were surveyed for this

purpose. These population counts were conducted for two years.

Control operations began during the third week of July and different control agents were used for this purpose. Control operations started with larvae control and adulticides were used if the adult density was high in an operational area. The utilized insecticides are listed on Table 1. Insecticide usage profiles and

Table 1. Utilized insecticides during control operations by area

	Insecticide/month	July	August	September
Artvin	Pyriproxyfen Briquet 10%	x		
	Bti+Bs Granule 50 BS ITU/mg		x	
	Bti liquid 1200 ITU		x	x
	Geraniol 19%	x	x	
	Cypermethrin 10%+Tetramethrin 2%+PBO 10%	x		x
	Lambda cyhalothrin 5%+Imidaclobrid 20%		x	x
	Cypermethrin 35%+Tetramethrin 5%+PBO 15%		x	x
	Cyfluthrin 10%+Tetramethrin 5%+PBO 10%			x
	Insecticide/month	July	August	September
Rize	Pyriproxyfen Briquet 10%	x		
	Bti+Bs Granule 50 BS ITU/mg		x	
	Bti liquid 1200 ITU		x	x
	Geraniol 19%	x	x	
	Cypermethrin 10%Tetramethrin 2%+PBO 10%	x		x
	Lambda cyhalothrin 5%+Imidaclobrid 20%			x
	Cypermethrin 35%+Tetramethrin 5%+PBO 15%		x	x
	Cyfluthrin 10%+Tetramethrin 5%+PBO 10%			x
	Insecticide/month	July	August	September
Trabzon	Pyriproxyfen Briquet 10%	x		
	Bti+Bs Granule 50 BS ITU/mg		x	
	Bti liquid 1200 ITU		x	x
	Geraniol 19%	x	x	
	Cypermethrin 10%Tetramethrin 2%+PBO 10%	x		x
	Lambda cyhalothrin 5%+Imidaclobrid 20%			x
	Cypermethrin 35%+Tetramethrin 5%+PBO 15%		x	x
	Cyfluthrin 10%+Tetramethrin 5%+PBO 10%			x

frequencies were determined according to area count results and whether or not adults were present.

RESULTS

Established populations of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* were first detected in September 2015 during a surveillance study. Twelve established populations of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* were identified within the area from the Georgian border to the Giresun Province border. These established populations were detected in eight villages or towns within that area (Artvin, Borçka, Hopa, Kemalpaşa, Arhavi, Fındıklı, Pazar, and Vakfıkebir) (Unpublished data).

Widely established *Ae. albopictus* populations were detected in 22 locations of the area during a surveillance study in 2016 and last spread point in the expansion was Espiye in the Giresun province. Furthermore, every possible larval breeding site in Kemalpaşa, Hopa, Arhavi, Borçka, and Fındıklı districts was determined. Two locally established populations in Trabzon city were identified in 2016. Widely established populations of *Ae. aegypti* were detected in four locations: Hopa, Fındıklı, Pazar and Ardeşen. Additionally, ten locally established populations were identified in 2016. The last spread point of their expansion was discovered in an industrial area of Trabzon.

In 2017, within the Artvin Province, 217 possible larval breeding sites were inspected. It was found that *Ae. albopictus* had widely distributed into the Artvin city center, as well as in the Borçka, Hopa, Kemalpaşa, Sarp, Arhavi districts and their villages within the Artvin Province (a total of 87 locations) by the first week of June. In the Rize Province, 200 possible larval breeding sites were inspected. Established populations were found in 60 areas. As in Artvin, the same situation was discovered in the Rize Province. *Ae. albopictus* had widely established in Fındıklı, Ardeşen, Çamlıhemşin, Pazar, Derepazarı and the Çayeli city center. Widely established populations

were ascertained in Çamlıhemşin, Çayeli, the Rize city center and Derepazarı areas, although the initial detection of the *Ae. albopictus* in these cities and villages was in 2017. The Trabzon district has three focal points and widely established populations were found in all three areas. In June, 127 areas were inspected and established populations were found in 47 of these. *Ae. aegypti* was discovered in only 25 locations throughout the area and persisted in 10 locations.

Population counts were performed in 2016-17. The results of the population densities varied widely (Fig. 2). Population densities increased in June and slowly decreased in July. In August, larval densities decreased in the first and third weeks of August but increased again during September. In October, densities decreased, almost reaching zero. Adult densities showed a similar trend. Populations showed a small peak in June and large peak in September.

The highest larval and adult densities were ascertained in Borçka and the second highest were found in Pazar (Fig. 3). In 2017, the larval densities in the areas were found to be approximately one and a half to twofold higher than those of 2016; the same was discovered with adult densities. Borçka and Pazar larval densities were higher than those of other areas. June and July larval densities were approximately at the same levels prior to control operations. In the third week of June, vector control operations commenced with the application of larvicides and adulticides. The decrease in larval densities varied 55%-82% when compared to 2016. The decrease in adult densities varied 17%-94% when compared to 2016. Average larval control success was 69%, and adult control operations success was 46% for all areas throughout the season.

Population densities for *Ae. aegypti* were found to be lower than those of *Ae. albopictus* in 2016. Larval densities increased gradually from June through August but decreased in September (Fig. 4). In October, the densities increased again. Adult

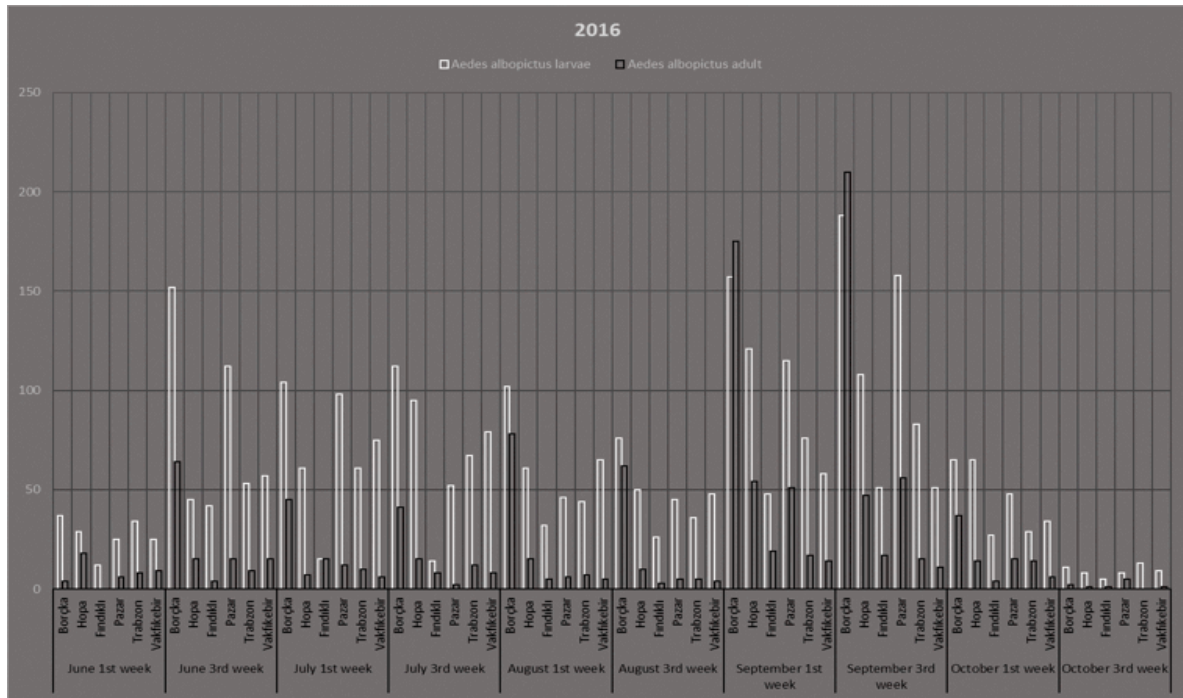


Figure 2. Population fluctuations of the *Aedes albopictus* in the 2016 active vector season without control operations

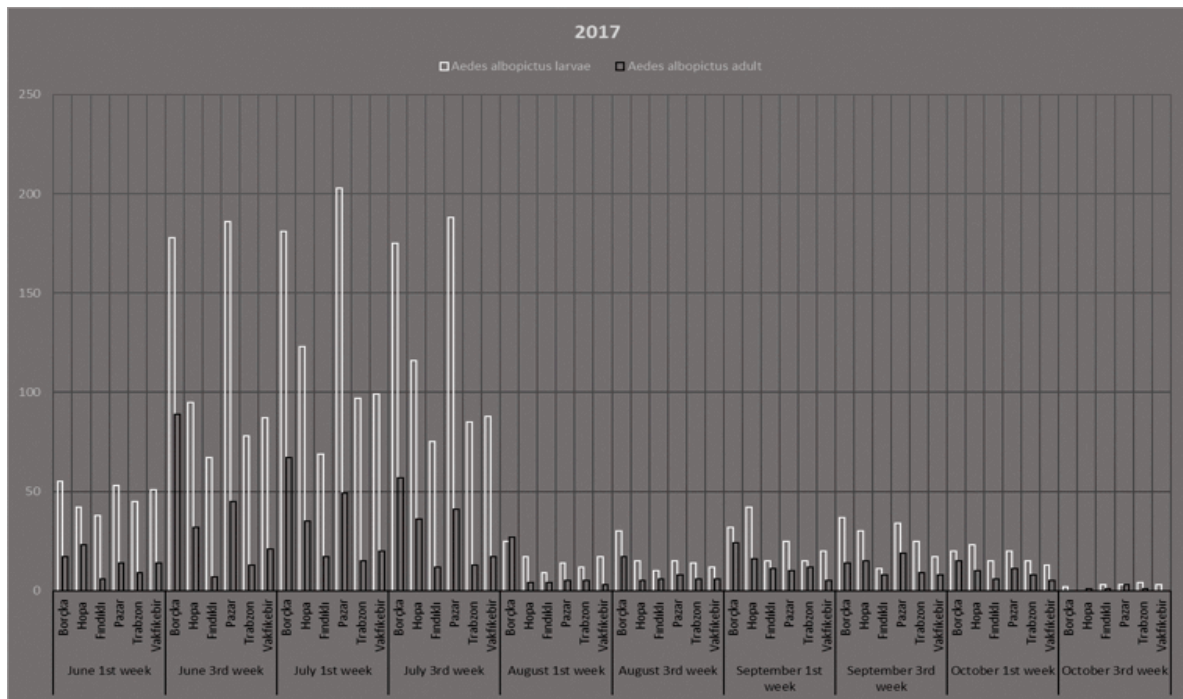


Figure 3. Population fluctuations of the *Aedes albopictus* in the 2017 active vector season without control operations

densities were neither high nor correlated with larval densities.

Larval densities varied greatly for *Ae. aegypti* during June and July and were higher than the densities of 2016. In contrast to *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* increased again in October (Fig. 5). Larval

density reductions varied 15%-100%; however, adult density reductions varied 0%-100% after control applications in August. Additional larvae and adults were found in some places (Hopa, Findıklı and Trabzon) when compared to 2016. Average larval control success was 61%, and adult control operations

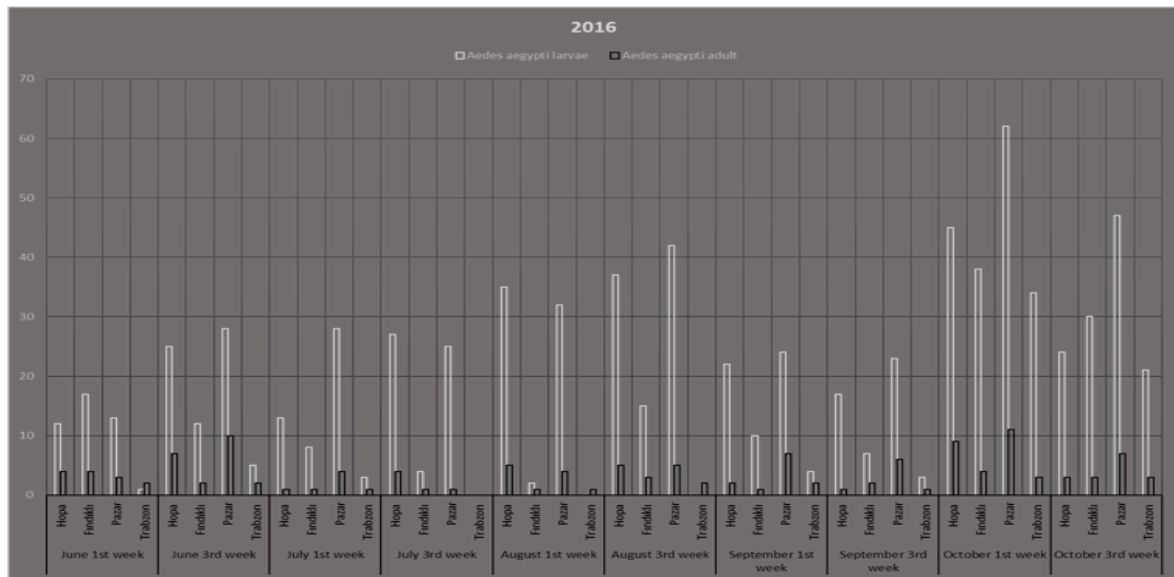


Figure 4. Population fluctuations of the *Aedes aegypti* in the 2016 active vector season without control operation

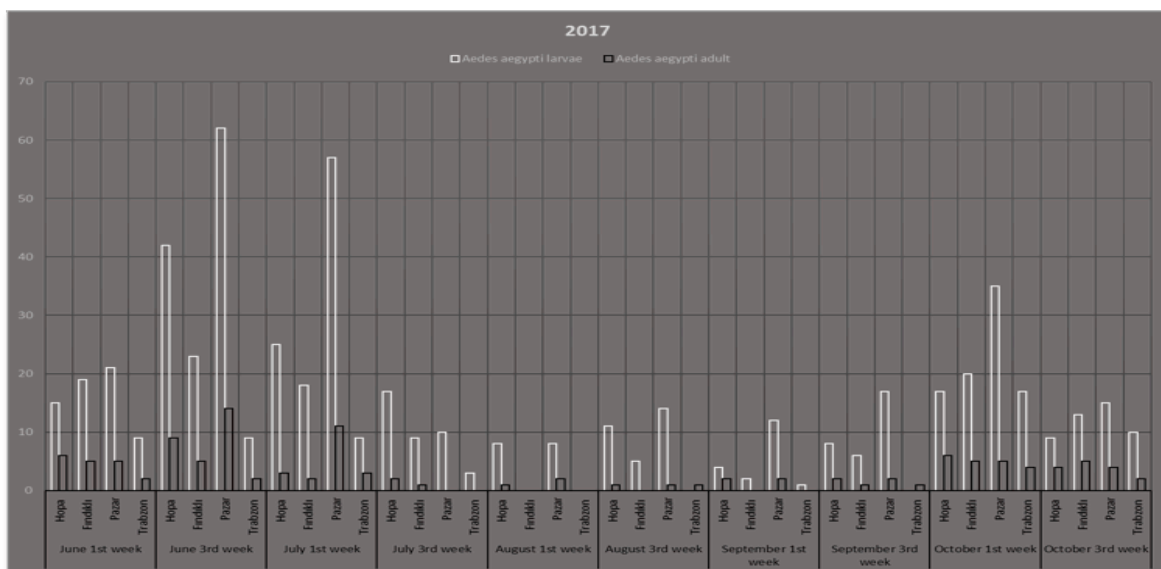


Figure 5. Population fluctuations of the *Aedes aegypti* in the 2017 active vector season with and without control operations

success was 37% for all areas throughout the season.

DISCUSSION

Mosquitoes can cause serious threats to human and animal health attributable to their vectorial capacity. Both the Asian tiger mosquito and the yellow fever mosquito have become a significant concern due to their seemingly uncontrollable expansion and their many risks to public health. Four significant infections transmitted by *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*: dengue, yellow fever, chikungunya, and Zika virus, lead to observable consequences, such as morbidity, mortality, and healthcare expenditure, in low and middle-income countries (26). In addition to the diseases mentioned above, these *Aedes* mosquito species can be a vector of endemic viral infections such as West Nile Virus infection (WNV), Mayaro virus infection, and Eastern Equine Encephalitis virus infection (27-29).

Turkey is currently at risk for arboviral diseases such as West Nile fever, dengue, and yellow fever. West Nile virus was first detected in domestic animals (30); the first human cases were ascertained in 1977 (31). Several times antibodies to WNV have been detected in animals and humans (32-33). In 2010, the WNV infection was detected in 47 individuals and 10 of these patients perished (34). Human dengue virus antigens were first detected in 1980 (35-36). Dengue virus antigens have been identified in blood donors from central Anatolia. Yellow fever has not been reported in Turkey, but anti-YFV antibodies were reported in 1980 (35). Currently, YFV-IgGs antibodies have been detected in the sera (36). Although autochthonous chikungunya cases have not been reported in Turkey, imported chikungunya cases from New Delhi were detected in 2012 (37).

Due to the above risks, and for any other unknown arboviral disease risks, there was an urgent need for a surveillance study and control actions against the established populations in the Eastern Black Sea area. Here, we surveyed the invasive species

presence, persistence and expansion in three cities in which they were first detected in 2015. Secondly, we gauged the annual population fluctuations prior to and following all control activities.

In 2016, a surveillance study was conducted and locations were described in terms of the presence of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* in well-established populations. The last spread point for the *Ae. albopictus* invasion was in Espiye-Giresun and the *Ae. aegypti*'s was in Trabzon. Some districts, such as Kemalpaşa, Borçka, and Vakfikebir, contain new larval breeding areas. Larvae and adults were detected in every possible area within these districts. These results revealed that the dispersion and newly established populations were around the first discovered locations; in addition, these populations were continuing to spread to other districts and cities. This dispersion and establishment was possibly affected by factors such as climate, land usage, and waste tire usage. Population fluctuations revealed the considerably high population areas in 2016. Populations displayed a bimodal structure and the first peak was determined to be in the end of June while the second and largest peak was identified to be in September. Densities were stable or relatively less so during the six week period from the last week of July to the end of August. *Ae. aegypti* well-established populations were found lower than those of *Ae. albopictus*, but was generally in the same area as *Ae. albopictus*. Furthermore, population densities were lower than the *Aedes albopictus* and exhibited a rising trend from the beginning to the end of the active season. *Ae. albopictus* densities had two peaks and decreased from the first peak to the second peak. *Ae. aegypti* had one peak towards the end of the active season wherein *Aedes albopictus* densities were low. Furthermore, densities were relatively high between the two peak periods of *Ae. albopictus*. This can be explained as competition between the two species. Jansen and

Beebe (38) determined this, and they revealed that *Ae. aegypti* distribution and density was affected by the invasion of *Ae. albopictus* in the United States.

Well-established populations in three cities and their districts were determined in 2017. Many areas had well-established populations, 194 points in three cities and districts, in the initial part of the surveillance study, prior to control operations. This can be linked to the population movement within Turkey and the bordering areas with Georgia and human activity in these areas. Population movement at the Sarp border was more than 20,000 people per day during the active season. Local human movement in the areas is higher due to tea harvesting and other agricultural facilities. These correlate with the global expansion of the *Ae. albopictus*; its chaotic dispersion is facilitated by human activity (39). Larvae were discovered in most larval development areas in 2017, for instance, inside used tires, plastic containers, cans, buckets, and puddles; in contrast, in 2015 and 2016, larvae were found in some larval development areas and only inside used tires and waste plastic cups. Different studies indicated that *Ae. albopictus* is able to tolerate climatic conditions that differ from its native range and is able to use different larval habitats (40-41). Climatic conditions and rainfall regimes of the Eastern Black Sea area are unlike other areas of Turkey. This factor fostered an extension of the active season and the formation of new potential larval breeding sites.

Control operations with different larvicides and adulticides commenced in the third week of July. Control operations began with the application of pyriproxyfen (IGR) throughout the entire area. At the same time, two different adulticides, Cypermethrin+tetramethrin+PBO and Geraniol, were applied to reduce adult population levels. In the second month, larval control continued with the application of Bti+Bs, granular formulation, and liquid Bti formulations. Adult control continued with employing

imidacloprid+lambda cyhalothrin formulations (in Artvin) and Cypermethrin+tetramethrin+PBO formulations (throughout the entire area). Only liquid Bti formulation was utilized for larval control in all areas; adult control was accomplished with imidacloprid+lambda cyhalothrin (in Artvin), Cypermethrin+tetramethrin+PBO, and cyfluthrin+tetramethrin+PBO formulations in September. Larval control reduced larval densities by an average of 69%; whereas adult control reduced adult densities by 46% in all areas during the season for *Ae. albopictus*. Climatic conditions and rainfall regimes in the study area affected the control facilities and reduced control success. The same situation was observed in *Ae. aegypti* control. Larval reduction was determined as 61%, and adult reduction was calculated as 37%. Control success was also linked to used tire storage area conditions and storage patterns. With the application of formulation of pyriproxyfen briquettes, larval control operations were found to be highly effective in the first two weeks; but, in order to reduce the risk of insecticide resistance development, the larvicide was changed to Bti and Bs combination or liquid Bt in the third week. We chose to use Bti and Bs combination or liquid Bti for larval control operations after pyriproxyfen in order to avoid resistance risk and cross resistance related to the detoxification mechanisms of pyriproxyfen which leads to a reduction in efficacy. Pyriproxyfen resistance was described in some *Ae. albopictus* strains in Florida and New Jersey (42). Both Andrighetti et al. (43), and Marcombe et al. (44) described temephos resistance and less susceptibility to pyriproxyfen in *Ae. aegypti* and implied a possible cross resistance between the two insecticide groups in mosquitoes.

Adult control was achieved primarily by the usage of pyrethroid based insecticides and secondarily with a nicotine mimic insecticide combination with pyrethroid. Adult control success was under 50% for the two species. Adult control in the used tire storage area could not be performed

properly as the insecticide could not be effectively applied throughout the entire area. Therefore, a low level of success in adult control was achieved. Another factor that impeded success was insecticide usage restrictions in the areas near larval breeding sites. The Turkish government prohibits the use of chemical based insecticides in the vicinity of tea plantations. Therefore, we applied insecticides to limited areas around larval breeding sites. Adults avoided contact with insecticides during operations by fleeing to agricultural areas. Merely one ultra-low volume adulticides, Geraniol, was used in crop areas. Other adulticides were used alternately during the operations due to an insecticide resistance risk.

Repeatedly the use of pyrethroids has increased the resistance levels of mosquitoes. In adults of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, resistance levels to pyrethroids are generally lower in Asia, Africa and the USA, but higher in Latin America (45). The resistance of these two species has not yet been defined for this area, although many areas in the Middle and Eastern Black Sea region include resistance populations of *Cx. pipiens* complex species (46). Therefore, it is

essential to annually assess the resistance status of these species to different classes of insecticides.

In conclusion, this study revealed the rapidly expanding distribution range and high population density of two invasive mosquito species in the invasion areas. Control operations success was achieved at 60% for larvae and at approximately 45% for adults. This level of control success may be ascribed to several factors, but the primary factor is due to area conditions and climatic variations in association with rainfall regimes. Rainfall regimes can significantly affect an insecticide's efficacy. Therefore, an urgent strategic plan is essential for integrated control strategies. Integrated control strategies combine chemical, physical, biological, and cultural control measures (22). WHO also recommends Integrated Vector Management (IVM), the aim of which is to improve the cost-effectiveness, ecological soundness and sustainability of disease-vector control (47). Therefore, it is crucial to monitor and evaluate during and after the implementation of control measures (22).

REFERENCES

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Guidelines for the surveillance of invasive mosquitoes in Europe. Technical Report. Stockholm; ECDC, 2012.
2. Adhami J, Reiter P. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc*, 1998; 14: 340-3.
3. Sabatini A, Raineri V, Trovato G, Coluzzi M. *Aedes albopictus* in Italy and possible diffusion of the species into the Mediterranean area. *Parassitologia*, 1990; 32 (3): 301-4.
4. Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, et al. A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoon Dis*, 2012; 12: 435-47.

5. Oter K, Gunay F, Tuzer E, Linton YM, Bellini R, Alten B. First record of *Stegomyia albopicta* in Turkey determined by active ovitrap surveillance and DNA barcoding. *Vector Borne Zoon Dis*, 2013; 13 (10): 753-61.
6. Akiner MM, Demirci B, Babuadze G, Robert V, Schaffner F. Spread of the Invasive Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea Region Increases Risk of Chikungunya, Dengue, and Zika Outbreaks in Europe. *Plos Negl Trop Dis*, 2016; 10 (4): e0004664.
7. Jentes ES, Pomeroy G, Gershman MD, Hill DR, Lemarchand J, Lewis RF, Staples JE, Tomori O, Wilder-Smith A, Monath TP. Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. 2011. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *The Lancet Infectious Diseases*, 2011; 11: 622-32.
8. Simmons CP, Farrar JJ, Chau NVV, Wills B. Dengue. *The New England Journal of Medicine*, 2012; 366: 1423-32.
9. Wong PSJ, Li MZI, Chong CS, Ng LC, Tan CH. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *Plos Negl Trop Dis*, 2013; 7: e2348.
10. Collantes F, Delacour S, Alarcón-Elbal PM, Ruiz-Arrondo I, Delgado JA, Torrell-Sorio, A, et al. Review of ten-years presence of *Aedes albopictus* in Spain 2004-2014: known distribution and public health concerns. *Parasit Vectors*, 2015; 8, 655.
11. Roiz D, Neteler M, Castellani C, Arnoldi D, Rizzoli A. Climatic factors driving invasion of the tiger mosquito (*Aedes albopictus*) into new areas of Trentino, northern Italy. *Plos ONE*, 2011; 6: e14800.
12. Rochlin I, Ninivaggi DV, Hutchinson ML, Farajollahi A. Climate change and range expansion of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) in Northeastern USA: implications for public health practitioners. *Plos ONE*, 2013; 8: e60874.
13. Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP. Spread of the tiger: Global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoon Dis*, 2007; 7: 76-85.
14. Enserink M. A mosquito goes global. *Science*, 2008; 320: 864-6.
15. Schaffner F, Mathis A. Dengue and dengue vectors in the WHO European Region: past, present, and scenarios for the future. *Lancet Infect Dis*, 2014; 14 (12): 1271-80.
16. Brown JE, Evans BR, Zheng W, Obas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, Zhao H, Caccone A, Powell JR. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution*, 2014; 68:514-25.
17. Brown JE, McBride CS, Johnson P, Ritchie S, Paupy C, Bossin H et al. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proc Biol Sci*, 2011; 278:2446-54.
18. Yunicheva YU, Ryabova TE, Markovich NY, Bezzhonova OV, Ganushkina LA, Semenov VB, et al. First data on the presence of breeding populations of the *Aedes aegypti* L. mosquito in Greater Sochi and various cities of Abkhazia. *Meditssinskaia Parazitologiya I Parazitarnye Bolezni*, 2008; 3: 403.
19. Scholte E, Den Hartog W, Dik M, Schoelitsz B, Brooks M, Schaffner F, et al. Introduction and control of three invasive mosquito species in the Netherlands, July October 2010. *Euro Surveill*, 2010; 15 (45): 19710.
20. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Zika virus disease epidemic: preparedness planning guide for diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Stockholm; 2016.
21. WHO, 2017. Dengue control. The mosquito [online]. Available from: <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/en/>.

22. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Vector control with a focus on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes: literature review and analysis of information. Stockholm; 2017.
23. Van den Berg H, Velayudhan R, Ejov M. Regional framework for surveillance and control of invasive mosquito vectors and re-emerging vector-borne diseases 2014-2020. Copenhagen; World Health Organization, 2013.
24. WHO. The long road to malaria elimination in Turkey. (Eliminating malaria case-study, 5), 2013.
25. URL 1. Surveillance and Control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the United States <https://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/Surveillance-and-Control-of-Aedes-aegypti-and-Aedes-albopictus-US.pdf>.
26. Weeratunga P, Rodrigo C, Fernando SD, Rajapakse S. Control methods for *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Cochrane Database of Systematic Reviews 2017; 8: CD012759.
27. Daep CA, Muñoz-Jordán JL, Eugenin EA. Flaviviruses, an expanding threat in public health: focus on dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. *J Neurovirology*, 2014; 20 (6): 539-60.
28. Long KC, Ziegler SA, Thangamani S, Hausser NL, Kochel TJ, Higgs S, et al. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *American J Trop Med Hyg*, 2011; 85 (4): 750-7.
29. Romero JR, Newland JG. Viral meningitis and encephalitis: traditional and emerging viral agents. *Sem in Ped Infec Dis*, 2003; 14 (2): 72-82.
30. Radda, A. Antibodies against group A and B Arboviruses in domestic animals from Turkey. *EU Tıp Fak Mec*, 1971; 10: 227-30.
31. Ari A. Studies on activity and ecology of arboviruses in Turkey. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 1972; 32: 134-43.
32. Ergunay K, Ozer N, Us D, Ozkul A, et al. Seroprevalence of West Nile virus and Tick-Borne Encephalitis virus in Southeastern Turkey: first evidence for Tick-Borne Encephalitis virus infections. *Vector Borne Zoon Dis*, 2007; 7: 157-161.
33. Ergunay K, Saygan MB, Aydogan S, Menemenlioglu D, et al. West Nile virus seroprevalence in blood donors from Central Anatolia, Turkey. *Vector Borne Zoon Dis*, 2010a; 10: 771-5.
34. Kalaycioglu H, Korukluoglu G, Ozkul A, Oncul O, Tosun S, Karabay O, et al. Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro Surveill*, 2012; 17 (21): 20182.
35. Serter, D. Present status of arbovirus sero-epidemiology in the Aegean region of Turkey. In: Vesenjok-Hirjan, J, Porterfield, JS, Arslanagic, E, eds. *Arboviruses in the Mediterranean Countries*. Stuttgart, New York: Gustav Fisher Verlag, 1980: 155-61.
36. Ergunay K, Saygan MB, Aydogan S, Litzba N, et al. Investigation of Dengue virus and Yellow Fevers virus exposure in blood donors from Central/Northern Anatolia, Turkey. *Microbiology Bull*, 2010b; 44: 413-22.
37. Çağlayık DY, Uyar Y, Korukluoğlu G, Ertek M, Unal S. An Imported Chikungunya Fever Case from New Delhi, India to Ankara, Turkey: The First Imported Case of Turkey and Review of the Literature. *Microbiology Bull*, 2012; 46 (1): 122-8.
38. Jansen CC, Beebe NW. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next? *Microbes Infect*, 2010; 12 (4): 272-9.
39. Manni M, Gomulski LM, Aketarawong N, Tait G, Scolari F, Somboon P, et al. Molecular markers for analyses of intraspecific genetic diversity in the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors*, 2015; 8: 188.

40. Costanzo KS, Schelble S, Jerz K, Keenan M. The effect of photoperiod on life history and blood-feeding activity in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol*, 2015; 40 (1): 164-71.
41. Brady OJ, Golding N, Pigott DM, Kraemer MUG, Messina JP, Reiner RC, et al. Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. *Parasit Vectors*, 2014; 7 (338): 1-17.
42. Marcombe S, Farajollahi A, Healy SP, Clark GG, Fonseca DM. Insecticide Resistance Status of United States Populations of *Aedes albopictus* and Mechanisms Involved. *Plos ONE*, 2014; 9 (7): e101992.
43. Andrighetti MTM, Cerone F, Rigueti M, Galvani KC, Macoris MdLdG. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. *Dengue Bull*, 2008; 186-98.
44. Marcombe S, Darriet F, Agnew P, Etienne M, Yp-Tcha MM, et al. Field efficacy of new larvicide products for control of multi-resistant *Aedes aegypti* populations in Martinique (French West Indies). *American J Trop Med Hyg*, 2011; 84: 118-26.
45. Smith LB, Kasai S, Scott JG. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pest Biochem and Physiol*, 2016; 133: 1-12.
46. Akiner MM. Insecticide Resistance of the *Culex pipiens* complex species (Diptera: Culicidae) distributed in the Middle and East Blacksea Regions of Turkey. Turkish Scientific Council Project report (113Z795), 2017.
47. WHO. Global strategic framework for integrated vector management. World Health Organization, Geneva; 2004.

Effects of colchicine on cell cycle arrest and MMP-2 mRNA expression in MCF-7 breast adenocarcinoma cells

Kolşisin'in MCF-7 insan meme adenokarsinoma hücrelerinde hücre döngüsü tutulumu ve MMP-2 mRNA ifade seviyesi üzerine etkisi

Filiz BAKAR-ATEŞ¹, Nuri ÖZMEN¹, Ecem KAYA-SEZGİNER¹, Emin Emre KURT²

ABSTRACT

Objective: Colchicine is a tricyclic alkaloid drug and it's been clinically used for a long time because of its anti-inflammatory effects. While colchicine has been safely used in oral applications, it's been demonstrated that colchicine is toxic at higher concentrations. So, the mechanism of effects of low dose colchicine has been studied in cancer related researches. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is a member of matrix metalloproteinase enzyme family and it's been demonstrated that MMP-2 expression is increased in cancer and it causes a metastasis of cancer cells through degradation of extracellular matrix. Because of this important effect of MMPs, the studies related to develop MMP inhibitor compounds have great importance in cancer investigations. At present study, it's aimed to investigate the effects of colchicine on cell cycle arrest and MMP-2 mRNA expression in MCF-7 human breast cancer cells.

Methods: In the study, MCF-7 human breast adenocarcinoma cells were purchased from ATCC. Cells were treated with 0.1, 10 ve 100 µg/ml colchicine and cell viability was determined via MTT assay. The effect of colchicine on cell cycle arrest was

ÖZET

Amaç: Kolşisin, trisiklik alkaloid bir ilaç olup klinikte anti-enflamatuvar etkisinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolşisin uygun konsantrasyonlarda oral yolla kullanılmakta iken yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle, kanser araştırmalarında düşük doz kolşisinin etki mekanizmaları üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2), matriks metalloproteinaz enzim ailesinin bir üyesi olup kanserde ifade seviyesinin arttığı ve ekstrasellüler matriksi yıkıma uğratarak kanser hücrelerinin metastazına neden olduğu bildirilmiştir. MMP'lerin bu önemli etkisi nedeni ile kanser hastalığında metastazın önlenmesi amacıyla çeşitli bileşiklerin MMP üzerine inhibitör etkisinin değerlendirilmesi kanser araştırmalarında önemli yer tutmaktadır. Bu çalışmada, kolşisinin, MCF-7 insan meme adenokarsinoma hücresinde hücre döngüsü tutulumu ve metastazda önemli rol oynadığı bilinen MMP-2 protein ifadesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada, MCF-7 insan meme adenokarsinoma hücreleri kullanılmıştır (ATCC, HTB-22). Hücrelere 0.1, 10 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda kolşisin uygulanmış ve hücre canlılığı analizi MTT testi ile

¹Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Ankara
²Yıldırım Beyazıt University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetic, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Filiz BAKAR-ATEŞ

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Döğol cad. Ankara - Türkiye
Tel : +90 530 827 41 28 E-posta / E-mail : fbakar@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 13.03.2018
Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.22755

Bakar-Ateş F, Özmen N, Kaya-Sezginer E, Kurt EE. Effects of colchicine on cell cycle arrest and MMP-2 mRNA expression in MCF-7 breast adenocarcinoma cells. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(3): 239-244

determined by Muse Cell Analyzer and the percent of cell populations at G0/G1, S and G2/M cycles were identified. The effect of colchicine on MMP-2 mRNA expression has been performed by real-time PCR (qRT-PCR) analysis.

Results: Colchicine has significantly inhibited cell viability at 10 and 100 µg/ml concentrations. It's been also demonstrated that colchicine has induced a cell cycle arrest at G2/M phase and downregulated MMP-2 mRNA expression of MCF-7 cells in all treated concentration ($p < 0.0001$).

Conclusion: The results of this study illustrated that colchicine may be a candidate anticancer compound for breast cancer studies and further studies are required to identify the underlying mechanism of effects.

Key Words: colchicine, cell cycle, MMP-2 expression, anticancer, MCF-7

yapılmıştır. Kolşisin'in hücre döngüsü tutulumu üzerine etkisi analiz edilmiş ve G0/G1, S ve G2/M döngüsündeki hücre popülasyonları yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Kolşisin'in MMP-2 mRNA ifade seviyesi üzerine etkisi ise gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi ile tayin edilmiştir.

Bulgular: 10 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda Kolşisin MCF-7 meme kanser hücresinin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe etmiştir. Kolşisin'in tüm konsantrasyonlarda hücre döngüsünü G2/M fazında inhibe ettiği ve MMP-2 geninin ifade seviyesini anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır ($p < 0.0001$).

Sonuç: Çalışmadan elde edilen sonuçlar ile kolşisin'in kanser çalışmaları için aday bir anti-kanser bileşik olabileceği gösterilmiş olup mekanizmanın aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: kolşisin, hücre döngüsü, MMP-2 ekspresyonu, antikanser, MCF-7

INTRODUCTION

Colchicine is a lipophilic, plant derived alkaloid drug which is produced from *Colchicum autumnale* (1). Although the first approving by the US Food and Drug Administration was in 2009, colchicine is used more than 2000 years for Gout disease treatment (2,3). Colchicine has anti-inflammatory activity and therefore is used for diseases like Gout, FMF and other rheumatic diseases like Behcet's disease, idiopathic recurrent acute pericarditis etc. (4,5). Colchicine's most studied mechanism of action is microtubule disruption (5,6). Colchicine blocks the assembly and polymerization of microtubules and this ability of compound effects further lots of cellular processes such as maintenance of cellular shape, migration of the cell, vesicular actions inside the cell, secretion of cytokines, chemokines and

ion channels (5). Recent studies indicated some other effects of colchicine, like inhibition of fibrosis and cardiovascular protective effects (5). Beside, recently published studies discuss that colchicine derivatives could be used as potent anti-tumoral molecules and there are many attempts to develop colchicine hybrids and bioactive drugs as a anti-cancer agents (3,7). A research group has investigated the anticancer effects of colchicine on hepatocellular carcinoma (HCC), cholangiocarcinoma and gastric cancer cells in different studies and has indicated that colchicine has achieved potential anticancer effects at acceptable concentrations and could be used as a palliative treatment in these cancer types (8-16).

MATERIAL and METHOD

Cell Culture and Treatment

Human breast cancer cell line MCF-7 (HTB22) was purchased from American Type Culture Collection. Cells were grown as monolayer cultured in DMEM (ATCC, 30-2002) media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza), 1% penicillin/streptomycin (PAA, The Cell Culture Company) and 1% L-glutamine (PAA, Austria) and incubated in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37 °C. Colchicine was dissolved in % 0.1 DMSO and cells were treated with 0.1, 10 and 100 µg/ml colchicine for 24 hours as described by Sun et al. (17).

Cell viability

The effects of colchicine on cell growth of MCF-7 cells were determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, a 180 µl of 5x10⁴ cells/ml were treated with 0.1, 10 and 100 µg/ml of colchicine for 24 h and the cells treated with DMSO were used as control. The cells were washed with PBS, 20 µl MTT solution was added to the wells and incubated at 37 °C for 4 h. Following incubation, the absorbance at 540 nm was recorded with microplate reader (Thermo, Germany). Data were obtained from four repeats per condition and represented mean±standard deviation (SD) of three independent experiments.

Cell Cycle Assay

Effects of colchicine on cell cycle analysis was performed using Muse Cell Cycle Assay Kit (Merck Millipore, Germany). The cells were treated with 0.1, 10 and 100 µg/ml of colchicine for 24 h and harvested by trypsinization. The cells were then fixed and prepared for analysis according to the manufacturer's instructions. The cell population at different stages of the cell cycle was measured by Muse Cell Analyzer (Millipore).

RT-PCR Analysis

MCF-7 cells were treated with 0.1, 10 and 100 µg/

ml of colchicine and total cellular RNA was extracted using RNEasy plus mini kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized from isolated total RNA using RT2 First Strand Kit (Qiagen, Germany), according to the manual's instructions. Briefly, 8 µl of RNA (adjusted to 100 ng) and 6 µl of genomic elimination buffer were mixed and incubated at 42 °C for 5 min and then place immediately on ice for at least 1 min. A 6 µl of reverse transcriptase was added to each tube and mixed gently by pipetting up and down. The tubes were incubated at 42 °C for exactly 15 min. Then the reaction was immediately stopped by incubating at 95 °C for 5 min. 90 µl RNase-free water was added to each reaction and mixed by pipetting up and down several times. The reactions were placed on ice and proceeded with the real-time PCR protocol. For real-time PCR analysis, reactions were performed in triplicate using Rotor Gene System (Qiagen, Germany). The primers used to amplify specific gene products were as follows: MMP-2 sense 5'-CATGTCGCCCCCTAAAACAGA-3'; MMP-2-antisense, 5'-CCATCAAACGGGTATCCATC-3'; GAPDH-sense, 5'-CCCATCACCATCTTCCAG-3'; GAPDH-antisense, 5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAG T-3'.

The PCR conditions were given below.

Cycles	Duration	Temperature
1	10 min	95 °C
45	15 s	95 °C
	1 min	60 °C

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 version (GraphPad Software Inc.). Data obtained from the cell culture experiments were expressed as mean ±SD and One-way ANOVA test was applied for multiple comparisons. The data from PCR studies were analyzed using the comparative ΔΔCt method calculating the difference between the threshold cycle (Ct) values of the target and reference

gene of each sample. The results of treated groups were compared to the results of non-treated control group.

RESULTS

The effect of colchicine on cell viability was determined by MTT test and the results were shown in Figure 1. Colchicine has significantly induced cell death at 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ in MCF-7 cells when compared to control ($p=0.0012$ and $p<0.0001$, respectively). The viable cell amount was 77.48 ± 1.91 at 10 $\mu\text{g/ml}$ concentration, and 53.85 ± 4.69 at 100 $\mu\text{g/ml}$.

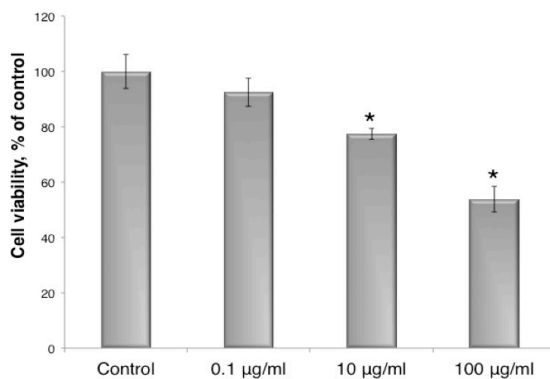


Figure 1. Effects of different concentrations of colchicine on MCF-7 human breast adenocarcinoma cell viability. The viable cell amount was determined by MTT assay. The cells were treated with 0.1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ colchicine for 24 h. The results are expressed as percentage of live cells compared with untreated control. The data present the mean \pm SD of three independent experiments. The differences are * from control, ($p<0.05$).

In order to evaluate the possibility that colchicine may involve an arrest of cells at a specific cell cycle check point, we performed cell cycle analysis assay. The results indicated that colchicine induced a significant arrest of cell cycle at G2/M phase of the cell cycle at all treated concentrations (Figure 2). The percent amount of cell population at G2/M phase in control group was $62.98\pm 0.98\%$, whereas the increased amounts were recorded as $63.70\pm 2.50\%$, $73.20\pm 2.10\%$ and $80.00\pm 2.20\%$ for 0.1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ colchicine-treated groups, respectively

($p<0.0001$). The increase of cell population amount at G2/M phase was accompanied with the decrease at G0/G1 and S population.

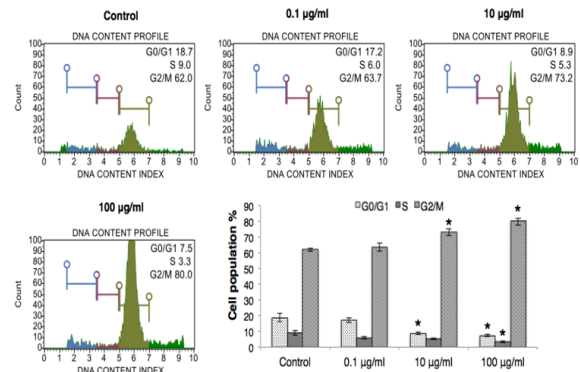


Figure 2. Colchicine induced a cell cycle arrest at G2/M phase in MCF-7 cells. Data belongs to the results of 0.1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ colchicine treatments and non-treated group is accepted as control and data are representative of one experiment. The peak panels show cell population at check points of cell cycle. Bar graphs belong to quantified values of Muse Cell Analyser data. The graph shows the mean \pm SD of the three independent cell cycle experiments. The differences are given as compared to control, * $p<0.0001$.

The real-time PCR experiments have shown that MMP-2 mRNA expression has significantly decreased in colchicine-treated cells in a dose dependent manner (Figure 3) ($p<0.0001$).

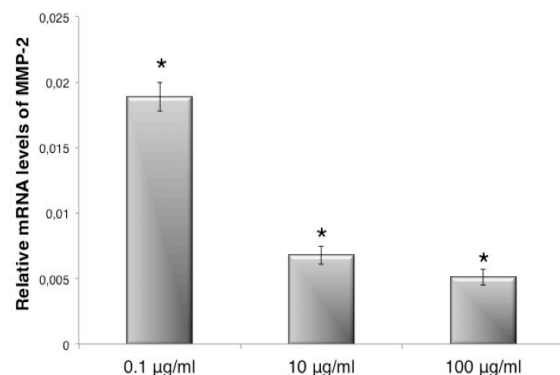


Figure 3. Colchicine inhibited MMP-2 mRNA expression in a dose dependent manner. Mean \pm s.d. are shown ($n=3$). * $p<0.0001$.

DISCUSSION

Colchicine is an alkaloid drug compound and it's widely used in clinical applications. The studies have shown that colchicine prevents growth of cancer cells by antimetabolic activity through interacting with microtubules, and contributes to the establishment of improved cancer therapies (11,12). Colchicine causes antiproliferative effects through the inhibition of microtubule formation, which leads to mitotic arrest and cell death by apoptosis (13). Previous studies also reported that colchicine and its potent derivatives showed a favorable therapeutic effect on hypopharyngeal, pancreatic, gastric, colon and hepatocellular carcinoma (10, 13-17).

At present study we evaluated antiproliferative and antimetastatic effects of colchicine in MCF-7 breast adenocarcinoma cells. We found that colchicine has significantly inhibited cell growth at 10 µg/ml and higher concentrations. The researchers have shown that colchicine induced a dose-dependent reduction in cell viability and early apoptosis in HT-29 colon cancer cells treated with 20 µg/ml colchicine (16). The anti-proliferative effect of colchicine at 2 and 6 ng/mL was observed on hepatocellular carcinoma and cancer-associated fibroblast cell lines (8). A study by Sun et al. showed that colchicine can inhibit proliferation of MCF-7 breast cancer cells and induce cell apoptosis, strongly at 40 µg/ml concentration for 72 h (17). In a similar manner, treatment with microtubule depolymerizing colchicine analogue arrested cell cycle at the G2/M transition in HCT-116 colon cells (16). Conversely, colchicine at 2.5 nM which is defined as clinically acceptable concentration caused no G2/M arrest in A549 lung cancer cells (18).

The susceptibility to colchicine can show differences among different cell lines (8,9,10). For instance, the antiproliferative effects of colchicine on gastric cancer cells were observed only at

concentration of 6 ng/mL (10), whereas colchicine at 2 ng/mL showed significant antiproliferative effects on hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma cells (8,11).

Moreover, colchicine-treated nude mice showed lower increased tumor volume ratios and tumor growth rates than the control mice (9,10). In clinical studies, colchicine administration prevented and delayed the development of hepatocellular carcinoma and decreased risk of incident all-cause cancers in male Taiwanese patients with gout (19,20).

During the carcinogenesis process, tumor cells interact with tumor microenvironment such as extracellular matrix (ECM), growth factors, ECM-related cytokines, endothelial cells, fibroblasts, macrophages, adipocytes, etc. (21,22). The studies have revealed that the enzymes which degrade ECM are essential for tumor progression. Tumor cells are well organized to produce enzymes which have ability to degrade matrix barrier of tumor tissue, and so, they enable the metastasis of cancer to further tissues. For the last decades, MMPs have been accepted as potential enzymes for such tumoral activities since they can degrade all of the structural components of ECM. In addition, these enzymes have been up-regulated in nearly all human and animal tumors as well as tumor cell lines (23). Since there is limited data about the effects of colchicine on types of cancer and its mechanisms of effects, our study is the first to evaluate the effects of colchicine on MMP-2 mRNA expression in MCF-7 cells. According to our data, the downregulation of MMP-2 expression, has demonstrated that colchicine may be important features on preventing metastasis of cancer cells.

In conclusion, the results of our study indicate that colchicine can be identified as a potential anti-cancer compound for MCF-7 breast cancer cell line.

REFERENCES

1. Angelidis C, Kotsialou Z, Kossyvakis C, Vrettou AR, Zacharoulis A, Kolokathis F, et al. Colchicine Pharmacokinetics and Mechanism of Action. *Curr Pharm Des*, 2018; doi: 10.2174/1381612824666180123110042.
2. Slobodnick A, Shah B, Pillinger MH, Krasnokutsky S. Colchicine: Old and New. *Am J Med*, 2015; 128(5): 461-70.
3. Ghawanmeh AA, Chong KF, Sarkar SM, Bakar MA, Othaman R, Khalid RM. Colchicine prodrugs and codrugs: Chemistry and bioactivities. *Eur J Med Chem*, 2018; 144: 229-42.
4. Liantinioti G, Argyris AA, Protogerou AD, Vlachoyiannopoulos P. The role of colchicine in the treatment of autoinflammatory diseases. *Curr Pharm Des*, 2018; doi: 10.2174/1381612824666180116095658.
5. Leung YY, Yao Hui LL, Kraus VB. Colchicine-Update on mechanisms of action and therapeutic uses. *Semin Arthritis Rheum*, 2015; 45(3): 341-50.
6. Marinaki S, Skalioti C, Boletis JN. Colchicine in renal diseases: present and future. *Curr Pharm Des*, 2018; doi: 10.2174/1381612824666180123101313.
7. Dubey KK, Kumar P, Labrou NE, Shukla P. Biotherapeutic potential and mechanisms of action of colchicine. *Crit Rev Biotechnol*, 2017; 37(8): 1038-47.
8. Lin ZY, Wu CC, Chuang YH, Chuang WL. Anti-cancer mechanisms of clinically acceptable colchicine concentrations on hepatocellular carcinoma. *Life Sci*, 2013; 93: 323-28.
9. Wu CC, Lin ZY, Kuoc CH, Chuang WL. Clinically acceptable colchicine concentrations have potential for the palliative treatment of human cholangiocarcinoma. *Kaohsiung J Med Sci*, 2015; 31: 229-34.
10. Lin ZY, Kuo CH, Wu DC, Chuang WL. Anticancer effects of clinically acceptable colchicine concentrations on human gastric cancer cell lines. *Kaohsiung J Med Sci*, 2016; 32: 68-73.
11. Risinger AL, Giles FJ, Mooberry SL. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat Rev*, 2009; 35(3): 255-61.
12. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, 2004.; 4(4): 253-65.
13. Kumar A, Singh B, Mahajan G, Sharma PR, Bharate SB, Mintoo MJ, et al. A novel colchicine-based microtubule inhibitor exhibits potent antitumor activity by inducing mitochondrial mediated apoptosis in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Tumour Biol*, 2016; 37(10): 13121-136.
14. Cho JH, Joo YH, Shin EY, Park EJ, Kim MS. Anticancer Effects of Colchicine on Hypopharyngeal Cancer. *Anticancer Res*, 2017; 37(11): 6269-280.
15. Kumar A, Singh B, Sharma PR, Bharate SB, Saxena AK, Mondhe DM. A novel microtubule depolymerizing colchicine analogue triggers apoptosis and autophagy in HCT-116 colon cancer cells. *Cell Biochem Funct*, 2016; 34(2): 69-81.
16. Huang Z, Xu Y, Peng W. Colchicine induces apoptosis in HT29 human colon cancer cells via the AKT and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways. *Mol Med Rep*, 2015; 12(4): 5939-944.
17. Sun Y, Lin X, Chang H. Proliferation inhibition and apoptosis of breast cancer MCF-7 cells under the influence of colchicine. *J BUON*, 2016; 21(3): 570-75.
18. Bhattacharya S, Das A, Datta S, Ganguli A, Chakrabarti G. Colchicine induces autophagy and senescence in lung cancer cells at clinically admissible concentration: potential use of colchicine in combination with autophagy inhibitor in cancer therapy. *Tumour Biol*, 2016; 37(8): 10653-664.
19. Arrieta O, Rodriguez-Diaz JL, Rosas-Camargo V, Morales-Espinosa D, Ponce de Leon S, Kershenovich D, et al. Colchicine delays the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis virus-related liver cirrhosis. *Cancer*, 2006; 107(8): 1852-858.
20. Kuo MC, Chang SJ, Hsieh MC. Colchicine Significantly Reduces Incident Cancer in Gout Male Patients: A 12-Year Cohort Study. *Medicine (Baltimore)*, 2015; 94(50): e1570
21. Murphy, G. 2008. "The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment", *Nat Rev Cancer*, 8, 932-941
22. Deryugina, I.E., Quigley, P.J. 2006. "Matrix metalloproteinases and tumor metastasis", *Cancer Metastasis Rev*, 25, 9-34
23. Coussens, L.M., Fingleton, B., Matrisian, L.M. 2002. "Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer: Trials and Tribulations", *Science*, 295, 2387-2392

Bruselloz ve atipik pnömoni şüpheli hastalarda *Coxiella burnetii* antikor varlığının ELISA ve IFA yöntemleri ile araştırılması

Detection of *Coxiella burnetii* antibodies in patients with suspicion of brucellosis and atypical pneumonia by ELISA and IFA methods

Alev ÇETİN-DURAN¹, Cem ERGON²

ÖZET

Amaç: Query (Q) ateşi, *Coxiella burnetii*'nin neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. Bulaş yolları ve klinik bulguları açısından Bruselloz ile oldukça benzerlik göstermektedir. Ayrıca, *C. burnetii* önemli bir atipik pnömoni etkenidir. Bu çalışmada, atipik pnömoni ve bruselloz şüpheli klinik bulguları olan hastalarda *C. burnetii* antikorlarının ELISA ve IFA yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Rose Bengal testi ile *Brucella* spp. yönünden, ELISA ve IFA yöntemleri ile *C. burnetii* dışındaki diğer önemli atipik pnömoni etkenleri olan *Mycoplasma pneumoniae* ve *Chlamydia pneumoniae* yönünden negatif saptanan hasta serumları alındı. Dosyaları incelenen ve Q ateşi açısından klinik ve laboratuvar bulguları olan hastalara ait serum örneklerinde *C. burnetii* faz I ve faz II antikorları ELISA ve IFA yöntemleri ile araştırıldı. Q ateşinin en sık rastlanan klinik belirtileri olan ateş, baş ağrısı, myalji, artralji, grip benzeri hastalık bulguları, öksürük, göğüs ağrısı, solunum sıkıntısı gibi belirtileri ve eritrosit sedimantasyon hızında (ESR) ve transaminazlarda (AST, ALT) yükseklik olan 84 hasta serumu çalışmaya dâhil edildi. Çalışma grubu 46

ABSTRACT

Objective: Query (Q) fever is a zoonotic disease caused by *Coxiella burnetii*. The transmission routes and clinical manifestations of *C. burnetii* are similar with brucellosis. *C. burnetii* is important agent of atypical pneumonia. In this study, *C. burnetii* antibodies were investigated by ELISA and IFA methods in patients whose clinical findings suspected with atypical pneumonia and brucellosis.

Methods: In this study, the sera of patients were chosen who were determined to be negative for *Brucella* spp. by Rose Bengal test and for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* infections by ELISA and IFA in Microbiology Laboratory of Dokuz Eylül University Hospital. *C. burnetii* phase I and phase II antibodies were investigated by ELISA and IFA methods in serum samples of patients whose clinical and laboratory data were compatible with Q fever. Eighty four patients were included in the study who had symptoms and findings such as fever, headache, myalgia, arthralgia, flu-like syndrome symptoms, cough, chest pain, respiratory distress, elevation of ESR, ALT, AST. The study group consisted of 46 (54.8%) women (median / min-max = 38.0 / 3-67 years) and 38

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Temel İmmünoloji Bilim Dalı, Adana
²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, İzmir



İletişim / Corresponding Author : Alev ÇETİN-DURAN

Çukurova Üni. Tıp Fak. Tıbbi Mik. Abd. Temel İmmünoloji Bilim Dalı Sarıçam Adana - Türkiye
Tel : +90 505 477 66 24 E-posta / E-mail : alevctndrn@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 23.09.2016
Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.23255

Çetin-Duran A, Ergon C. Bruselloz ve atipik pnömoni şüpheli hastalarda *Coxiella burnetii* antikor varlığının ELISA ve IFA yöntemleri ile araştırılması.
Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(3): 245-252

(%54.8) kadın (ortanca/min-max=38.0/3-67 yaş) ve 38 (%45.2) erkek hastadan (ortanca/min-max=35.0/1-65 yaş) oluşmaktadır.

Bulgular: *C. burnetii*'ye karşı %13.1 oranında seropozitiflik saptanmış olup bu pozitiflikler %9.5 oranında geçirilmiş enfeksiyon, %1.2 oranında akut Q ateşi ve %2.4 oranında *C. burnetii* IgM antikor pozitifliği şeklindeydi. *C. burnetii* IgG antikor çocuk hastalarda saptanmazken erişkinlerde %16.1 oranında ve en fazla 41-60 yaş arasındaki hastalarda (%19.2) saptanmıştır.

Sonuç: Ateşli olgularda, influenza benzeri hastalıklarda, atipik pnömonide ve bruselloz şüpheli klinik bulguları olanlarda, Q ateşinin ayırıcı tanıda akılda tutulması gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Q ateşi, bruselloz, atipik pnömoni, ELISA, IFA

(45.2%) male patients (median / min-max = 35.0 / 1-65 years).

Results: Seropositivity of *C. burnetii* was detected in 13.1% of the study group, and 9.5% of them was past infection, 1.2% was acute Q fever and 2.4% was *C. burnetii* IgM antibody positivity. While *C. burnetii* IgG antibodies were not observed in paediatric patients, positivity rate was 16.1% in adult patients and IgG positivity was highest between 41-60 years of age (19.2%).

Conclusion: Q fever should be taken into consideration in the differential diagnosis of a febrile diseases, influenza-like illness, atypical pneumoniae, patients with symptoms suggestive of brucellosis.

Key Words: Q fever, brucellosis, atypical pneumonia, ELISA, IFA

GİRİŞ

Query (Q) ateşi, *Coxiella burnetii*'nin neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. *C. burnetii*, insanlara en sık koyun, keçi, sığır gibi hayvanlardan bulaşmaktadır. Bulaşta en önemli yol, enfekte hayvanların idrar, dışkı, süt, doğum artıkları ile etrafa yayılan mikroorganizmanın inhalasyonla alınmasıdır. Pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin oral alımı ile de bulaş mümkündür (1).

Bakteri ile temas eden kişilerin yaklaşık %60'ı hastalığı asemptomatik olarak geçirmektedir. Akut Q ateşi, grip benzeri tablodan yoğun bakım gerektirecek ciddi pnömoni ve hepatite kadar değişen klinik formlarda kendini gösterebilmektedir. Gebelik, immunsupresyon, kalp kapağı ve vasküler problemlerin varlığında kronik enfeksiyon gelişebilmektedir (2, 3).

Etkenin yüksek enfeksiyözitesi nedeniyle tanıda, tarama amaçlı ELISA yöntemi, doğrulama için ise IFA yöntemi tercih edilmektedir. IFA testi, Q ateşi tanısında referans yöntem kabul edilmektedir (3).

C. burnetii iki farklı faz formu göstermektedir.

Hastalığın başlangıcından itibaren 14 gün içinde faz II IgM antikorları yüksek seviyelere ulaşır ve 10-12 hafta varlığını sürdürür. Faz I IgM antikorları ise daha düşük düzeyde oluşur. Faz II IgG antikorları ise hastalığın başlangıcından 2-3 hafta sonra ortaya çıkar ve yıllarca pozitif kalabilir. Oysa Faz I IgG antikorları daha düşük düzeyde ortaya çıkar ve konvelesan döneme geçişle birlikte hızlı bir düşüş gösterir. Kronik Q ateşinde, faz I antijenine karşı daha yüksek düzeyde olmak üzere, her iki faz antijenine de antikor yanıtı gelişmektedir (1,3).

Ülkemizde Q ateşinin varlığı uzun yıllardır bilinmesine rağmen, özgül olmayan semptomlarla kendini göstermesi ve laboratuvar testlerinin kısıtlı sayıdaki merkezlerde yapılıyor olması nedeniyle tanısı sıklıkla atlanmaktadır. Hem bulaş yolları hem de klinik bulguları açısından *Bruselloz* ile oldukça benzerlik göstermektedir. Ayrıca *C. burnetii* önemli bir atipik pnömoni etkenidir (2). İnfluenza benzeri hastalıklarda, atipik pnömonide, nedeni bilinmeyen ateş olgularında, brusellozu düşündüren semptomları olan hastalarda,

hepatitte ve endokarditte; ayırıcı tanıda Q ateşinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Bu çalışmada, *Brucella* spp. ve *C. burnetii* dışındaki diğer önemli atipik pnömoni etkenleri yönünden negatif saptanan ve Q ateşi açısından klinik ve laboratuvar bulguları olan hastalara ait serum örneklerinde, *C. burnetii*'ye ait antikorların araştırılması hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Grubu

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na *Brucella* spp., *Mycoplasma pneumoniae* ve *Chlamydia pneumoniae* enfeksiyonlarının araştırılması amacıyla gönderilen ve bu etkenlere yönelik test sonuçları negatif saptanan hastaların dosyaları incelendi. Bu incelemede, Q ateşinin en sık rastlanan klinik belirtileri olan ateş, baş ağrısı, myalji, artralji, grip benzeri hastalık bulguları, öksürük, göğüs ağrısı, solunum sıkıntısı gibi belirtileri gösteren ve eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), transaminazlarda yüksekliği (AST, ALT) olan hastalar saptandı. Q ateşi ile uyumlu klinik ve laboratuvar bulguları olan hastalar çalışmaya dahil edildi ve serum örnekleri ELISA ve IFA testleri çalışılana kadar -20 °C' de saklandı.

Örnekler *Brucella* spp. açısından, tarama testi olan Rose Bengal testi ile araştırılmıştır. *C. pneumoniae* IgM ve IgG antikorları indirekt immüno Floresan antikor (IFA; Vircell, İspanya) yöntemiyle; *M. pneumoniae* IgM ve IgG antikorları ise ELISA (Euroimmun, Almanya) yöntemiyle test prosedürlerine uygun olarak araştırılmıştır.

Ocak-Ağustos 2013 tarihleri arasında, belirtilen kriterlere uygun 1-67 yaşları arasında 84 hasta seçilerek, bu hastalara ait serumlarda *Coxiella burnetii*'ye yönelik antikorlar ELISA ve IFA yöntemleriyle araştırıldı.

Coxiella burnetii ELISA ve IFA Yöntemleri

C. burnetii faz II antijenlerine karşı oluşan IgM ve IgG antikorları, ELISA kitleri kullanılarak araştırıldı. ELISA ile pozitif veya kuşkulu saptanan örnekler, IFA testi ile değerlendirildi.

ELISA: *C. burnetii* faz II antijenlerine karşı oluşmuş antikorlar, *C. burnetii* ELISA IgM ve IgG (Vircell, İspanya) kitleriyle, üretici firmanın önerilerine göre araştırıldı. Bu yöntemde, antijen olarak *C. burnetii* "Nine Mile" suşu (ATCC VR 616) faz II antijeni kullanılmaktadır.

IgM ölçümlerinde yalancı pozitiflikleri önlemek için serumlar IgG sorbent ile muamele edildi. Her hasta için (serum optik yoğunluk/cut-off kontrol optik yoğunluk) x 10 formülü ile antikor indeksi hesaplandı. Sonuç antikor indeksi < 9 sonuçlar negatif, 9-11 kuşkulu, > 11 sonuçlar ise pozitif olarak kabul edildi.

IFA: ELISA ile kuşkulu veya pozitif saptanan örneklerle IFA testi uygulandı. Antijen olarak *C. burnetii* "Nine Mile" suşu (ATCC 616-VR) kullanılan "*C. burnetii* Phase I+II" kiti (Vircell, İspanya) ile, faz I ve faz II antijenlerine karşı oluşan IgM ve IgG antikorları araştırıldı. IgM ölçümünde yalancı pozitifliği önlemek için serum örnekleri IgG sorbent ile muamele edildi.

IFA IgM testi üretici firmanın önerilerine göre 1/24, 1/48, 1/96 dilüsyonlarda, IFA IgG testi 1/64, 1/128, 1/256 dilüsyonlarda çalışıldı. IgM testi için pozitif kabul etme sınırı (negatif "cut off" titresi) 1/24, IgG testi için ise 1/64 olarak kabul edildi. Literatürdeki çalışmalarla karşılaştırma yapabilme ve akut ile kronik enfeksiyon kriteri olan titrasyonları içermeleri nedeni ile IgM testi için 1/50 ve 1/100, IgG testi için 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 titrasyonları da çalışıldı (3, 4). Hazırlanan preparatlar floresan mikroskopunda iki ayrı uzman tarafından değerlendirildi.

Negatif "cut off" titresinin seçimi, antijenin saflığına, kaynağına ve incelenen popülasyonun antijen stimülasyon alt yapısına göre değişmektedir ve pek çok çalışmada farklı titrasyonlar kullanılmıştır (4).

Çalışmada, faz II IgG \geq 1:200 ve faz II IgM \geq 1:50 olması akut Q ateşi, faz I IgG \geq 1:800 olması kronik Q ateşi olarak değerlendirildi. Faz I ve faz II IgM antikorları negatifken, özellikle faz II IgG antikor pozitifliği geçirilmiş enfeksiyon olarak tanımlandı (3-7).

İstatistiksel Yöntem

Elde edilen veriler doğrultusunda SPSS 15.00 programında veri tabanı oluşturuldu ve tanımlayıcı istatistik analiz uygulandı. Verilerin analizinde ki-kare

ve “Fisher’s exact” testleri kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma Grubundaki Hastaların Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılımı

Çalışmaya alınan 84 hastanın (yaş ortalaması: 36.0 ± 21.8 yıl, yaş aralığı: 1-67 yaş) 28 (%33.3)’i çocuk (<18 yaş), 56 (%66.7)’sı ise yetişkin hastaydı (32 kadın (%38.1), 24 erkek (%28.6)). Tüm grubu cinsiyete göre ayırdığımızda, hastaların 46 (%54.8)’sı kadın (ortanca/min-max=38.0/3-67 yaş) ve 38 (%45.2)’i erkek hastadan (ortanca/min-max=35.0/1-65 yaş) oluşmakta idi.

ELISA ve IFA IgM ve IgG Test Sonuçları

C. burnetii IgM antikoru, çalışma grubunun %3.6 sında (3/84) ELISA ve IFA yöntemlerinin her ikisi ile de pozitif saptandı. IgG antikoru, ELISA yöntemi ile olguların %10.7 (9/84)’sinde pozitif, %2.4 (2/84)’ünde ise kuşku olarak bulundu. Pozitif ve kuşku olguların IFA ile değerlendirilmesinde, pozitif saptanan sonuçlar doğrulanırken, ELISA ile şüpheli olarak saptanan iki hasta (%2.4) *C. burnetii* I+II IFA IgG testi ile doğrulanmadı ve ELISA IgG pozitifliği yalancı pozitiflik olarak değerlendirildi (Tablo 1).

IFA yönteminde, üretici firmanın önerdiği dilüsyonlar ve literatürlerde yer alan dilüsyonları kullanarak aldığımız sonuçlar birbiriyle uyumlu bulundu. Serolojik testlerinin sonuçları ve yorumu Tablo 2’de özetlendi.

Pulmoner emboli tanısıyla izlenen ve antifosfolipid antikoru olan antikardiyolipin IgM ve IgG antikorumunun pozitif olarak belirlendiği bir hastada, *C. burnetii* faz II IgG (1/800), faz II IgM (1/100) ve faz I IgM (1/50) pozitif saptandı. Bu hastanın laboratuvar sonuçları

akut Q ateşi ile uyumlu bulundu (akut Q ateşi tanı kriteri, faz II IgM $\geq 1:50$ ve faz II IgG $\geq 1:200$) (3-7) (Tablo 2).

Sonuçların Cinsiyete ve Yaşa Göre Dağılımı

IFA ile elde edilen test sonuçlarının cinsiyet ve yaşa göre dağılımı Tablo 3’de verilmiş olup, *C. burnetii* IFA IgM ve IgG seropozitif ve seronegatif hastalarda cinsiyet ile ilişki açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p = 0.587$ ve $p = 0.725$).

IFA yöntemi ile belirlenen *C. burnetii* IgM sonuçları açısından, çocuk (< 18 yaş) ve erişkin (≥ 18 yaş) hastalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken ($p = 1.000$), *C. burnetii* IgG seropozitifliği ve seronegatifliği açısından, erişkin ve çocuk hastalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0.026$). *C. burnetii* IgG antikoru çocuk hastalarda saptanmazken erişkinlerde en fazla 41-60 yaş arasındaki hastalarda (%19.2) saptandı (Tablo 3).

TARTIŞMA

C. burnetii enfeksiyonunun prevalansı, coğrafi bölge, mevsim, populasyon ve kullanılan yöntem farklılıklarına göre önemli ölçüde değişiklik göstermektedir (3, 6).

1982-2010 yılları arasında Avrupa ülkelerinde Q ateşini araştırmaya yönelik yapılmış çalışmalarda, genel populasyonda seropozitiflik Hollanda’da %12.2-24.0, Almanya’da %22.0, Bulgaristan’da %38.0 olarak bildirilmiştir (8). Fransa’da 1985-2009 yılları arasında yapılan çalışmalar incelendiğinde, Q ateşinin prevalansının yıllar içinde %10.4’den %21.9’a doğru bir artış gösterdiği dikkati çekmektedir (9).

Tablo 1. Hastaların *C. burnetii* ELISA ve IFA test sonuçları

Yöntem	Pozitif (%)	Kuşku (%)	Negatif (%)	Toplam
ELISA IgM	3 (%3.6)	-	81 (%96.4)	84 (%100.0)
ELISA IgG	9 (%10.7)	2 (%2.4)	73 (%86.9)	
IFA I+II IgM	3 (%3.6)	-	81 (%96.4)	
IFA I+II IgG	9 (%10.7)	-	75 (%89.3)	

Tablo 2. *C. burnetii* ELISA ve IFA test sonuçları ve yorumu

Hasta Sayısı (n) (%)	ELISA		IFA				Yorum
	IgM	IgG	Faz I IgM	Faz II IgM	Faz I IgG	Faz II IgG	
1 1 n:2 (%2.4)	+	-	1/50	1/100	D	D	<i>C. burnetii</i> 'ye karşı IgM antikorunun varlığı
	+	-	-	1/100	D	D	
1 n:1 (%1.2)	+	+	1/50	1/100	-	1/800	Akut Q ateşi
1 2 2 1 2 n:8 (%9.5)	-	+	D	D	- - - - 1/50	1/400 1/200 1/100 1/50 1/200	Geçirilmiş enfeksiyon
2 n:2 (%2.4)	-	Şüpheli	D	D	-	-	Yalancı pozitiflik
71 n:71 (%84.5)	-	-	D	D	D	D	<i>C. burnetii</i> 'ye karşı antikor yok

D: değerlendirilmedi

Tablo 3. IFA test sonuçlarının cinsiyet ve yaş gruplarına göre dağılımı

	IFA IgM		IFA IgG		Toplam
	Pozitif n(%)	Negatif n(%)	Pozitif n(%)	Negatif n(%)	
Cinsiyet					
Kadın	1 (%2.2)	45 (%97.8)	4 (%8.7)	42 (%91.3)	46 (100.0)
Erkek	2 (%5.3)	36 (%94.7)	5 (%13.2)	33 (%86.8)	38 (100.0)
Yaş					
<18 yaş (çocuk)	1 (%3.6)	27 (%96.4)	0 (%0.0)	28 (%100.0)	28 (100.0)
≥18 yaş (erişkin)	2 (%3.6)	54 (%96.4)	9 (%16.1)	47 (%83.9)	56 (100.0)
18-40 yaş	2 (%12.5)	14 (%87.5)	2 (%12.5)	14 (%87.5)	16 (100.0)
41-60 yaş	0 (%0.0)	26 (%100.0)	5 (%19.2)	21 (%80.8)	26 (100.0)
≥61 yaş	0 (%0.0)	14 (%100.0)	2 (%14.3)	12 (%85.7)	14 (100.0)
Toplam	3 (%3.6)	81 (%96.4)	9 (%10.7)	75 (%89.3)	84 (100.0)

Türkiye’de genel popülasyonda ve Q ateşi açısından şüpheli klinik bulguları olan hastalarda, *C. burnetii*’ye yönelik ELISA ve/veya IFA yöntemleri ile yapılmış çalışmalar Tablo 4’ de özetlenmiştir.

Bu çalışmalarda, geçirilmiş enfeksiyonu gösteren IgG antikorlarına, genel popülasyonda %7.1-39.3 oranları arasında rastlanılmıştır (10-14). Bu sonuçlar, ülkemizde genel popülasyonda, *C. burnetii* seropozitifliğinin %40'lara kadar ulaşabildiğini ve mikroorganizma ile temasın azımsanmayacak düzeyde olduğunu göstermektedir. Pnömoni ön tanı ve ateşli hastalarda yapılan çalışmalarda, *C. burnetii* IgM antikoruna %2.0-9.2 oranında, *C. burnetii* IgG antikoruna ise %30.1-36.0 oranında rastlanmıştır (15-18).

Çalışmamızda, ELISA ve IFA yöntemlerinin her ikisi ile de IgM ve IgG pozitiflik oranları sırasıyla %

3.6 ve %10.7’dir. *C. burnetii*’ye karşı %13.1 oranında seropozitiflik saptanmış olup, geçirilmiş enfeksiyon %9.5 oranında, akut Q ateşi %1.2 oranında gözlenmiştir. Q ateşi ile uyumlu klinik ve laboratuvar bulguları olan ve *C. burnetii* IgM antikoruna saptanan iki hastanın (%2.4), IgM tipi antikorların oluşup, IgG tipi antikorların henüz oluşmadığı erken dönem akut Q ateşi olabileceği görüşüne varıldı. Ancak bu hastaların kesin tanısının serolojik testlerle izlem sonucunda konulabileceği düşünüldü. Akut Q ateşi tanısını, 2-4 hafta ara ile alınan serum örneğinde serokonversiyonun görülmesi veya faz II antikor titresinin dört kat artışı koydurmaktadır (3, 6).

Benzer hasta grubuyla yapılan diğer çalışmalara göre çalışmamızda elde edilen *C. burnetii* seropozitifliği daha düşük bulunmuştur (15, 18). Bu durum, bölgemizin kırsal yaşamla ilişkisinin daha zayıf olmasından kaynaklanabilir. Günal ve arkadaşlarının (18) çalışması,

Tablo 4. Türkiye’de genel popülasyonda ve şüpheli klinik bulguları olan hastalarda *C. burnetii*’ye yönelik ELISA ve/veya IFA yöntemleri ile yapılmış çalışmalar

Kaynak	Bölge-Yıl	Sayı	Çalışma Grubu	Prevelans (%)
Berberoğlu ve ark. (10)	Antalya, Samsun, Diyarbakır (2004)	339	Genel popülasyon	IFA Faz II IgG: % 7.1
Sertpolat ve ark.(11)	İzmir (2005)	303	Genel popülasyon (kan donörleri)	IFA Faz II IgG: % 39.3
Karabay ve ark.(12)	Bolu (2007)	293	Genel popülasyon	IFA Faz II IgG: % 20.8
Kılıç ve ark.(13)	Ankara (2008)	601	Genel popülasyon (kan donörleri)	IFA Faz II IgM: % 2.8 IFA Faz II IgG: % 32.3
Gözalan ve ark.(14)	Samsun (2009)	407	Genel popülasyon	IFA ile seropozitiflik %13.5 -Geçirilmiş enf: % 8.1 -Akut enf: % 4.2 -Kronik enf: % 1.2
Sayan ve ark.(15)	İzmir (2003)	53	Pnömoni ön tanı	IFA IgM: % 7.5 IFA IgG: % 30.1
Bozkurt ve ark.(16)	Van (2007)	50	Pnömoni ön tanı	IFA IgM: % 2.0
Güneş ve ark.(17)	Ankara (2007)	87	Pnömoni ön tanı	ELISA IgM: % 9.2
Günal ve ark.(18)	Tokat (2012)	53	Ateşli hastalar	-Geçirilmiş enf: % 36.0 -Akut enf: % 4.0
Sunulan Çalışma	İzmir	84	Bruselloz ve atipik pnömoni şüpheli hastalar	IFA ile seropozitiflik %13.1 -Geçirilmiş enf: % 9.5 -Akut enf: % 1.2 -IFA IgM: % 2.4

Tokat Bölgesinde yapılmış olup seropozitiflik %36.0 olarak bulunmuş ve bu oranın yüksekliği bölgenin kırsal kesimle iç içe olması ile ilişkilendirilmiştir.

Seropozitiflik oranları, incelenen grup, örnek sayısı, risk faktörlerinin varlığı, kırsal hayatla ilişki, coğrafi koşullar, hayvanlardaki prevalans, kullanılan serolojik yöntem ve tanısal titre değerleri gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak insanlardaki çalışmalarda, örnek sayısının az olması, farklı serolojik yöntemlerin kullanılması ve IFA yönteminde kullanılan tanısal titre farklılıkları nedeniyle çalışma sonuçlarını karşılaştırmak oldukça zordur (19).

Kenya'da 1067 ateşli hastada *C. burnetii* varlığının ELISA, IFA ve real-time PCR yöntemleri ile araştırıldığı çalışmada, %16.2 oranında akut Q ateşi olgusu tespit edilmiş olup, faz I ve/veya faz II IgG pozitifliğine ise %19.1 oranında rastlanmıştır (20). Bulgaristan'da atipik pnömonili hastalarda, %15.0-18.0 oranında *C. burnetii* seropozitifliği bildirilmiştir (8). Q ateşinin çoğunlukla asemptomatik veya hafif grip benzeri bulgularla seyretmesi nedeni ile hastalık sıklıkla gözden kaçmaktadır (2). Özellikle ateşli ve atipik pnömonili hastalarda, Q ateşinin düşünülmesi ve araştırılması gerekmektedir.

Çalışmamızda, IgM ve IgG tipi antikörlerin pozitiflik oranı, erkeklerde kadınlara göre daha yüksek olsa da seropozitif ve seronegatif hastalar arasında cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Benzer olarak çeşitli çalışmalarda da erkeklerde daha yüksek oranda seropozitiflik saptanmış olup bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (14, 18). Genel olarak cinsiyete bağlı bir predispozisyon olmadığı kabul edilmesine karşın, hayvancılık, çiftlik ve endüstriyel aktivitelerde erkeklerin daha fazla yer almasına bağlı olarak, erkeklerde enfeksiyon daha yüksek oranda görülebilmektedir (21).

Çalışmamızda çocuk hastalarda IgG tipi antikörlere rastlanmazken, erişkin hasta grubunda en fazla 41-60 yaş arasında (%19.2) olmak üzere %16.1 oranında pozitiflik saptanmıştır. Karabay ve ark. (12), faz II IgG pozitifliğini 18 yaş üstünde %23.8, 18 yaş altında ise %4.4 oranında saptayarak, erişkin ve çocuk hastalarda seropozitiflik açısından bu durumun istatistiksel olarak

anlamlı olduğunu vurgulamışlardır. Yapılan diğer çalışmalarda da IgG pozitifliği 40 yaş üzeri gruplarda daha yüksek oranda saptanmıştır (11, 14). Bizim bulgularımıza benzer olarak IgG pozitifliği, Cardenosa ve arkadaşlarının (22) çalışmasında, en sık 44-65 yaş, Günal ve arkadaşlarının (18) çalışmasında ise 40-59 yaş arasında saptanmıştır. Yaşla birlikte prevalans artışının, endüstriyel ve çiftlik aktivitelerinde artan temasa bağlı olduğu kabul edilmektedir (3, 6).

Klinik ve laboratuvar bulguları akut Q ateşi ile uyumlu (faz II IgM \geq 1:50 ve faz II IgG \geq 1:200) olan hasta, pulmoner emboli tanısıyla izlenmekte olup, bir antifosfolipid antikör olan antikardiyolipin IgM ve IgG antikörleri pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 2). Bu vakada da olduğu gibi, bazı enfeksiyonlar sırasında antifosfolipid antikörler pozitifleşebilmekte ve bazı hastalarda tromboemboli gerçekleşebilmektedir. *C. burnetii* enfeksiyonu sırasında, %50 oranında antifosfolipid antikörler tespit edilebilmektedir (3). *C. burnetii*'nin moleküler taklit mekanizması ile bu otoantikörlerde pozitifliğe neden olduğu ve tromboza eğilime yol açtığı literatürde yer alan makale ve olgu sunumları ile bildirilmiştir. Fakat *C. burnetii*'ye bağlı gelişen pulmoner emboli vakalarına literatürde çok az rastlanılmaktadır (23, 24). Atipik klinik bulgularla kendini gösteren Q ateşi seyrinde, antikardiyolipin antikörler başta olmak üzere, anti düz kas antikörleri, ANA, RF gibi otoantikörlerde pozitiflik sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Bu yönüyle sistemik inflamatuvar hastalıkları taklit ederek sıklıkla gözden kaçmakta ve klinisyenleri gereksiz invaziv işlemlere ve immunsupresif tedavilere yönlendirmektedir. İmmunsupresif tedaviler akut gelişen Q ateşini daha da ağırlaştırarak kronikleşmesine yol açabilmektedir. Bu nedenle, Q ateşinin atipik sistemik klinik belirti ve bulgulara neden olabileceğini akılda tutulmalıdır (25, 26).

Sonuç olarak, nedeni bilinmeyen ateş olgularında, bruselloz şüpheli klinik bulguları olanlarda, influenza benzeri hastalıklarda ve atipik pnömonide Q ateşinin ayırıcı tanıda düşünülmesi ve araştırılması gerektiği kanaatindeyiz. Hastalığın saptanma oranlarının, Q ateşi için farkındalığın artırılması ve laboratuvar testlerinin daha fazla merkez tarafından uygulanması ile artacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Angelakis E, Raoult D. Q fever (Review). *Vet Microbiol*, 2010; 140 (3-4): 297-309.
2. Raoult D, Marrie T, Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis*, 2005; 5 (4): 219-26.
3. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev*, 1999; 12 (4): 518-53.
4. Dupont HT, Thirion X, Raoult D. Q fever serology: cut-off determination for microimmunofluorescence. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1994; 1 (2): 189-96.
5. Million M, Raoult D. Recent advances in the study of Q fever epidemiology, diagnosis and management. *J Infect*, 2015; 71: 2-9.
6. Kováčová E, Kazár J. Q fever still a query and underestimated infectious disease. *Acta Virol*, 2002; 46 (4): 193-210.
7. Jager MM, Weers-Pothoff G, Hermans MH, Meekelenkamp JC, Schellekens JJ, Renders NH, et al. Evaluation of a diagnostic algorithm for acute Q fever in an outbreak setting. *Clin Vaccine Immunol*, 2011; 18 (6): 963-8.
8. Georgiev M, Afonso A, Neubauer H, Needham H, Thiery R, Rodolakis A, et al. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010 (review). *Euro Surveill*, 2013; 18 (8): 20407.
9. Frankel D, Richet H, Renvoise A, Raoult D. Q Fever in France, 1985-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 2011; 17: 350-6.
10. Berberoğlu U, Gözalan A, Kılıç S, Kurtoğlu D, Esen B. A seroprevalence study of *Coxiella burnetii* in Antalya, Diyarbakir and Samsun provinces. *Mikrobiyol Bul*, 2004; 38 (4): 385-91.
11. Sertpolat M, Karakartal G. The investigation of *Coxiella burnetii* seroprevalence by indirect immunofluorescent antibody test in the healthy blood donors living in the Izmir region. *Turk J Infect*, 2005; 19 (4): 419-23.
12. Karabay O, Koçoğlu E, Baysoy G, Konyalıoğlu S. *Coxiella burnetii* seroprevalence in the rural part of Bolu, Turkey. *Turk J Med Sci*, 2009; 39 (4): 641-5.
13. Kilic S, Yilmaz GR, Komiya T, Kurtoglu Y, Karakoc EA. Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in blood donors in Ankara, Central Anatolia, Turkey. *New Microbiol*, 2008; 31 (4): 527-534.
14. Gözalan A, Rolain JM, Ertek M, Angelakis E, Coplu N, Basbulut EA, et al. Seroprevalence of Q fever in a district located in the west Black Sea region of Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2010; 29: 465-9.
15. Sayan M, Kılınc O, Yuce A, Ucan ES, Genc S. Seropositivity against atypical pneumonia agents demonstrated in patients with community-acquired pneumonia. *Mikrobiyol Bul*, 2003; 37 (4): 247-53.
16. Bozkurt H, Çiftçi IH, Güdücüoğlu H, Özbay B, Andıç S, Berktaş M. Pnömoni Tanılı Erişkin Hastalarda Kültür ve Floresan Antikor Yöntemleriyle Etkenlerin Araştırılması. *Van Tıp Derg* 2007; 14 (2): 41-5.
17. Güneş RK, Deniz O, Gumus S, Tozkoparan E, Senses Z, Ozkan M, et al. The Seropositivity Rate of Atypical Agents in Patients with Community-Acquired Pneumonia. *TAF Prev Med Bull*, 2007; 6 (4): 279-84.
18. Gunal O, Barut S, Ayan M, Kılıç S, Duygu F. Investigation of *Coxiella burnetii* and *Brucella* seropositivities in patients presenting with acute fever. *Mikrobiyol Bul*, 2013; 47 (2): 265-72.
19. Kılıç S, Çelebi B. Türkiye’de *C. burnetii*’nin Epidemiyolojisi. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 2008; 65 (3): 21-7.
20. Njeru J, Henning K, Pletz MW. Febrile patients admitted to remote hospitals in Northeastern Kenya: seroprevalence, risk factors and a clinical prediction tool for Q-Fever. *BMC Infect Dis*, 2016; 16: 244.
21. Çelebi B, Babür C, Kılıç S, Çarhan A, Esen B, Ertek M. Investigation of of Q Fever, Listeriosis, Toxoplasmosis and Cystic Echinococcosis Seroprevalence in Risk Group. *Turk Hij ve Den Biyol Derg*, 2008; 65 (2): 67-73.
22. Cardenosa N, Sanfeliu I, Font B, Munoz T, Nogueras MM, Segura F. Short report: seroprevalence of human infection by *Coxiella burnetii* in Barcelona (northeast of Spain). *Am J Trop Med Hyg*, 2006; 75 (1): 33-5.
23. Aguilar C, Ortega JL, Caro N. Autoimmune type antiphospholipid antibodies in a patient with Q fever. *Haematologica*, 2005; 90 (3): ECR12.
24. Abdel-Wahab N, Lopez-Olivo MA, Pinto-Patarroyo GP, Suarez-Almazor ME. Systematic review of case reports of antiphospholipid syndrome following infection. *Lupus* 2016; 25 (14): 1520-31.
25. Lefebvre M, Grossi O, Agard C, Perret C, Le Pape P, Raoult D, et al. Systemic immune presentations of *Coxiella burnetii* infection (Q Fever). *Semin Arthritis Rheum*, 2010; 39 (5): 405-9.
26. Vardi M, Petersil N, Keysary A, Rzotkiewicz S, Laor A, Bitterman H. Immunological arousal during acute Q fever infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011; 30 (12): 1527-30.

2-pirazolin yapısındaki yeni bir bileşiğin sentezi, moleküler modellemesi ve monoaminoksidaz inhibitörü etkisinin araştırılması

Investigation of synthesis, molecular modelling and monoaminoxidase inhibitor activity of a new 2-pyrazoline compound

Begüm EVRANOS-AKSÖZ¹, Gülberk UÇAR², Kemal YELEKÇİ³

ÖZET

Amaç: Nöromediatörlerin yıkımından sorumlu olan monoamin oksidaz (MAO) enziminin izoformlarının (MAO-A ve -B) birçok hastalık ile yakından ilişkili olduğu; MAO inhibitörlerinin depresyon, Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Grubumuzca daha etkin, tersinir ve az yan etkili yeni bir MAO inhibitörü (SH2U bileşiği) sentezlenmiş ve bu bileşiğin insan MAO enzimini (hMAO) inhibe etme yeteneği incelenmiştir. Ayrıca bu yeni bileşiğin hMAO ile etkileşimi, moleküler modelleme çalışmaları ile detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Sentezlenen yeni bileşiğin hMAO'yu kuvvetli bir şekilde yarışmalı ve tersinir olarak inhibe ettiği bulunmuştur. Söz konusu bileşiğin Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının tedavisinde ümit verici bir ilaç etken maddesi olabileceği düşünülmektedir.

Yöntem: 3',5'-Dikloro-2'-hidroksi asetofenon ile p-tolualdehit'in metanol içinde KOH varlığında reaksiyona girmesiyle 1-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-3-p-tolil prop-2-en-1-on (3',5'-Dikloro-2'-hidroksi-4-metil şalkon) bileşiği sentez edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu bileşiğin etanol içerisinde geri çeviren soğutucu altında izonikotinik asit hidrazit ile muamele

ABSTRACT

Objective: Isoforms of monoamine oxidase (MAO-A and -B) which are responsible for the degradation of neuromediators are involved in many diseases, and MAO inhibitors are used for the treatment of some diseases such as depression, Alzheimer's and Parkinson's diseases. Thus, a novel compound, SH2U was synthesized and its ability for the inhibition of human MAO (hMAO) activity was investigated by our group. In addition, the interaction of SH2U with hMAO isoforms have been investigated in detail using molecular modelling technics. It has been found that SH2U inhibited hMAO-B potently, selectively, competitively and reversibly suggesting that the novel compound may be a promising drug agent for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases.

Methods: 1-(3,5-dichloro-2-hydroxyphenyl)-3-p-tolylprop-2-ene-1-on (3',5'-Dichloro-2'-hydroxy-4-methyl chalcone) was prepared via the reaction of p-tolualdehyde and 3',5'-Dichloro-2'-hydroxy acetophenone in methanol in the presence of KOH. Then, the obtained chalcone was treated with

¹Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Analiz ve Kontrol Laboratuvarları, Ankara

²Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

³Kadir Has Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyoinformatik ve Genetik Bölümü, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Begüm EVRANOS-AKSÖZ

Sağlık Mahallesi Prof. Dr. Nusret Fişek Cad. HSGM, C Blok - Sıhhiye 06100 Ankara - Türkiye
Tel : +90 530 285 17 73 E-posta / E-mail : begumevranos@gmail.com]

Geliş Tarihi / Received : 24.08.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.59219

Evranos-Aksöz B, Uçar G, Yelekcı K. 2-pirazolin yapısındaki yeni bir bileşiğin sentezi, moleküler modellemesi ve monoaminoksidaz inhibitörü etkisinin araştırılması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(3): 253-264

edilmesiyle [3-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-5-p-tolil-4,5-dihidropirazol-1-il] (piridin-4-il) metanon bileşiği sentez edilmiştir. Yapısı doğrulanmış bu bileşiğin hMAO enzimi ile etkileşimi, ticari tayin kiti kullanılarak fluorometrik bir yöntemle incelenmiştir. Ayrıca, söz konusu yeni bileşik ile hMAO arasındaki etkileşimler, moleküler modelleme çalışmaları ile aydınlatılmıştır.

Bulgular: Sentezlenen bileşiğin yapısı, IR, Mass, 1H-NMR ve elemental analiz yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır. Yapısı doğrulanmış bu bileşiğin etkin, seçici, tersinir, toksik olmayan bir hMAO-B inhibitörü olduğu ve inhibisyonun yarışmalı olduğu görülmüştür. Moleküler yerleştirme programı kullanılarak bileşiğin hMAO-B enziminin aktif bölgesinde hangi amino asit yan zincirleri ile ne tür girişimleri yaptığı belirlenmiştir.

Sonuç: Yeni sentezlenen SH2U bileşiği, hMAO-B enzimini kuvvetle, seçici, yarışmalı ve tersinir olarak inhibe etmiştir. Sentezlediğimiz bileşik, bilinen seçici ama tersinmez MAO-B inhibitörü olan selegilin'den daha etkin ve seçici, tersinir olarak hMAO-B enzimini inhibe etmiştir ve Parkinson ile Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılabilecek bir ilaç etken maddesi olarak ümit vadetmektedir.

Anahtar Kelimeler: Monoamin oksidaz (MAO), pirazolin, alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı

isonicotinic acid hydrazide under reflux in ethanol to give (3-(3,5-Dichloro-2-hydroxy phenyl)-5-p-tolyl-4,5-dihydropyrazol-1-yl) (pyridin-4-yl) methanone. The interaction of SH2U with hMAO isoforms was investigated fluorometrically using commercial kits. The interaction between SH2U and hMAO was also analyzed using AutoDock 4.2.6 program.

Results: The structure of compound SH2U was confirmed using IR, Mass, 1 H-NMR and elemental analysis methods. SH2U appeared as a potent, selective, reversible and nontoxic hMAO-B inhibitor. Mode of inhibition was found to be competitive. Interactions of the new compound with the active site of hMAO-B were clarified using molecular modelling studies.

Conclusion: Compound SH2U inhibited hMAO-B potently, selectively, competitively and reversibly. The synthesized compound is found to be more potent and selective than selegiline, the known irreversible MAO-B inhibitor, indicating that SH2U appears as a promising active molecule to be used in the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases.

Key Words: Monoamine oxidase (MAO), pyrazoline, alzheimer's disease, parkinson's disease

GİRİŞ

Monoamin Oksidaz (MAO), karaciğer, beyin, bağırsak mukozası ve diğer organların mitokondrilerinin dış membranında yer alan ve flavinadenozin dinükleotid içeren bir enzimdir. MAO, serotonin, dopamin, norepinefrin, tiramin, triptamin gibi biyojenik aminlerin oksidatif deaminasyonundan sorumludur (1); ancak histamin gibi diaminlere afinitesi düşüktür (2). Memelilerde MAO, MAO-A ve MAO-B olmak üzere substrat ve inhibitör özellikleri farklılık gösteren iki izoform halinde bulunmaktadır (3). Özellikle MAO-B tarafından katalizlenen oksidatif deaminasyon

reaksiyonu, hidrojen peroksit ve aldehitler gibi nörotoksik maddelerin oluşumuna neden olmaktadır ve nöron hasarına yol açmaktadır (4). Yaşlanma ile birlikte beyinde MAO-B enziminin aktivitesinin arttığı gösterilmiştir ve yüksek MAO-B düzeyinin özellikle yaşlılarda ortaya çıkan nörodejeneratif bozukluklardan sorumlu olabileceği fikrine varılmıştır. MAO-B enzim aktivitesinin artışı ile dopamin metabolizmasının artışı paralellik göstermektedir (5). Bu nedenle dopaminin terapötik sürdürülebilirliğinin yaşlılıktaki bilişsel fonksiyonların düzeltilmesinde

etkin rol oynayabileceği düşünülmektedir. Beyindeki dopaminerjik nöronlarda meydana gelen oksidatif hasarın, alzheimer ve parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli rolü olduğu bilinmekte (6, 7); MAO-B inhibitörleri bu nedenle parkinson ve alzheimer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (8, 9).

Bu çalışmada, grubumuzun daha önce yaptığı çalışmaların verilerine dayanarak kuvvetli MAO-B inhibitör etki göstermesi beklenen bir bileşik (SH2U) moleküler modelleme yöntemi kullanarak tasarlanmış; sentezlenmiş ve karakterizasyonu yapılmış; bileşiğin MAO inhibitör etkisi insan MAO (hMAO) enzimi kullanılarak araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kimyasal yöntemler

Kullanılan kimyasallar

3',5'-Dikloro-2'-hidroksi asetofenon, izonikotinik asit hidraziti, p-Tolualdehit, KOH, HCl, etanol, metanol.

Kimyasal yapı aydınlatmasında kullanılan cihazlar

Sentez çalışmaları Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. IR spektrum ölçümleri Jasco FT/IR 420 Spektrofotometresinde (Easton, USA) (4000-400 cm⁻¹) KBr (Merck) diski hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. NMR ölçümleri, internal standart TMS sıfır sinyaline göre CDCl₃ veya DMSO-d₆ içinde Varian Mercury-400 MHz FT-NMR Spektrometresinde (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) gerçekleştirilmiştir. Mass spektrumları; Waters ZQ micromass LC-MS spektrometresinde (Waters Corporation, Milford, MA, USA), elektropray iyonizasyon (ESI) yöntemi uygulanarak çekilmiştir. C, H, N tayinleri, Leco CHNS 932 analizör (Leco-932, St. Joseph, MI, USA) cihazı ile yapılmıştır. Erime noktası tayinleri Electrothermal 9100 (Eng. Ltd., Essex, UK) aletinde, kapiller yöntemle yapılmış ve sonuçlar düzeltilmeden verilmiştir. Sentez çalışmaları sırasında reaksiyonlardaki gelişmeyi izlemek ve elde edilen

maddelerin saftık derecelerini belirlemek amacıyla ince tabaka kromatografisinden yararlanılmıştır. Bu amaçla adsorban olarak (Kieselgel-60 F254, Merck) ile kaplanmış alüminyum plaklar kullanılmıştır. Uygun çözücü sistemi ile sürüklenme işlemi tamamlandıktan sonra açık havada kurutulmuş plaklardaki lekeler, UV lambası altında, 254 nm dalga boyunda incelenmiştir.

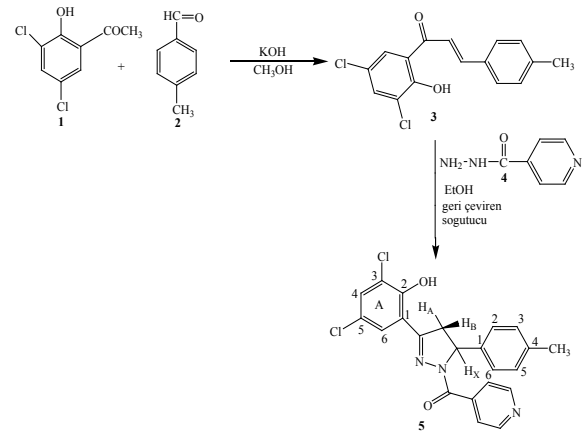
Sentez yöntemleri

Şalkon Sentezi

4.99 mmol 3',5'-Dikloro-2'-hidroksi asetofenon'un 20 ml metanoldeki çözeltisine %50 (a/h) KOH çözeltisi (5ml) damla damla buz banyosunda eklendi ve karışım oda sıcaklığında yarım saat karıştırıldı. Sonra üzerine 6.018 mmol (0.723g, 0.71ml) p-tolualdehit ilave edildi (10, 11). Bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılan reaksiyon ortamı buza döküldü, 1N HCl çözeltisi ile asitlendirildi (12), süzülerek etanolden kristallendirildi.

Pirazolin Türevi Bileşiğin Sentezi

3',5'-Dikloro-2'-hidroksi-4-metil şalkon (500 mg; 1.63 mmol), izonikotinik asit hidrazit (230 mg; 1.63 mmol) 20 ml etanol içinde 78 °C' de 32 saat ısıtıldı. Katı halde ayrılan ham ürün etanolden kristallendirildi (13). Beyaz renkli 310 mg ürün elde edildi. Verim % 44.68 E.N. 246.3 °C. Çözücü sistemi: n heksan(1): etil asetat(9). Bileşiklerin sentez basamakları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. (3-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-5-p-tolil-4,5-dihidropirazol-1-il)(piridin-4-il)metanon sentez basamakları.

Moleküler Modelleme Çalışmaları

Moleküler modelleme çalışmaları, Kadir Has Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyoinformatik ve Genetik Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

Protein sistemi

hMAO-A (PDB giriş kodu: 2BXS, inhibitör klorjilinde birlikte kristalize) ve hMAO-B (PDB giriş kodu: 1S3E inhibitör 6-hidroksi-N-proparjil-1(R)-aminoindanla birlikte kristalize) enzimlerinin kristal yapıları, Protein Data Bank'tan elde edilmiştir (www.rcsb.org). Çalışmalar, enzimlerin sadece bir alt birimi olan B zincirleri üzerinde yürütülmüştür.

Kristal yapının gerilimini düşürmek ve proteinleri Autodock doklama simülasyon programında kullanılmaya elverişli hale getirmek için tüm polar hidrojenler Accelrys Discovery Studio 4.6 modelleme paketiyle eklenmiştir. Elde edilen yapı, vakum ortamında minimize edilmiş; minimizasyon boyunca, ağır atomlar başlangıç kristal koordinatlarında sabitlenmiş; hidrojenler hareket etmelerine imkan verecek şekilde serbest bırakılmıştır. AutoDockTools (ADT) grafiksel kullanıcı ara yüzü programı, enzimleri ve inhibitörleri hazırlamak için kullanılmıştır. Gasteiger yükleri hesaplanmış ve non-polar hidrojenler karbon atomlarıyla birleştirilmiştir. Makromoleküller için, oluşturulmuş pdbqt dosyaları kaydedilmiştir.

Yeni sentezlenen bileşiğin 3 boyutlu yapısı hazırlanmış, (PM3) seviyesinde optimize edilmiş ve Spartan (Wavefunction Inc.) moleküler modelleme programının yardımıyla mol2 formatında kaydedilmiştir. Bu dosyaların kısmi yükleri sonradan ADT paket programı (versiyon 1.5.6) kullanılarak modifiye edilmiş, böylece non polar hidrojen atomlarının yükleri hidrojenin bağlı olduğu atoma atanmıştır. Sonuç dosyaları, pdbqt dosyaları halinde kaydedilmiştir.

Moleküler Modelleme

AutoDock 4.2.6 kullanılmıştır. Doklama veri girişi

dosyalarını oluşturmak için AutoDockTools programı kullanılmıştır. Tüm doklamalarda x, y, z yönlerinde 80x80x80 nokta boyutlarında karelere ayrılmış bir küp oluşturulmuş ve komplekste inhibitörün yeri bilindiği için eşlemelerde proteinin katalitik bölgesindeki flavinin (FAD) N5 atomu merkez olarak alınmıştır. 0.375 Å'luk bir uzunluk (karbon-karbon kovalent bağının yaklaşık dörtte biri uzunluğunda) ve dielektrik sabitinin mesafe bağımlı bir fonksiyonu eşlemelerin enerji hesaplanmasında kullanılmıştır. Lamarckian genetik algoritma mantığı kullanılarak 10 işlem yürütülmüştür. Başlangıç popülasyonu 50 olan rastgele yerleştirilmiş parçalar, maksimum 2.5×10^6 enerji değerleriyle ve maksimum 2.7×10^4 oluşumla kullanılmıştır. 0.02 mutasyon oranı ve 0.8 genetik değişim oranı seçilmiştir. Root mean square deviation (RMSD)'da 0.5 Å' dan daha az farklılık gösteren sonuçlar bir araya toplanmış ve bağlanmanın en uygun serbest enerjisinin sonuçları, nihai kompleks yapılar olarak seçilmiştir.

Biyokimyasal Yöntemler

Enzimatik çalışmalar Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. ELISA temelli çalışmalarda BMG LABTECH MULTIMOD Microplate Reader; spektrofotometrik tayinler için Shimadzu UV-1800 spektrofotometresi kullanılmıştır. hMAO-A ve -B rekombinant enzimleri (expressed in baculovirus infected BTI insect cells), ve diğer kimyasallar Sigma-AldrichTM, Almanya'dan satın alınmıştır. Amplex®-Red MAO Assay Kit, Molecular Probes, ABD'den sağlanmıştır.

hMAO İzoformlarının Aktivitelerinin Tayini

hMAO izoform aktivitesinin tayini substrat olarak p-tiramin (0.05-1.00 mM) kullanılarak belirlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin hMAO izoformları ile etkileşimleri, daha önce tanımlanan ve modifiye edilen fluorometrik bir yöntem ve kit kullanılarak tayin edilmiştir (14-16). SH2U bileşiğinin değişik miktarlarını, bilinen MAO-A ve -B inhibitörlerini (selejinin ve moklobemid) ve rekombinant hMAO-A

veya hMAO-B enzimlerini içeren 0.1 mL sodyum fosfat tamponu (0.05 M, pH 7.4) 15 dakika boyunca 37°C'de 1.5 ml'lik semi-mikro fluorimetre küvetlerinde karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında 200 µM Amplex Red reaktifi, 1U/ml yaban turbu peroksidazı ve MAO-A ve MAO-B türleri için substrat olan 1 mM p-tiramin eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Oluşan H₂O₂, dolayısıyla oluşmuş olan rezorufin, eksitasyon 545 nm, emisyon 590 nm de izlenmiştir. Bu sürede başlangıca göre fluoresans doğrusallığında artış gözlenmiştir.

SH2U bileşiği ile Amplex red reaktifi arasındaki olası etkileşimler yalnızca Amplex red reaktifi içeren sodyum fosfat tampon çözeltisine bileşiğin eklenmesiyle tayin edilmiştir. MAO izoformları hariç tutularak diğer tüm bileşiklerin bulunduğu MAO izoformları yerine sodyum fosfat tamponu eklenen küvetten tayin edilen arka plan aktivitesi çıkarıldıktan sonra spesifik fluoresans emisyonu elde edilen son sonuçlarla hesaplanmıştır.

Kinetik Çalışmalar

SH2U, DMSO içinde, maksimum derişimi %1 olacak şekilde hazırlanmış ve 0.01-10.00 µM derişim aralığında kullanılmıştır. İnhibisyon, Lineweaver-Burk grafiği ile gösterilmiştir. İnhibisyon sabiti (K_i) değerleri Lineweaver-burk grafik eğimlerinin inhibitör konsantrasyonuna karşı grafiklenmesi ile x eksenini kestiği noktadan belirlenmiş ve bu grafiklerin korelasyon katsayıları (R₂) en az 0.98 olarak hesaplanmıştır. Özgüllük indeksi (SI), K_i(hMAO-A)/K_i(hMAO-B) olarak hesaplanmıştır. Protein, Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir (17).

Tersinirlik Çalışmaları

SH2U ile MAO inhibisyonun tersinirliği diyaliz metodu kullanılarak tayin edilmiştir (18). 16x25 mm çapındaki diyaliz tüpleri kullanılmıştır (SIGMA, Almanya). Tüplerin, 12 000'e kadar molekül ağırlığı sınırı vardır ve 0.5-10 mL arası örnek hacmine sahiptir. Yeterli miktarda rekombinant enzim (hMAO-A veya B, 1 U/mL) ile SH2U (derişimi potasyum fosfat

tamponu, 0.05 M, pH 7.4, %1 DMSO içeren %5'lik sukroz, içerisinde hMAO-A ve-B'yi inhibe eden IC50 değerlerinin dört katına eşit olacak şekilde) 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Başka bir set ise aynı miktarda enzim ve bildirilen IC50 değerlerine uygun olarak referans inhibitörler (moklobemid, selejilin ve lazabemid) ile hazırlanmıştır. Moklobemid'in IC50 değeri hMAO-A için 4 µM olarak alınmıştır (19). Selejilin ve lazabemid'in IC50 değerleri hMAO-B inhibisyonu için sırasıyla 0.079 µM ve 0.03 µM olarak alınmıştır (20). Enzim inhibitör karışımları daha sonra, 4°C'de 80 ml diyaliz tamponu (100 mM potasyum fosfat, pH 7.4, % 5 sakaroz) içerisinde diyaliz edilmiştir. Diyaliz tamponu diyalizin 3. ve 7. saatlerinde yenilenmiştir. Diyalizin 24. saatinde, kalan MAO aktiviteleri ölçülmüştür. Bütün reaksiyonlar, üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar ortalama ±SEM olarak ifade edilmiştir.

Sitotoksosite Çalışmaları

Sentezlenen bileşiğin hücre üzerindeki olası toksik etkisi, MTT (metiltiazol difenil tetrazolyum) testi ile ölçülmüştür (21). Bu çalışmada hücre kaynağı olarak insan hepatoma HepG2 hücre hattı (Invitrogen) kullanılmıştır. İnsan hepatoma HepG2 hücre hattı, çabuk çoğalabilme, deneylere iyi uyum, nispeten ucuz ve kolay erişilebilir olması gibi nedenlerle özellikle akut ve ana bileşik sitotoksosite taramalarında tercih edilmektedir (22, 23). HepG2 hücreleri, 2 mM L-Glutamine, %10 ısıyla inaktive edilmiş fetal siğir serumu (FBS), 100 U/mL penisilin, ve 100 µg/mL streptomisin ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içinde ekilmiştir. Hücreler 37 °C de, %5 CO₂ ve %95 hava karışımında büyütülüp plakalara aktarılmıştır. SH2U bileşiği (1, 5 ve 25 µM derişimde, %0.1 DMSO içinde) 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kuyucuklara son derişim 5 mg/mL olacak şekilde MTT eklenmiştir. 4 saatlik inkübasyon sonunda oluşan formazan 100 µL DMSO ile çözülmüş ve MTT redüksiyonu 590 nm de ölçülmüştür. Kontrol olarak hücreler %1 DMSO ile muamele edilmiş; kontrolün canlılık miktarı %100 canlılık olarak kabul

edilmiştir (24). Sonuçlar, ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Gruplar arası fark, student's t testi ile analiz edilmiş; ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

Senteze İlişkin Bulgular

3',5'-Dikloro-2'-hidroksi asetofenon ile p-tolualdehitin metanol içinde KOH varlığında reaksiyona girmesiyle 1-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-3-p-tolilprop-2-en-1-on bileşiği sentez edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu bileşiğin etanol içerisinde geri çeviren soğutucu altında izonikotinic asit hidraziti ile muamele edilmesiyle (3-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-5-p-tolil-4,5-dihidropirazol-1-il)(piridin-4-il) metanon bileşiği sentez edilmiştir. Sentez edilen bu bileşiğin yapısı IR, Mass, ¹H-NMR ve elemental analiz yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır. SH2U bileşiğine ait aşağıdaki fiziksel ve spektral bulgular elde edilmiştir.

(3-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-5-p-tolil-4,5-dihidropirazol-1-il)(piridin-4-il)metanon (SH2U): Beyaz toz. - Verim: %44.68. -E.N. 246.3 °C. - IR (KBr): $\nu = 3411(\text{OH})$, 1671 (amid C=O) cm^{-1} . ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 Mhz): $\delta = 2.33$ (s, 3H, -CH₃), 2.99 (dd, 1H, HA, JAB=12 Hz, JAX= 12 Hz), 3.55 (dd, 1H, HB,

JAB=2.8 Hz, JBX= 2.8 Hz), 5.39 (dd, 1H, HX, JAX=2.8 Hz, JBX=2.4 Hz), 7.26-8.75 (10H, Aromatik-H), 11.26 (s, 1H, -OH). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 Mhz): $\delta = 21.23$, 32.05, 77.75, 122.42, 123.10, 123.39, 124.95, 125.62, 126.29, 126.96, 129.55, 131.18, 136.28, 138.47, 143.06, 150.53, 151.95. -MS (ESI): $m/z = 426$ [M+H]⁺, 428 [M+H+2]⁺, 429 [M+H+3]⁺, 430 [M+H+4]⁺. -C₂₂H₁₇Cl₂N₃O₂: C 61.84, H 4.11, N 10.00; hesaplanan C 61.98, H 4.02, N 9.86.

Moleküler Modelleme Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Öncelikle, moleküler modellemede kullanılan insan MAO-A ve B enzimleri ile bilinen MAO-A ve MAO-B inhibitörlerinin etkileşimlerine ilişkin doğrulama çalışmaları yapılmış ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Elde edilen bağlanma enerjilerinden (Tablo 1) de anlaşıldığı üzere SH2U bileşiği MAO-B enzimine MAO-A enziminden daha kuvvetli bağlanmaktadır. İki boyutlu (2D) şekillerde bileşiğin enzimin aktif kısmında hangi amino asit yan zincirleri ile hangi tür girişimleri yaptığı farklı renklerde gösterilmiştir.

MAO-A: 2-Hidroksi 3,5-diklorofenil halkası, TYR444 ve TYR407 yan zincirleri arasına girerek P-P girişimi, diğer fenil halkası da PHE208 ile P-P girişimi yapmaktadır. Piridil halkası ise CYS323, PHE362, LEU337, TYR69 ve ILE335 amino asitleri ile etkileşmektedir (Şekil 2).

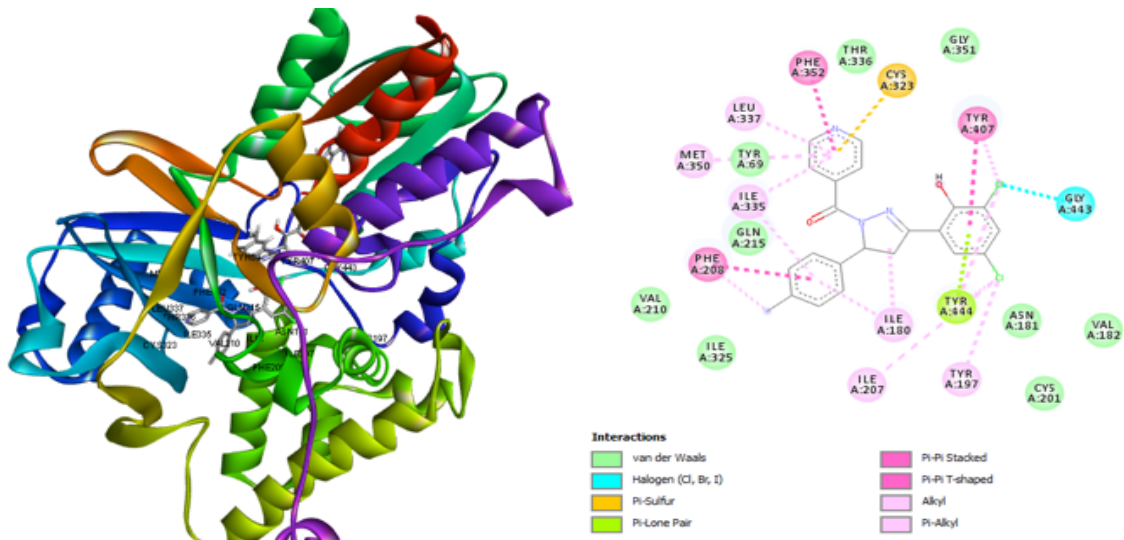
Tablo 1. SH2U bileşiğinin insan MAO-A ve MAO-B enzimleri ile etkileşimine ilişkin hesapsal bulgular

Bileşik	hMAO-A için hesaplanan DG (kcal/mol)	hMAO-A için hesaplanan K _i (μM)	hMAO-B için hesaplanan DG (kcal/mol)	hMAO-B için hesaplanan K _i (μM)	SI*	Seçicilik
SH2U (R)	-8.85	9.55	-9.88	0.057	167.54	MAO-B
SH2U (S)	-7.40	3.76	-9.96	0.051	73.73	MAO-B
Moklobemid	-8.04	1.28	-7.25	4.83	0.265	MAO-A
Safinamid	-7.60	2.68	9.42	0.124	21.61	MAO-B

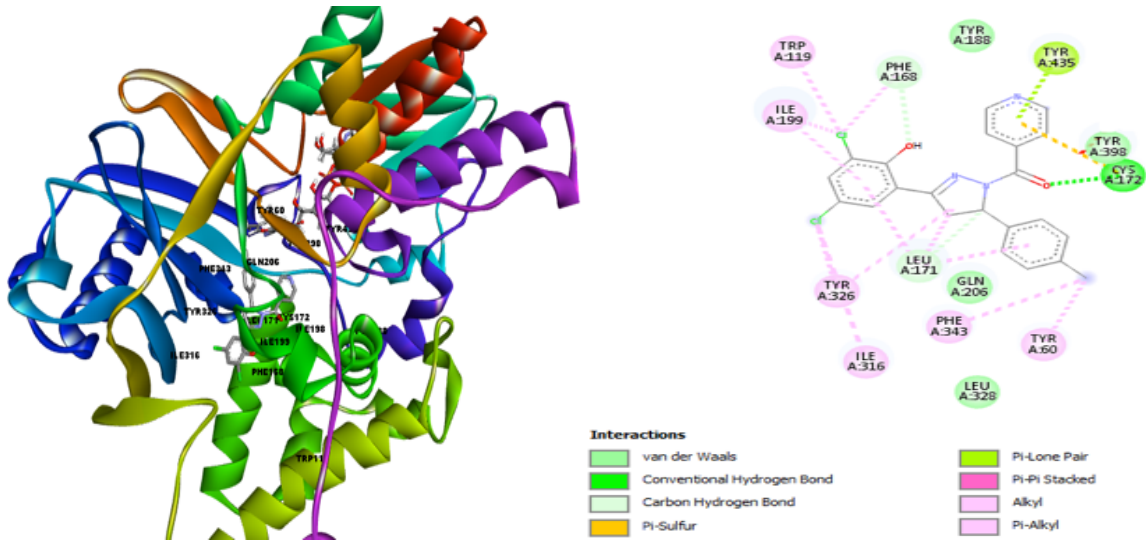
*Seçicilik indeksi (SI): K_i (MAO-A)/ K_i (MAO-B) olarak hesaplanmıştır.

MAO-B: SH2U inhibitörünün piridil halkası TYR398 ve TYR435 amino asitleri arasında sandviç etkileşmesi bazında P-P girişiminde bulunmaktadır. Karbonil grubu, CYS172 ile etkili bir hidrojen bağı yapmaktadır. 2-Hidroksi 3,5-diklorofenil halkası ise TYR326, ILE199, TRP119 ve PHE168 amino asitleri ile değişik şiddetlerde

girişimlerde bulunmaktadır. Diğer taraftan pirazolin halkası ise TYR326 ve LEU171 amino asitleri ile etkili girişimler yapmaktadır. Bütün bu bağların şiddetleri bir arada değerlendirildiğinde, SH2U inhibitörünün MAO-B enzimine MAO-A enziminden daha güçlü bir şekilde bağlandığı görülmektedir (Şekil 3).



Şekil 2. SH2U bileşiğinin 3D (solda) ve 2D (sağda) MAO-A enzimi bağlanma bölgesindeki duruşu ve yaptığı girişimler.



Şekil 3. SH2U bileşiğinin 3D (solda) ve 2D (sağda) MAO-B enzimi bağlanma bölgesindeki duruşu ve yaptığı girişimler.

Biyokimyasal Çalışmalara İlişkin Bulgular

Daha önce yapılan çalışmalar, şalkon ve türevlerinin MAO enziminin inhibitörü olduğunu göstermiştir (25, 26). Bu çalışmada, önceki çalışmalarımızın ışığında sentezlediğimiz SH2U bileşiğinin insan rekombinant MAO izoformları ile etkileşimi, moleküler modelleme ve biyokimyasal çalışmalarla incelenmiştir.

Rekombinant enzimlerin spesifik aktiviteleri hMAO-A ve hMAO-B için sırasıyla 0.175 ± 0.012 nmol/mg/dk ve 0.134 ± 0.010 nmol/mg/dk olarak bulunmuştur. Deneysel bulgular Tablo 2’de sunulmaktadır.

SH2U bileşiği, insan MAO-B enzimini kuvvetli, seçici ve yarışmalı olarak inhibe etmiştir. Bileşiğin MAO-B enzimine olan ilgisini gösteren K_i değeri bilinen tersinmez ve intihar tip MAO-B inhibitörü olan selejilin’in ve tersinir, yarışmalı inhibitör olan lazabemid’in K_i değerleriyle karşılaştırıldığında SH2U bileşiğinin etkisinin selejilin’den çok daha kuvvetli olduğu ancak lazabemid’den düşük olduğu görülmüştür (selejilin’in hMAO-B için K_i değeri 0.31 ± 0.02 μ M, lazabemid’in K_i değeri 0.005 ± 0.001 μ M, SH2U bileşiğinki ise 0.046 ± 0.001 μ M dır). SH2U

bileşiğinin hMAO-B izoformuna ilgisi, $SI=272.83$ olarak bulunmuştur. SH2U bileşiğinin MAO-B izoformuna ilgisi selejilin’den çok daha fazladır (Tablo 2).

SH2U bileşiğinin hMAO-B enzimi ile etkileşiminin kinetiği Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak inhibitör yokluğunda ve değişik derişimlerdeki inhibitör varlığında incelenmiştir. Grafikte doğruların y ekseninde kesiştiği; maksimum hızın değişmediği ancak K_m değerinin değiştiği görülerek inhibisyonun yarışmalı olduğu fikrine varılmıştır. İkincil grafikte SH2U’nun derişimlerine karşı doğruların eğimi tekrar grafiklenerek K_i değeri hesaplanmıştır. K_i değeri grafikte görüldüğü gibi 46.00 nM olarak bulunmuştur (Şekil 4).

hMAO enziminin SH2U bileşiği ile inhibisyonunun tersinirliği dializ yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla hMAO-A ve B izoformları, SH2U ile (IC_{50} değerinin 4 katı derişimde hazırlanmıştır) inkübe edilmiş, daha sonra 24 saat diyalize tabi tutulmuştur. Diyaliz sonrasında inhibisyonun geri dönüşümü, kalan aktivitenin ölçülmesi ile bulunmuştur. SH2U bileşiğinin MAO enzimini inhibe edici aktivitesinin tersinir olduğu görülmüştür (Tablo 3). SH2U bileşiğinin bu özelliğinin,

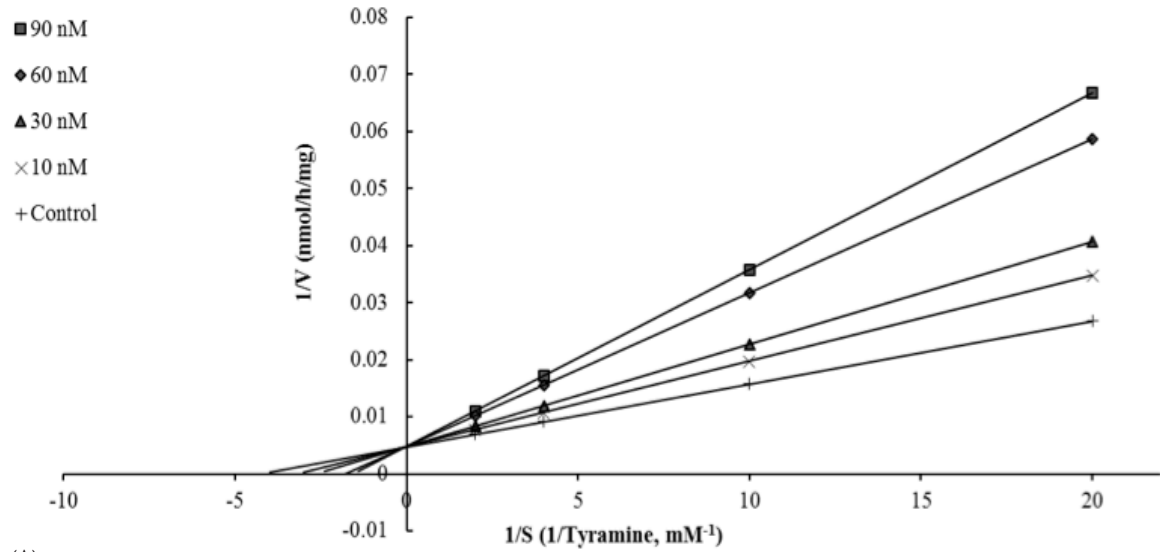
Tablo 2. SH2U bileşiğinin insan MAO-A ve MAO-B enzimleri ile etkileşimine ilişkin deneysel bulgular*

Bileşik	K_i (MAO-A) [μ M]**	K_i (MAO-B) [μ M]**	SI***	İnhibisyon Tipi	Tersinirlik	Seçicilik
SH2U	12.55 ± 1.06	0.046 ± 0.001	272.83	Yarışmalı	Tersinir	MAO-B
Selejilin	17.50 ± 1.49	0.31 ± 0.02	56.45	İntihar tipi inhibitör	Tersinmez	MAO-B
Lazabemid	6540.50 ± 220.00	0.005 ± 0.001	1308.00	Yarışmalı	Tersinir	MAO-B
Moklobemid	0.010 ± 0.001	1.52 ± 0.11	0.007	Yarışmalı	Tersinir	MAO-A

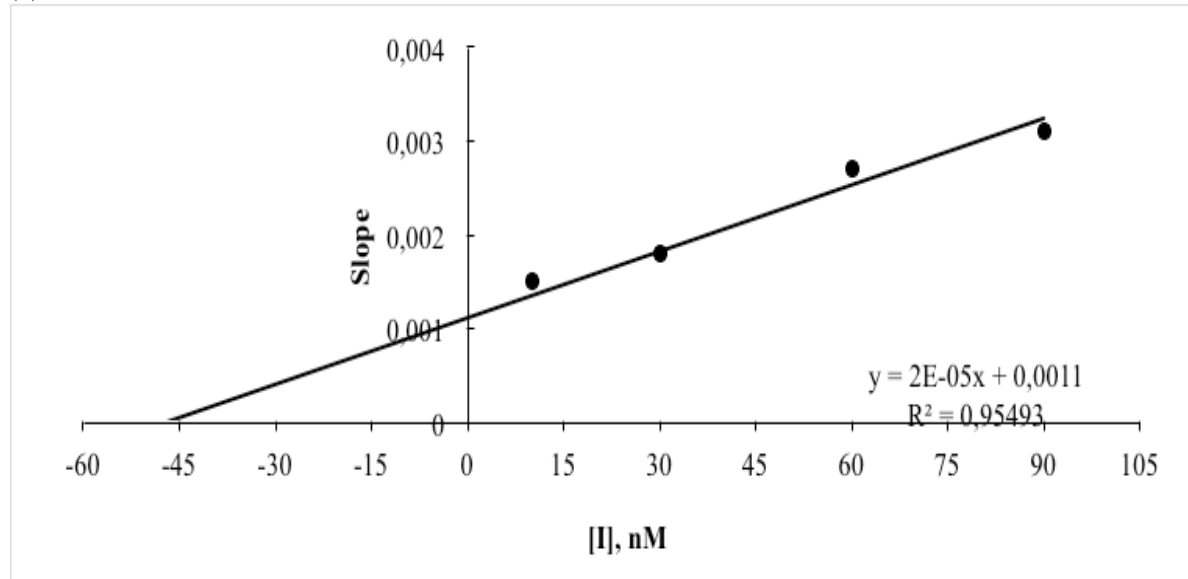
* Deneylerde rasemik bileşikler kullanılmıştır.

**Bulgular, 3 bağımsız deneyin ortalama \pm standart hatası olarak ifade edilmiştir.

*** Seçicilik indeksi (SI): K_i (MAO-A)/ K_i (MAO-B) olarak hesaplanmıştır. SI büyüdükçe MAO-B izoformuna afinite artmaktadır.



(A)



(B)

Şekil 4. (A) hMAO-B izoformunun SH2U bileşiği ile inhibisyonuna ilişkin Lineweaver-Burk grafiği. İnhibitör derişimleri grafiğin sol tarafında gösterilmiştir.

(B) Lineweaver-Burk grafiğinde elde edilen doğruların SH2U bileşiğinin derişimlerine karşı grafiklenmesi sonucu bulunan $K_i = 46.00$ nM.

bileşiğın ilaç olarak geliştirilmesi ile ilgili yapılacak çalışmalarda bir avantaj olduğu fikrine varılmıştır.

SH2U bileşiğının sitotoksitesi, MTT testi ile tayin edilmiştir. In vitro sitotoksite çalışmasında insan HepG2 hücreleri kullanılmış; SH2U bileşiği

1, 5 ve 25 μ M derişimlerde hazırlanarak hücrelerle muamele edilmiş ve hücre canlılığı ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Tablo 4’de sunulmuştur. Görüldüğü üzere, SH2U bileşiği uygulanan derişimlerde hücreler üzerinde toksik etki göstermemiştir.

Tablo 3. hMAO enziminin inhibisyonunun tersinirliği*

Bileşikler	Dializ öncesi	Dializ sonrası	Dializ öncesi	Dializ sonrası	Tersinirlik
	hMAO-A aktivitesi (%)	hMAO-A aktivitesi (%)	hMAO-B aktivitesi (%)	hMAO-B aktivitesi (%)	
İnhibitör yokluğunda	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00	-
Moklobemid	23.66±1.12	92.00±4.01	85.22±2.78	96.02±5.01	Tersinir
Selejilin	91.87±3.07	97.00±3.56	44.80±1.99	45.02±2.30	Tersinmez
Lazabemid	89.22±3.01	94.55±2.76	12.45±1.06	94.22±1.92	Tersinir
SH2U	80.26±3.11	97.00±4.19	18.50±1.52	97.26±3.47	Tersinir

*Bulgular, 3 bağımsız deneyin ortalama ± standart hatası olarak ifade edilmiştir.

Tablo 4. *In vitro* sitotoksosite bulguları

Bileşikler	% Canlılık		
	1 µM	5 µM	25 µM
SH2U	97.55±3.01	96.74±2.10	92.45±1.98
Moklobemid	96.21 ± 2.78	78.44 ± 2.33 [*]	57.95 ± 1.87 ^{**}
Selejilin	94.26 ± 3.02	85.24±1.78 [*]	62.20±3.16 ^{**}
Lazabemid	96.33 ± 1.85	89.24±2.30 [*]	59.64±2.00 ^{**}

Hücre canlılığı, kontrol değerini % si olarak belirtilmiştir. Bulgular, 3 bağımsız deneyin ortalama ± standart hatası olarak ifade edilmiştir. p<0.05 istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

TARTIŞMA

Daha önceki çalışmalarımızın sonuçlarına göre (25, 26) pirazolin yapısındaki bileşikler monoamin oksidaz enzim inhibisyonu yapmaktadırlar. Bu amaçla 3',5'-Dikloro-2'-hidroksi-4-metil şalkon ile izonikotinik asit hidrazinin etanol içinde reaksiyona girmesi sonucu 3-(3,5-dikloro-2-hidroksifenil)-5-p-tolil-4,5-dihidropirazol-1-il(piridin-4-il)metanon (SH2U) bileşiği elde edilmiştir. Elde edilen bu madde orijinal olup yapı aydınlatması IR, ¹H NMR ve elemental analiz yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bileşiğin IR spektrumunda 3411 cm⁻¹'de -OH ve 1671

cm⁻¹'de de karakteristik amid karbonil (C=O) pikleri görülmüştür. ¹H NMR spektrumunda 2.99 ppm'de HA, 3.55 ppm'de HB ve 5.39 ppm'de HX olmak üzere dublet dublet olarak görülen üç pik karakteristik pirazolin yapısını kanıtlamaktadır. Yine kütle spektroskopisi verilerinden görülen moleküler iyon piki ([M]⁺) SH2U bileşiğinin yapısını kanıtlamaktadır. [M+2] izotop pikleri bileşiğin bir halojen atomu taşıdığını gösterirken, [M+4] izotop piklerinin varlığı bileşiğin iki halojen atomu taşıdığını göstermektedir (26). Elemental analiz verileri de bileşiğin yapısını kanıtlamaktadır.

Tablo 1’de görülen bağlanma enerjileri ve moleküler modelleme çalışmalarındaki bağlanma özellikleri SH2U bileşiğinin MAO-B enzimine MAO-A enziminden daha güçlü şekilde bağlandığını göstermektedir. hMAO-B enzimi ile etkileşimin genellikle hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağı ile olduğu rapor edilmiştir (27). Moleküler modelleme çalışmaları göstermiştir ki, SH2U bileşiğinin hMAO-B enzimiyle etkileşiminde hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağı rol oynamaktadır. Bileşiklerin yapısında bulunan hidrojen atomlarının halojen atomları ile yer değiştirmesinin molekülün hidrofobitesini ve hacmini artırarak hMAO-B enzime bağlanma gücünü yükselttiği düşünülmektedir (27). Bileşimimizde A halkasında bulunan iki klor atomunun, molekülü daha hidrofobik bir hale getirerek hMAO-B enzimiyle etkileşimi artırdığı kanısına varılmıştır. Chen ve ark., bileşiklerin hMAO-B enzime olan seçiciliğinin temelde en az iki amino asit tarafından belirlendiğini ve bu amino asitlerin ile 199 ve Cys 172 olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu iki amino asit, hMAO-A enzimde Phe 208 ve Asn 181 olarak bildirilmiştir (27). hMAO-B enziminin seçiciliğinde rol oynayan diğer iki amino asit Tyr 326 ve Leu 171’dir (27, 28). Tüm bu veriler dikkate alındığında SH2U bileşiğinin hem ile 199 ile hem de Cys 172 amino asitleri ile etkileşime girerek hMAO-B enzime bağlandığını düşünebiliriz. Yine hMAO-B enziminin seçiciliğinde rol alan Tyr 326’nın A halkasının 5. konumundaki klor atomu ve 2- pirazolin halkası ile etkileştiği görülmektedir. Leu 171’in ise 2-pirazolin halkası ve B halkası ile etkileştiği görülmektedir. Oysa bileşimimiz, hMAO-A enzimindeki iki amino asitten sadece Phe 208 ile etkileşime girmektedir. Bu da

bileşimimizin hMAO-A enzimiyle daha az etkileşime girerek hMAO-B seçici etki göstermesine neden olmaktadır. hMAO enziminin A ve B izoformlarının, dizilim kimliği açısından %70 oranında benzerlik gösterdiği düşünüldüğünde bağlanma ceplerinde sadece birkaç amino asitin farklı olduğu görülmektedir. hMAO-A ve hMAO-B enziminin bağlanma ceplerindeki amino asitlerinin farkı dikkate alınarak hMAO izoformlarına özgül inhibitörler tasarlanabilmektedir (27). Çalışmamızda, biyokimyasal verilerimizin moleküler modelleme sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Sentezi gerçekleştirilen bu orijinal bileşiğin MAO-B izoformunu seçici, tersinir ve yarışmalı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. SH2U bileşiği, bilinen MAO-B inhibitörü olan selejiline göre daha iyi bir inhibisyon gücüne ve seçiciliğe sahiptir. Bileşiğin MAO-B enzimi için Ki değeri $0.046 \pm 0.001 \mu\text{M}$ ve seçicilik indeksi değeri ise 272.83 olarak bulunmuştur. Selejilinin MAO-B enzimi için Ki değeri $0.31 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ve seçicilik indeksi değeri 56.45’dir. Diğer seçici MAO-B inhibitörü olan lazabemidin MAO-B enzimi için bulunan Ki değeri 0.005 ± 0.001 ve seçicilik indeksi 1308.00’dir. Lazabemidin SH2U bileşiğine göre daha seçici ve inhibisyon gücünün daha yüksek olduğu görülmektedir. SH2U bileşiğinin $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ ve $25 \mu\text{M}$ dozlarda toksik olmadığı gösterilmiştir.

Tüm bu sonuçlar SH2U bileşiğinin etkin bir MAO-B inhibitörü olduğunu ve Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi önemli nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek yeni bileşiklerin keşfi açısından ümit verici olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Boppana K, Dubey PK, Jagarlapudi SARP, Vadivelan S, Rambabu G. Knowledge based identification of MAO-B selective inhibitors using pharmacophore and structure based virtual screening models. *Eur J Med Chem*, 2009; 44: 3584-90.
2. Finberg JPM. Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacol Ther*, 2014; 143(2): 133-52.
3. Fioravanti R, Bolasco A, Manna F, Rossi F, Orallo F, Yanez M, et al. Synthesis and molecular modelling studies of prenylated pyrazolines as MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010; 20: 6479-82.
4. Joubert J, Foka GB, Repsold BP, Oliver DW, Kapp E, Malan SF. Synthesis and evaluation of 7-substituted coumarin derivatives as multimodal monoamine oxidase-B and cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer’s disease. *Eur J Med Chem*, 2017; 125: 853-64.

5. Mertens MD, Hinz S, Muller CE, Gutschow M. Alkynyl-coumarinyl ethers as MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2014; 22: 1916-28.
6. Secci D, Bolasco A, Carradori S, D'Ascenzio M, Nescatelli R, Yáñez M. Recent advances in the development of selective human MAO-B inhibitors: (Hetero)arylidene-(4-substituted-thiazol-2-yl)hydrazines. *Eur J Med Chem*, 2012; 58: 405-17.
7. Rojas RJ, Edmondson DE, Almos T, Scott R, Massari ME. Reversible and irreversible small molecule inhibitors of monoamine oxidase B (MAO-B) investigated by biophysical techniques. *Bioorg Med Chem*, 2015; 23: 770-78.
8. Gökhan-Kelekçi N, Yabanoglu S, Küpeli E, Salgın U, Özgen Ö, Ucar G, et al. A new therapeutic approach in Alzheimer disease: Some novel pyrazole derivatives as dual MAO-B inhibitors and antiinflammatory analgesics. *Bioorg Med Chem*, 2007; 15: 5775-86.
9. Gokhan-Kelekci N, Koyunoğlu S, Yabanoğlu S, Yelekci K, Ozgen Ö, Ucar G, et al. New pyrazoline bearing 4(3H)-quinazolinone inhibitors of monoamine oxidase: Synthesis, biological evaluation, and structural determinants of MAO-A and MAO-B selectivity. *Bioorg Med Chem*, 2009; 17: 675-89.
10. Li Y, Luo Y, Huang W, Wang J, Lu W. Total synthesis of mallotophilippen C. *Tetrahedron Lett*, 2006; 47: 4153-55.
11. Sato S, Akiya T, Nishizawa H, Suzuki T. Total synthesis of three naturally occurring 6,8-di-C-glycosylflavonoids: phloretin, naringenin, and apigenin bis-C-b-Dglucosides. *Carbohydr Res*, 2006; 341: 964-70.
12. Kamara BI, Manong DTL, Brandt, EV. Isolation and synthesis of a dimeric dihydrochalcone from *Agapanthus africanus*. *Phytochemistry*, 2005; 66: 1126-32.
13. Ali MA, Shaharyar M, Siddiqui AA. Synthesis, structural activity relationship and anti-tubercular activity of novel pyrazoline.derivatives. *Eur J Med Chem*, 2007; 42: 268-75.
14. Anderson MC, Hasan F, Mc Crodden JM, Tipton KF. Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect. *Neurochem Res*, 1993; 18: 1145-49.
15. Yáñez M, Fraiz N, Cano E, Orallo F. Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 344: 688-95.
16. Chimenti F, Maccioni E, Secci D, Bolasco A, Chimenti P, Granese A, et al. Synthesis, stereochemical identification, and selective inhibitory activity against human monoamine oxidase-B of 2-methylcyclohexylidene-(4-arylthiazol-2-yl)hydrazones. *J Med Chem*, 2008; 51: 4874-80.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248-54.
18. Petzer A, Pienaar A, Petzer JP. The interactions of caffeine with monoamine oxidase. *Life Sci*, 2013; 93: 283-87.
19. Jayaprakash V, Yabanoglu S, Sinha BN, Ucar G. Pyrazoline-based mycobactin analogues as dual inhibitors of MAO/cholinesterase. *Turk J Biochem*, 2010; 35 (2): 91-98.
20. Mostert S, Petzer A, Petzer JP. Inhibition of monoamine oxidase by benzoxathiolone analogues, *Bioorg Med Chem Lett*, 2016; 26: 1200-4.
21. Mathew A, Haridas A, Ucar G, Baysal I, Adebayo AA, Soliman MES, Joy M, Mathew GE, Lakshmanan B, Jayaprakash V. Exploration of chlorinated thienyl chalcones: A new class of monoamine oxidase-B inhibitors. *Int J Biol Macromol*, 2016; 91: 680-95.
22. Schoonen WG, de Roos JA, Westerink WM, Débiton E. Cytotoxic effects of 110 reference compounds on HepG2 cells and for 60 compounds on HeLa, ECC-1 and CHO cells. II mechanistic assays on NAD(P)H, ATP and DNA contents, *Toxicol In Vitro*, 2005; 19(4):491-503.
23. Miret S, Groene EM, Klaffke W. Comparison of in vitro assays of cellular toxicity in the human hepatic cell line HepG2, *J Biomol Screening*, 2006; 11(2): 184-93.
24. Wu, CF, Bertorelli R, Sacconi M, Pepeu G, Consolo, S. Decrease of brain acetylcholine release in aging freely-moving rats detected by microdialysis. *Neurobiol Aging*, 1988; 9(0): 357-61.
25. Evranos-Aksoz B, Yabanoğlu-Çiftçi S, Ucar G, Yelekci K, Ertan R. Synthesis of some novel hydrazone and 2-pyrazoline derivatives: Monoamine oxidase inhibitory activities and docking studies. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014; 24: 3278-84.
26. Evranos-Aksöz B, Baysal I, Yabanoğlu-Çiftçi S, Djikic T, Yelekçi K, Uçar G, et al. Synthesis and screening of human Monoamine oxidase-A. Inhibitor effect of new 2-pyrazoline and hydrazone derivatives. *Arch Pharm Chem Life Sci*, 2015; 348: 1-14.
27. Chen R, Xiao J, Ni Y, Xu HF, Zheng M, Tong X, Zhang TT, Liao C, Tang WJ. Novel tricyclic pyrazolo[1,5-d][1,4]benzoxazepin-5(6H)-one: Design, synthesis, model and use as hMAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2016; 24: 1741-48.
28. Fioravanti R, Bolasco A, Manna F, Rossi F, Orallo F, Yanez M, Vitali A, Ortuso F, Alcaro S. Synthesis and molecular modelling studies of prenylated pyrazolines as MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010; 20: 6479-82.

Üçüncü basamak bir hastanede tespit edilen cerrahi alan enfeksiyonlarının değerlendirilmesi

Evaluation of surgical site infections detected in a tertiary care hospital

Halide ASLANER¹, Esragül AKINCI¹, Ayşe BUT¹, Dilek KANYILMAZ², Aliye BAŞTUĞ¹, Adalet AYPAK¹, Meltem Arzu YETKİN¹, Pınar ÖNGÜRÜ¹, Hürrem BODUR¹

ÖZET

Amaç: Cerrahi müdahalenin en önemli komplikasyonlarından biri Cerrahi Alan Enfeksiyonlarıdır (CAE). Bu çalışmada 2009-2014 yılları arasında beş cerrahi üniteye karşılaşılan cerrahi alan enfeksiyonlarının türlerinin ve izole edilen etkenlerin antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi amaçlandı.

Yöntem: Bu çalışmada altı yıllık süre içinde (Ocak 2009 - Aralık 2014) aktif sürveyans metodu ile CDC kriterlerine göre tanımlanan cerrahi alan enfeksiyonları değerlendirildi.

Bulgular: Altı yıllık sürede beş cerrahi üniteye 800 cerrahi alan enfeksiyonu tespit edildi. Cerrahi alan enfeksiyonu nozokomiyal enfeksiyonlar içinde bazı yıllarda ikinci, bazı yıllarda üçüncü en sık görülen enfeksiyon idi. Hastaların ortalama yaşı 58,18±16,86 olup %53,07'si erkekti. Çalışmaya dahil edilen hastaların 87 (%10,87)'si yüzeysel CAE, 299 (%37,37)'u derin CAE ve 414 (%51,75)'ü organ boşluk CAE idi. En fazla organ boşluk CAE Genel Cerrahi Kliniği'nde tespit edildi. İzole edilen mikroorganizmalar *Escherichia coli* (% 26,16), *Acinetobacter spp.* (%22,53), *Staphylococcus spp.* (%14,63), *Enterococcus spp.* (%11,78), *Klebsiella spp.* (%8,16), *Pseudomonas spp.* (%7,64), *Enterobacter spp.*

ABSTRACT

Objective: One of the most important complications of surgery is postoperative surgical site infections (SSI). In this study, it is aimed to investigate the species and antimicrobial resistance rates of the isolates in SSI in five surgical units between 2009-2014.

Methods: In this study, the SSI's which were detected by active surveillance method and defined according to Centers for Disease Control and Prevention criteria (CDC) were evaluated in the five surgery units during the six-years period (January 2009-December 2014).

Results: During six-years period, 800 SSI were detected in five surgery units. SSI was the second most common type in some years and the third most common type in other years of hospital-acquired infections. The mean age was 58,18±16,86 years, and 53,07% were males. Of the patients included in the study 87 (10,87%) were incisional SSI, 299 (37,37%) were deep SSI, and 414 (51,75%) were organ space SSI. The most prevalent organ space SSI was detected in General Surgical Clinic. The isolated microorganisms were *Escherichia coli* (26,16%), *Acinetobacter spp.* (22,53%), *Staphylococcus spp.* (14,63%), *Enterococcus spp.* (11,78%), *Klebsiella spp.* (8,16%), *Pseudomonas spp.* (7,64%), *Enterobacter spp.*

¹Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara

²Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Kontrol Komitesi, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Halide ASLANER

Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Talatpaşa Bulvarı No: 5 Altındağ Ankara - Türkiye

Tel : +90 505 895 54 35

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

Geliş Tarihi / Received : 15.10.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.77150

Aslaner H, Akinci E, But A, Kanyılmaz D, Batuğ A, Aypak A, Yetkin MA, Öngürü P, Bodur H. Üçüncü basamak bir hastanede tespit edilen cerrahi alan enfeksiyonlarının değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(3): 265-276

(%3,36), *Candida spp.* (%1,68), *Proteus spp.* (%1,42) ve diğer mikroorganizmalar (%2,59) idi. *Acinetobacter spp.* yüksek oranda (%82,60-%100) meropenem ve çok ilaca dirençli yapıya sahiptir. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten *E. coli* oranı 2009-2014 yıllarında %46,93-%16,66 arasında idi. Tüm *Enterobacter spp.* karbapenem duyarlı idi. *S. aureus*'un %73,33'ü ve koagülaz negatif stafilkokların %78,26'sı metisilin dirençli idi. Enterokoklarda 2011 yılında 2, 2014 yılında 1 vankomisin dirençli bakteriye rastlanılmıştır.

Sonuç: Her ünite uygun antimikrobiyal profilaksi ve ampirik tedavi için, kendi epidemiyolojik verilerini, CAE sıklığını ve etiolojisini tanımlamalıdır. Böylece akılcı ampirik antibiyotik kullanımını yaygınlaştırmanın yanı sıra, CAE ilişkili sağlık harcamaları ile morbidite ve mortalitenin azalmasına da yardımcı olunabilir.

Anahtar Kelimeler: cerrahi alan enfeksiyonu, antimikrobiyal direnç, enfeksiyon etkenleri

(3,36%), *Candida spp.* (1,68%), *Proteus spp.* (1,42%) and other microorganisms (2,59%). *Acinetobacter spp.* are highly resistant to meropenem (82,60%-100%) and has multidrug resistant pattern. The ratio of *E. coli* which produces extended spectrum beta lactamase changed between 46,93%-16,66% in 2009-2014. *Enterobacter spp.* was susceptible to carbapenem. Methicillin resistance was found in 73,33% of *S. aureus* and 78,26% of CNS strains. It was observed that of the enterococcus, in 2011 two, and in 2014 one were resistant to vancomisin.

Conclusion: Every unit should define her own epidemiologic data, frequency and etiology of SSI in order to approach their antimicrobial prophylaxis and empiric treatment rationally. It may help to organize proper antibiotic use, minimize morbidity, mortality and healthcare costs associated with SSI.

Key Words: surgical site infections, antimicrobial resistance, infection agents

GİRİŞ

Hastane kaynaklı enfeksiyonlar (HKE), gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olup, tedavi maliyeti ve yatış süresinde önemli artışlara neden olmaktadır (1). Hastane kaynaklı enfeksiyonlar içinde ise cerrahi alan enfeksiyonları (CAE) en sık görülen enfeksiyonlardan biri olup, HKE'lerin yaklaşık %38'i olarak bildirilmektedir. Buna karşın CAE'nin risk düzeyi düşüktür. Her yıl cerrahi girişim yapılan 30 milyondan daha fazla hastada %2-5'i gibi düşük bir oranda CAE geliştiği tahmin edilmektedir (1, 2, 10). CAE'nin gelişimini hastane ve ameliyathane koşulları, cerrahi teknik, hastaya ait faktörler, asepsi ve antisepsi uygulamaları gibi pek çok faktör etkilemektedir (1, 3, 11).

Bu çalışmada Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde 01 Ocak 2009 -31 Aralık 2014 tarihleri

arasında tespit edilmiş olan CAE'nin, düzenli olarak yürütülmekte olan sürveyans kayıtları ve 2008 yılından itibaren kullanılan web tabanlı Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) incelenerek, yeni tanımlar kullanılmaya başlanmadan önceki durum değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde 1 Ocak 2009 ile 31 Aralık 2014 tarihleri arasında altı yıllık aktif sürveyans ile UHESA'ya girilen, CDC'nin 2008 tanı kriterlerine göre CAE tanısı almış olan hastaların verileri incelenmiştir (4). Cerrahi girişim sonrasında implant yok ise 30 gün, implant var ise 1 yıl içinde cerrahi uygulanan alan ile ilişkili gelişen enfeksiyonlar cerrahi alan enfeksiyonu olarak kabul edilmiştir. Ayrıntıları Tablo 1'de verilmiştir (4).

Tablo 1. Cerrahi alan enfeksiyonlarında tanı kriterleri (CDC 2008)

Cerrahi Alan Enfeksiyonu Tanı Kriterleri
<p>Yüzeysel insizyonel cerrahi alan enfeksiyonu için tanı kriterleri</p> <p>İnsizyon yeri ile ilişkili cilt ve cilt altı dokusunda, operasyonu izleyen 30 gün içinde, aşağıdakilerden en az birinin var olması gereklidir:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. İnsizyon yerinden pürülan drenaj olması (laboratuvar verileri ile doğrulanması gerekli değildir) 2. Yara yerinden gelen ve aseptik şartlarda alınan sıvı veya yara yeri dokusu kültüründe mikroorganizmanın üretilmesi 3. Lokalize şişlik, kızamıklık, hassasiyet, ağrı ve ısı artışı gibi enfeksiyon bulgularından en az birinin eşlik etmesi ve cerrah tarafından yarının enfeksiyon tanısı ile açılmasının gerekli görülmesi 4. Hastanın doktorunun veya cerrahın enfeksiyon düşünmesi
<p>Derin insizyonel cerrahi alan enfeksiyonu için tanı kriterleri</p> <p>Cerrahi insizyon ile ilişkili fasia, kas veya derin yumuşak dokuları ilgilendiren ve operasyonu takiben 30 gün içinde veya operasyon yerinde bir yabancı cisim (implant vs) yerleştirildi ise bir yıl içinde, aşağıdakilerden en az birinin var olması gereklidir:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Fasya katları arasından pürülan drenaj olması 2. Hastanın ateşi, lokalize hassasiyet ve ağrısı nedeniyle cerrah tarafından kültürde üreme olmaksızın yarının açılması 3. Cerrahi müdahale sırasında veya histopatolojik, radyolojik görüntüleme ile apse varlığının gösterilmesi 4. Cerrahın enfeksiyon düşünmesi
<p>Organ / boşluk cerrahi alan enfeksiyonu için tanı kriterleri</p> <p>Operasyon esnasında açılan veya manipüle edilen herhangi bir anatomik bölgede ve operasyondan sonra 30 gün veya implant varsa bir yıl içinde, aşağıdakilerden en az birinin var olması gereklidir:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Organ veya alan içine konulmuş drenaj pürülan drenaj olması 2. Organ / boşluktaki dokudan veya sıvının kültüründen mikroorganizma izole edilmesi 3. Fizik muayene, reoperasyon, histopatolojik veya radyolojik incelemede organ/boşlukta enfeksiyon veya abse bulgusu 4. Cerrah veya konsültan hekim tarafından organ/boşluk cerrahi alan enfeksiyonu tanısının konulması

Genel cerrahi, ortopedi ve travmatoloji, beyin cerrahisi, üroloji ve kalp damar cerrahisi kliniklerinde operasyona alınan hastalardan cerrahi alan enfeksiyonu gelişen, hastanede yatarak tedavi alan hastaların yaş, cinsiyet, operasyon adı, cerrahi alan enfeksiyonunun tipi, elde edilen enfeksiyon etkeni mikroorganizma ve direnç paternleri değerlendirilmiştir. Hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen hasta örnekleri koyun kanlı agar besiyerine (BD Diagnostic Systems, USA) ve Eosin Methylene Blue agar (EMB, Oxoid) besiyerine eş zamanlı olarak ekilmiştir. Suşların tanımlanmasında Gram boyama, oksidaz testi gibi konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ile birlikte Ocak 2009-Mart 2014 tarihleri arasında bakterilerin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık

testi VITEK 2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile yapılmıştır. Mart 2014-Aralık 2014 tarihleri arasında ise bakterilerin tanımlanmasında MALDI TOF MS (Bruker, Almanya) sistemi, antibiyotik duyarlılıklarının tespitinde ise Phoenix (Becton Dickinson-Belçika) sistemi kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine uygun olarak belirlenmiştir (5). MRSA tespitinde Ocak-2009-Mart 2014 tarihleri (VITEK 2 sefoksitin MİK>4µg/ml) ve Mart 2014-Aralık 2014 tarihleri (Phoenix sefoksitin MİK>4µg/ml) arasında sefoksitin mikrodilüsyon, yöntemleri kullanılmıştır. Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen bütün klinikler değerlendirildiğinde, 2009 yılında HKE'ler içinde CAE %31.52 oranı ilk sırada iken daha sonraki beş yıl boyunca ikinci ve üçüncü sırada (%16.41 ile %24.57 arasında değişen oranlarda) yer almış, solunum yolu enfeksiyonları ilk sıraya yerleşmiştir. Toplam 800 CAE tespit edilmiştir. Yaş ortalaması 58.16±16,86, cinsiyet dağılımı %53.07 erkek ve %46.93 kadın olarak bulunmuştur (Tablo 2). Sadece beyin cerrahisi kliniğinde yaş ortalaması 50 yaşın altında iken (47.53±16,37), en yüksek yaş ortalaması (63.19±19,35) ortopedi kliniğinde tesbit edilmiştir.

Değerlendirmeye alınan CAE içerisinde 87 hastada yüzeysel, 299 hastada derin ve 414 hastada organ boşluk enfeksiyonu tespit edilmiştir. Organ boşluk enfeksiyonu en sık genel cerrahi kliniğinde görülmüştür (Tablo 2). Yıllara göre dağılımı Grafik 1'de verilmiştir.

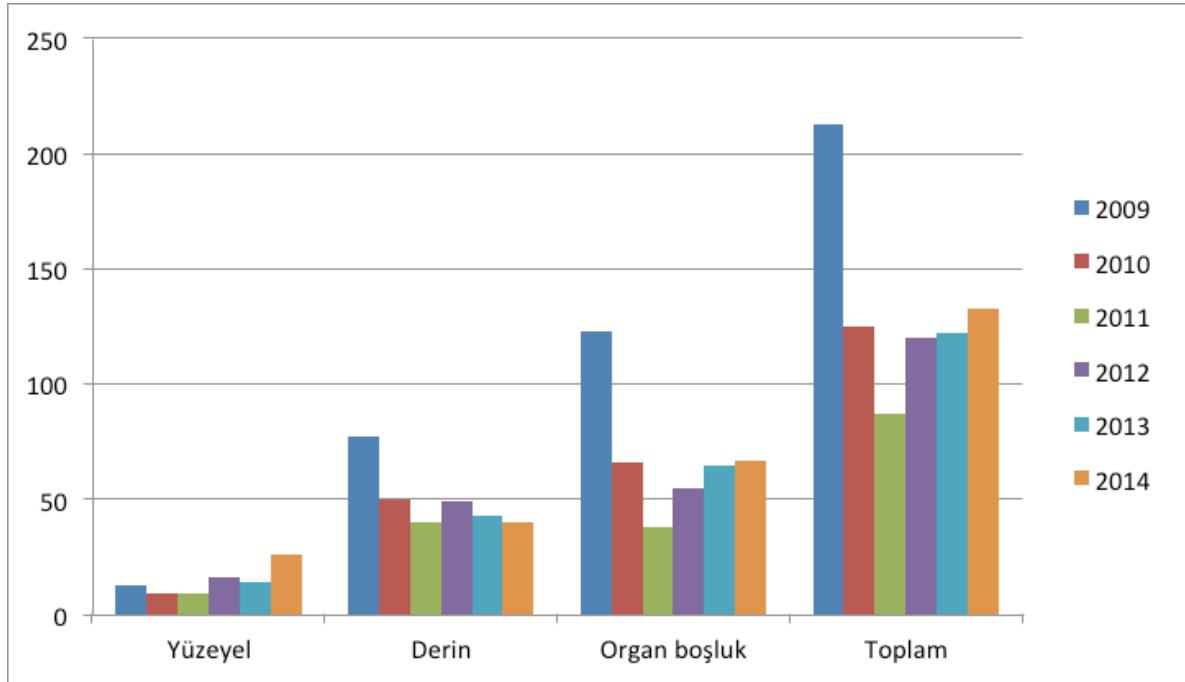
Tespit edilen 772 etken mikroorganizmadan en sık *Escherichia coli* (202, %26.16), sonra sırasıyla *Acinetobacter baumannii* (174, %22.53), *Staphylococcus spp.* (113, %14.63), *Enterococcus spp.* (91, %11.78), *Klebsiella spp.* (63, %8.16), *Pseudomonas spp.* (59, %7.64), *Enterobacter spp.* (26,

%3.36), *Candida spp.* (13, %1.68) ve *Proteus spp.* (11, %1.42) tespit edilmiştir. Seksen altı CAE'de ise tanı klinik tanı şeklinde olup etken tespit edilememiştir. Yıllara göre etkenler Grafik 2'de verilmiştir. *Staphylococcus türlerinin* 90' ının (%79.64) *S. aureus* ve bunların da %73.33'ünün metisilin dirençli (MRSA) olduğu belirlenmiştir. Koagülaz negatif stafilokokların ise %78.26'sının metisilin dirençli (MRKNS) olduğu bulunmuştur. Vankomisin ve teikoplanin direncine rastlanmamıştır. Enterokoklarda (91, %11.78) 2011 yılında 2 adet, 2014 yılında 1 adet vankomisin dirençli (VRE) bakteriye rastlanmamıştır. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde antimikrobiyal direnç oranları Grafik 3, 4, 5, 6 ve 7'de verilmiştir. *E. coli* direnç oranlarına bakıldığında 2009'da seftazidim direnci %89 iken 2014'e kadar her yıl azalmış ve %59.52'a kadar düşmüştür. GSBL oranları ise 2009 ile 2014 yılları arasında %46 - %16.66 arasında seyretmiştir.

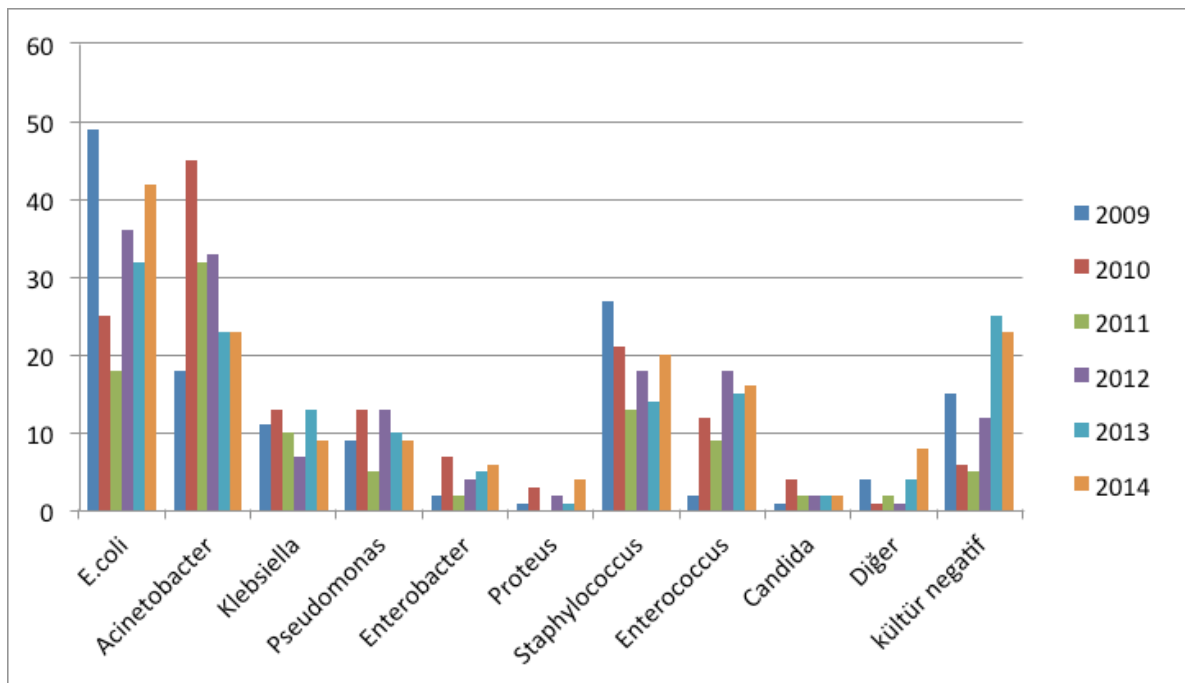
CAE 'lerde ikinci sıklıkta tesbit ettiğimiz *Acinetobacter spp.* meropenem, piperasilin tazobaktam, siprofloksasin ve seftazidime yüksek oranda direnç göstermiş ve genellikle yıllar içinde %80'lerin üzerinde seyretmiştir. Sadece amikasinine karşı %40-87.50 arasında değişen oranlarda

Tablo 2. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde 01 Ocak 2009-31 Aralık 2014 tarihleri arasında CAE gelişen hastaların kliniklere göre yaş ortalaması, cinsiyet dağılımı ve tipleri

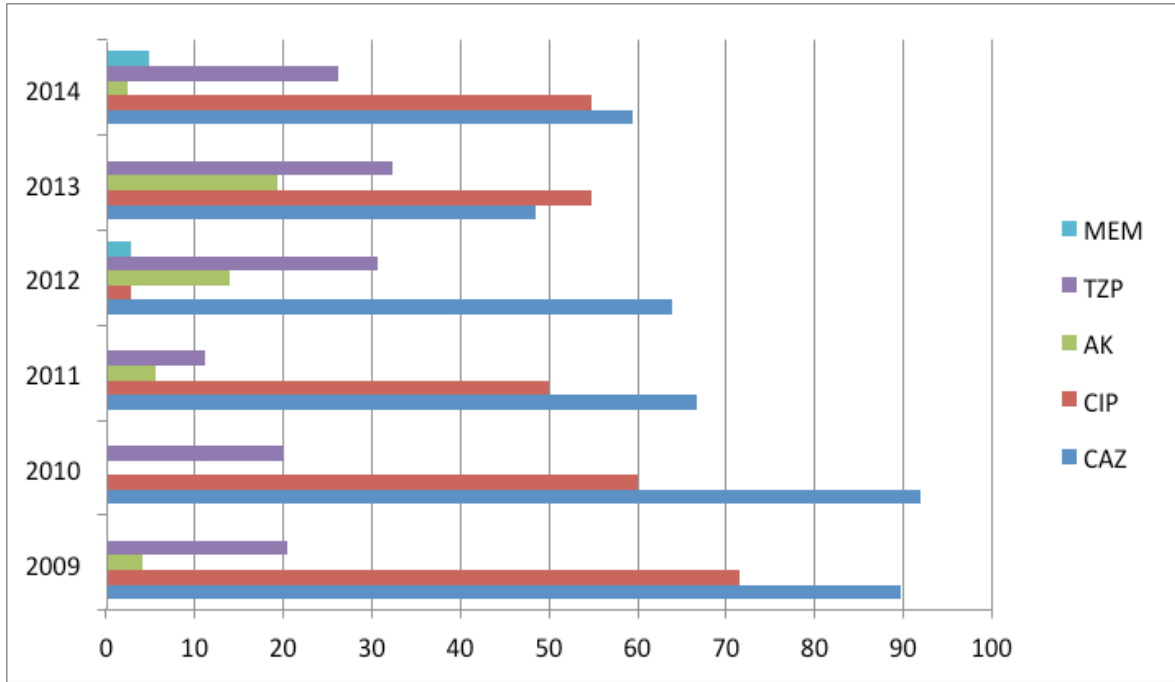
Klinikler	Yaş Ortalaması	Kadın (%)	Erkek (%)	Yüzeysel n (%)	Derin n(%)	Organ boşluk n(%)	Toplam n(%)
Ortopedi	63.19±19.36	49.72	50.28	35 (14.28)	154(62.86)	56 (22.86)	245 (30.62)
Genel cerrahi	57.34±15.28	48.98	51.02	37 (8.94)	92(22.22)	285(68.84)	414 (51.75)
Beyin cerrahisi	47.53±16.38	41.37	58.63	7 (8.75)	25(31.25)	48 (60.0)	80 (10.0)
Üroloji	59.27±12.73	27.45	72.55	6 (11.11)	24(44.44)	24 (44.44)	54 (6.75)
Kalp damar cerrahisi	56.83±15.59	50.00	50.00	2 (28.57)	4(57.14)	1 (14.29)	7 (0.87)



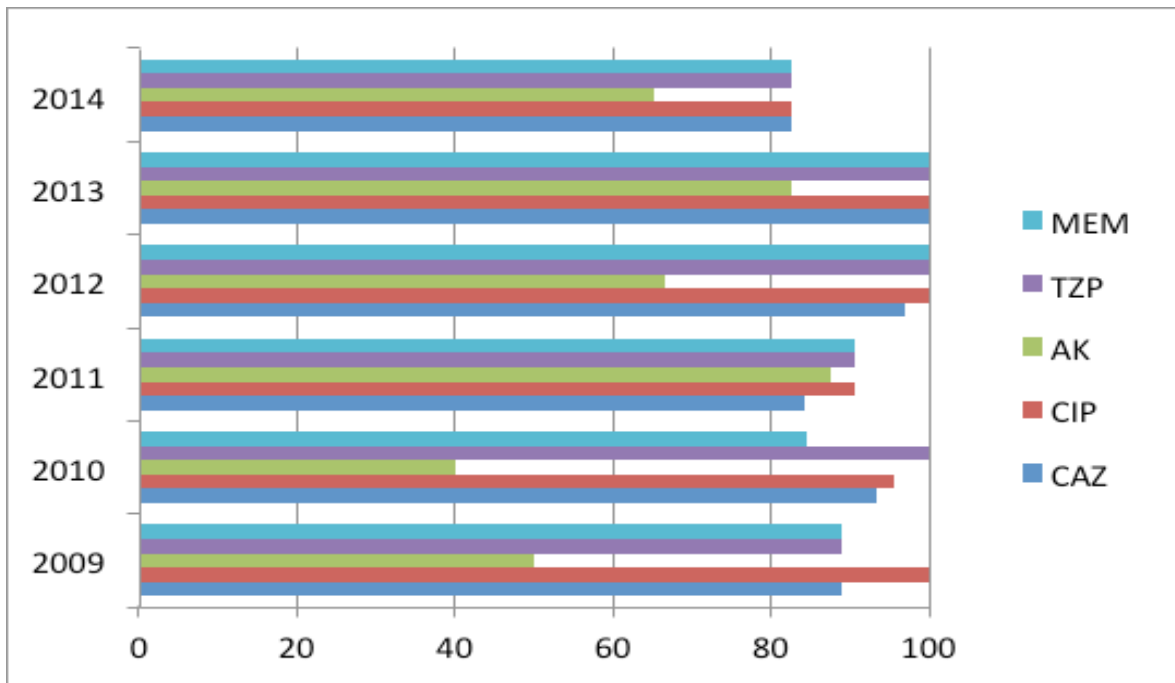
Şekil 1. Yıllara göre CAE sayısı.



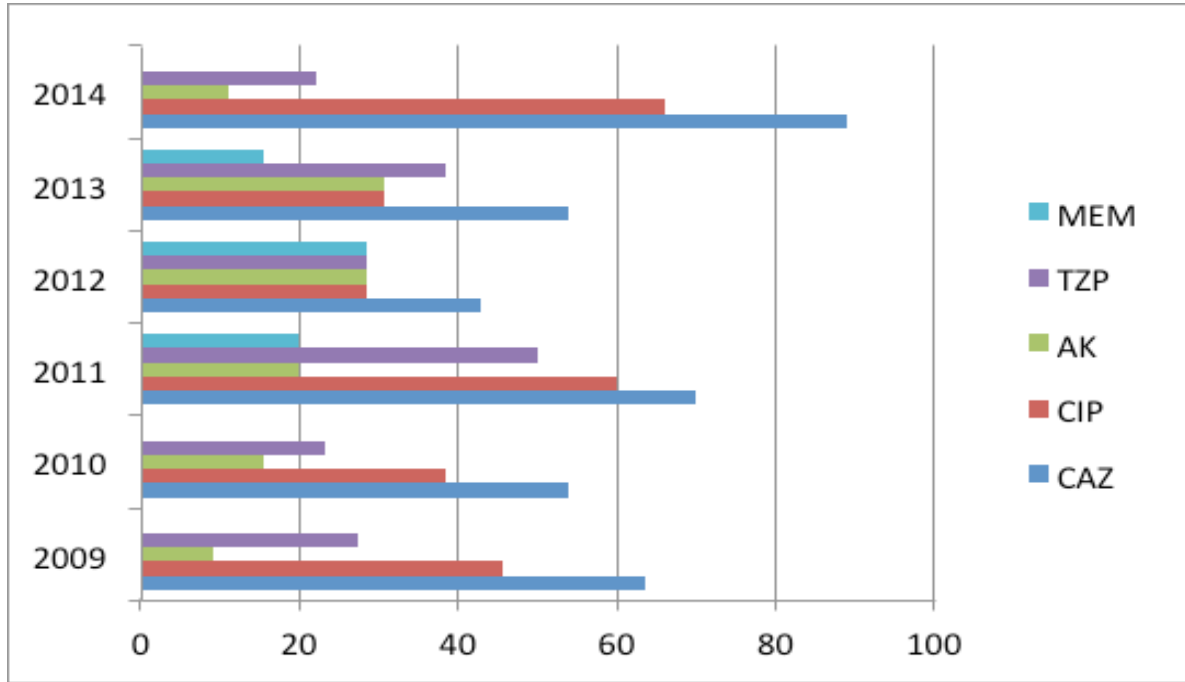
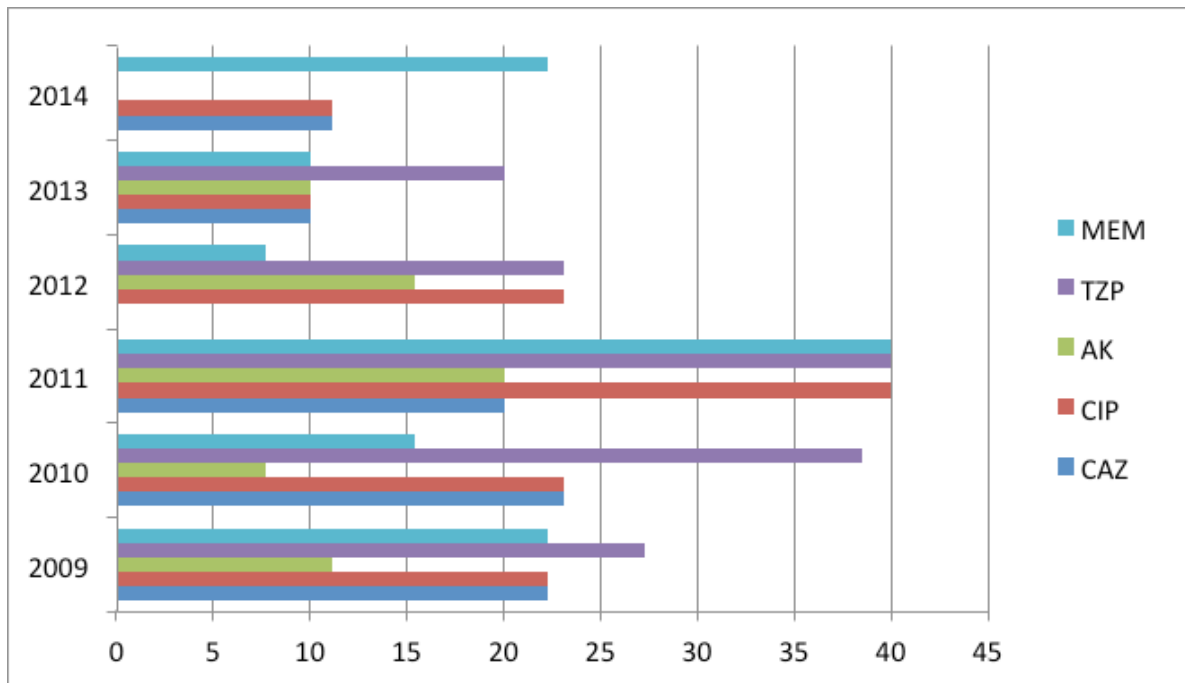
Şekil 2. Etkenlerin yıllar içindeki sayıları.

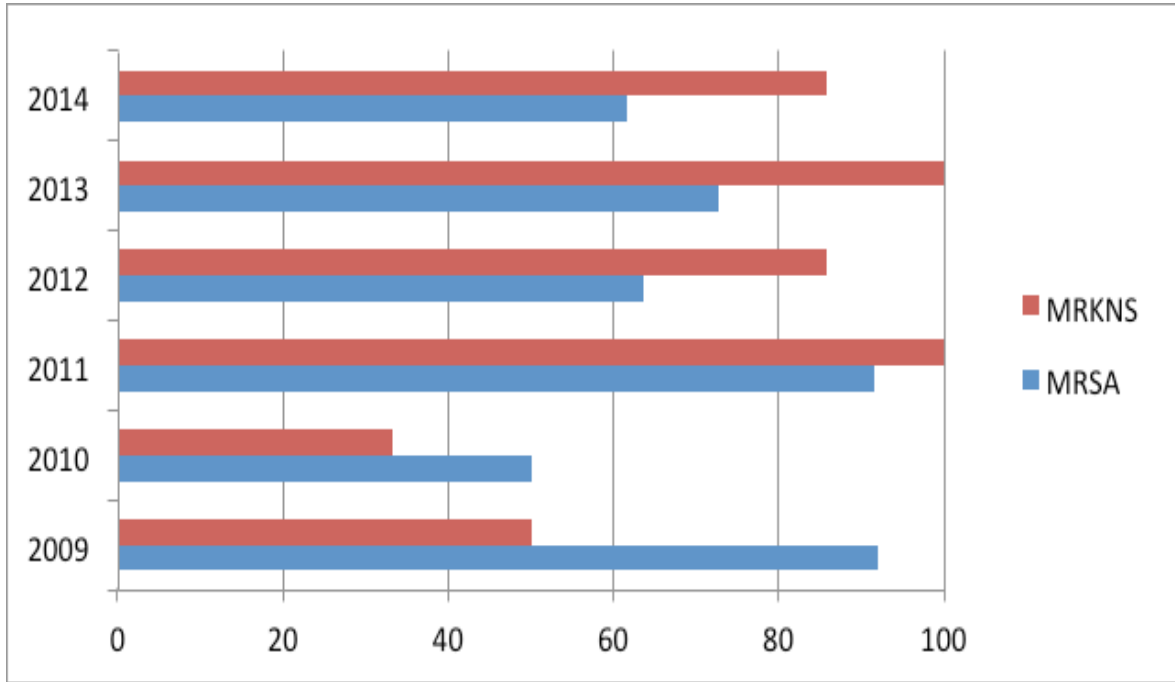


Şekil 3. *E. coli*'nin yıllar içinde direnç oranları.



Şekil 4. *Acinetobacter ssp.*'in yıllar içinde direnç oranları.

Şekil 5. *Klebsiella spp.* yıllar içinde direnç oranları.Şekil 6. *Pseudomonas spp.* yıllar içinde direnç oranları.



Şekil 7. MRSA ve MRKNS'nin yıllar içindeki oranı.

direnç tespit edilmiştir. Kolistine karşı dirence rastlanmamıştır.

Pseudomonas spp. türleri ise *Acinetobacter spp.* türlerinin tersine daha duyarlı bulunmuştur. Seftazidime karşı en yüksek %23.07 oranında (2010 yılında) direnç bulunmuştur. Meropeneme karşı direnç 2011 yılında en yüksek düzeyde tesbit edilmiştir (%40,00).

Tespit edilen *Enterobacter spp.* türlerinde ise meropeneme karşı dirence hiç rastlanmamıştır.

Candida spp. 13 adet (%1.68) saptanmış, 8'i *C. albicans*, 4'ü *C. glabrata*, 1'i *C. krusei* olarak identifiye edilmiştir.

TARTIŞMA

Cerrahi alan enfeksiyonları önemli morbidite ve mortalite nedeni olup, CAE insidansı Amerika Birleşik Devletleri'nde %2-5 şeklinde bildirilmiştir (1, 2, 11). Uygulanan cerrahi girişimin türü, laparoskopik-açık

cerrahi teknik, acil-elektif cerrahi, hastaya ilişkin faktörler, sterilizasyon yöntemleri, ameliyathane koşulları gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişen insidanslar (%0.1-%50.4) bildirilmiştir (3, 6, 7, 11).

Ülkemizden de farklı oranlar bildirilmiştir (%13-%36) (8, 10). Ülkemizden 16 şehirden 20 hastanenin katıldığı prospektif bir çalışmada CAE oranları kraniotomi için %5.3, ventriküler şant için %11.9, koroner by pass için %4.9, kalça protezi için %3.5 ve sezeryan kesisi için %3.0 olarak tespit edilmiş, International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) ile benzer bulunmuştur (16).

Çeşitli çalışmalar, yaş ile birlikte enfeksiyon riskinin arttığını göstermiştir. 144000 den fazla erişkinin değerlendirildiği bir kohort çalışmada 17-65 yaş arasında her yıl CAE riskinin %1.1 arttığını, 65 yaşın üzerinde ise eklenen her yıl CAE riskinde %1.2 azalma olduğunu göstermiştir (15). Hastanemizin üçüncü basamak sağlık hizmeti veren bir hastane olması, komplike ameliyatların ve de eklem protez

ameliyatlarının daha fazla yapıldığı bir birim olması nedeniyle yaş ortalaması yüksek bulunmuştur. Kayıtlarda hastalara ait diğer faktörler detaylı yer almadığı için çalışmada değerlendirilememiştir.

Hastane enfeksiyonlarının dağılımı servislere, yoğun bakımlara göre değişmektedir. Cerrahi kliniklerde CAE ilk sırada yer alırken, yoğun bakım ünitelerinde pnömoni ya da üriner sistem enfeksiyonu ön plana geçebilmektedir (12, 13).

Yüzeysel, derin ve organ/boşluk CAE şeklinde sınıflandırıldığında, altı yıllık süreçte en fazla organ/boşluk enfeksiyonları tespit edilmiş olup, genel cerrahi kliniğinde görülmüştür. Beyin cerrahisinde organ/boşluk enfeksiyonları ön planda bulunmuştur. Ortopedi kliniğinde derin cerrahi alan enfeksiyonuna daha sık rastlanmıştır. Sürveyans sadece yatan hastaya yapıldığı için poliklinik takibine gelen hastaların sayısı tespit edilememiştir. Bu nedenle de yüzeysel enfeksiyon sayısı az, organ boşluk enfeksiyonlarının sayısı daha fazla tesbit edilmiştir. Kalp damar cerrahisinde yedi adet enfeksiyon tesbit edilmiştir. Hastanemizde bu klinik 2012 yılında aktif olarak sürveyans programına alınmıştır. Yıllara göre CAE dağılımı değerlendirildiğinde ortopedi ve genel cerrahi kliniklerinde 2011 yılında azalma olduğu görülmüştür. Eğitim programlarımızın düzenli bir şekilde yapılmaya devam etmesinin katkısı olduğu düşünülmektedir.

Ülkemizden bildirilen etken dağılımlarında Doğan ve ark. (17) yara yeri örneklerinde *E. coli* %28, *P. aeruginosa* %14, *S. aureus* %15; Bayram ve ark.ları (18) *Acinetobacter baumannii* %24 , *P. aeruginosa* %12, *S. aureus* %11, *E. coli* %10; Demirtürk ve arkadaşları (10) *E. coli* %25, *P. aeruginosa* 14%, *S. aureus* %28 oranlarında bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise hastalarda tespit edilen etkenler incelendiğinde altı yılda benzer şekilde gram negatif bakteriler ön plandadır. En sık *E. coli* (%26.16), ikinci sıklıkta *Acinetobacter spp.* (%22.53), daha sonra sırasıyla *Staphylococcus spp.* (%14.63) ve *Enterococcus spp.* (%11.78) tespit edilmiştir. Gram negatif etkenleri daha fazla görmemizin nedeni organ/boşluk ve derin

enfeksiyon sayımızın yatan hasta sürveyansında daha fazla olması ve çoğunluğun genel cerrahi kliniğinden hastalar olması yoğun sevk alan üçüncü basamak bir hastane olmamız ve daha önce müdahale edilmiş olan komplike vakaların takibi olabilir.

MYSTIC Avrupa 2007 çalışmasında 5208 izolatin meropenem ve diğer geniş spektrumlu ajanlara karşı duyarlılığı değerlendirildiğinde Enterobacteriaceae meropeneme %99.4 oranında duyarlı bulunmuş, nonfermenterlere karşı meropenem çok etkin bulunmasına rağmen çok ilaca dirençli *Acinetobacter spp.* ve imipenem dirençli *Pseudomonas spp.* de rapor edilmiştir (14).

The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)'un sürveyans raporuna göre *E.coli*'nin bildirim yapan Avrupa ülkelerinin yarısından çoğunda en az bir antimikrobiyal grubuna dirençli bulunmuş, en yüksek direnç yüzdeleri bizim de içinde bulunduğumuz güney ve güney-doğu Avrupa da tesbit edilmiştir. Ortalama florokinolon direnç yüzdesi 2014'de %22.4 olup, 2011 arasında anlamlı bir eğilim (artış/azalış) saptanmamıştır. Sefalosporinlere %25'in üzerinde direnç rapor edilen ülkeler güney ve güneydoğu Avrupa ülkeleri olup Bulgaristan 'da 2014' de %40,4 olarak belirtilmiştir. Avrupa'da, üçüncü kuşak sefalosporin direnç ortalaması 2011'de %9.6 iken 2014'de %12 şeklinde raporlanmıştır. Aminoglikozidler için anlamlı bir eğilim tesbit edilmemiş olup, karbapenem direnci 2014'de Avrupa'da ortalama %0,1 olarak raporlanmıştır. Yunanistan'da %1,2 bulunmuştur. Dört yıllık sürede anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (19).

UHESA'nın Türkiye genelinde cerrahi kliniklerdeki verilerine göre *E. coli*'nin 2009'da seftazidim direnci %83 iken 2013'de %43'e kadar gerilemiştir (20). Bizim tesbit ettiğimiz oranlarda benzer şekilde olup, direnç oranlarını düşürebilmek amacı ile bir süre hastanemiz eczanesine seftazidim alınmayarak kullanımına ara verilmiştir. Siprofloksasin, amikasin, piperasilin tazobaktama karşı ise direnç seyri aynı düzeylerde kalmıştır. Hastanemizde 2012 yılında siprofloksasin direnci (%2,77) Türkiye genelinin (%57) altında bulunmuştu. Karbapenem direnci Avrupa

ortalamasının üzerinde 2014 yılında %4,76 tesbit edilmiştir. Bunun sebebi ise komplike ve uzun süre yoğun bakımda yatan hastalarımızda gelişen dirençli *Acinetobacter spp.* enfeksiyonlarımızın sık etken olarak görülmesi ve karbapenem kullanımımızın artışı olabilir.

Acinetobacter spp. Avrupa'da kuzeye göre doğu ve güney ülkelerinden daha yüksek direnç oranları bildirilmiştir. Fluorokinolonlara karşı Danimarka'da %2.9 iken Yunanistan'da %95.3 oranında, aminoglikozidlere karşı Danimarka'da %1.7 İtalya'da %89.1, karbapenemler için Hollanda'da sıfır iken Yunanistan'da %93.2 olarak raporlanmıştır (19). Bizim çalışmamızda ise *Acinetobacter spp.*'nin aminoglikozidlere olan direnç oranları %40-%87.5 arasında, siprofloksasin, piperasilin tazobaktam, seftazidim, meropenem için %100'lere kadar yükselmiştir. Bu sonuçlar UHESA Türkiye geneli cerrahi kliniklerin verileri ile ve de Türkiye'den yapılan başka çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (20-23). Hastanemizde *Acinetobacter spp.* ile gelişen enfeksiyonların tedavisi güç duruma gelmiş, fakat henüz hastanemiz cerrahi kliniklerinde kolistin direnci görülmemiştir.

Avrupa'da *Klebsiella spp.*, de 2011-2014 süresinde fluorokinolonlara, üçüncü kuşak sefalosporinlere, aminoglikozidlere, karbapenemlere direnç oranında artış eğilimi görülmüştür. Karbapenemlere karşı en yüksek direnç Yunanistan'da %62.3 (2014) tesbit edilmiştir (19). UHESA'ya göre karbapenem direnci 2009'da sıfır iken 2011'de %32 olarak tesbit edilmiştir. (20). Benzer şekilde hastanemizde de 2009'da sıfır iken, 2012'de %28.57'ye çıkmıştır. Bu durum kaygı vericidir. Seftazidim direnci 2014'de %88.88, siprofloksasin %66.06 iken piperasilin tazobaktam 6 yıllık süreçte daha düşük (%50-%22.22) seyretmiş, hastanemizde tedavi seçeneği olarak ampirik tedavide tercih seçeneklerinden biri olmuştur.

ECDC'e göre Avrupa'da, ülkelerin büyük çoğunluğunda *P. aeruginosa* için %10 üzerinde direnç bildirilmiştir. Karbapenem (2011'de %16.8 ve 2014'de

%18.3), piperasilin tazobaktam (2011'de %16.0, 2014'de %16.9) direnci artma eğilimi gösterirken, fluorokinolon (%22.1-%19.4) ve aminoglikozidlere (%16.7-%14.8) dirençte azalma olduğu raporlanmıştır. (19). UHESA verilerine göre *P. aeruginosa* karbapenem direnci %25-%75 iken (20), hastanemizde %10-%40 oranlarıyla Türkiye geneli oranlarından düşük seyretmiştir. Diğer antibiyotikler için de direnç oranlarımız düşüktür. Cerrahi birimlerdeki *Pseudomonas spp.*'ler nisbeten duyarlı bulunmuştur.

Enterobacteriaceae'lar Türkiye genelinde (2009-2014) karbapeneme duyarlı olarak bildirilmiştir (20). Hastanemizde de kinolonlara ve karbapenemlere hala duyarlı olduğu, Türkiye verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Toplamda 26 Enterobakterin, ikisinde GSBL tesbit edilmiştir.

GSBL oranları UHESA'ya göre cerrahi kliniklerde yüksek seyretmiştir (%64.52-%72.92) (20). Hastanemizde Türkiye verilerine göre daha düşük oranda tesbit edilmiştir (*E. coli* için %46.93-%16.66, *Klebsiella* için %0-33.33 arasında).

Avrupa'da MRSA oranı %0.9-%56.0 arasında bildirilmiştir. Yine güney ve güneydoğu ülkelerinde kuzeye göre daha yüksek oran bulunmuştur. Dört yıllık (2011-2014) süreçte MRSA oranında azalma eğilimi gözlenmiştir (%18.6-%17.4) (19).

Enterokoklar Avrupa'da önemli sağlık ilişkili enfeksiyon etkenlerinden biri olarak görülmektedir. *E. faecium*'da anlamlı artış eğilimi gözlenmiştir (19). UHESA'ya göre cerrahi kliniklerde 2009-2014 yıllarında Vankomisin dirençli Enterokok (VRE) oranları (%22.97-%0) giderek düşmüştür (20). Hastanemizde ise cerrahi kliniklerde 2011'de iki, 2014'de bir VRE tesbit edilmiştir. Hastanemizde 2011 yılında VRE surveyans protokolü oluşturulmuş ve hasta yattığı süre boyunca takip edilmiş, tüm personel eğitilmiştir. VRE etkenlerimiz Türkiye verilerinin altında seyretmiştir.

Sonuç olarak, hastane enfeksiyonlarında etkenlerin, direnç oranları bölgeden bölgeye, hastaneden hastaneye, hatta aynı hastane içinde servisten servise değişmektedir. Ülkemiz karbapenemaz üreten

şuşlar açısından riskli bir bölgedir ve duyarlıklarında azalma tespit edilen şuşların mutlaka ileri moleküler tetkiklerle araştırılması ve sürveyansının yapılması gerekmektedir. Düzenli sürveyans, geri bildirimler, personel eğitimi, uygun profilaksiler, ameliyat öncesi hazırlıklar, hastanın çabuk taburcu edilmesi enfeksiyon kontrolünde önemli basamaklardır (1). Ayrıca en uygun antibiyotiğin uygun doz ve sürede uygulanması direnç gelişimi önlemleri arasındadır. Bu  alışmada CDC'nin 2013'de değişen hastane enfeksiyonları tanımları hastanemizde uygulanmaya başlamadan  nceki CAE'larımız değerlendirilmiştir. En sık karşılaşılan *E. coli* direnç oranlarının henüz

yüksek seyretmediği, *Acinetobacter spp.*'lerin bu kliniklerde de önemli yer tuttuğu ve direnç oranlarının yüksek olmasıyla tedavi zorlukları yaşanabildiği gözlemlenmiştir. Ampirik tedavide sefalosporinler ve kinolonların tedavide yerinin azaldığı tesbit edilmiştir. *Acinetobacter spp.*'ler dışında piperasilin tazobaktam ve karbapenemlere direnç oranları nisbeten d şuk bulunmuştur. Fakat artık *Acinetobacter spp.*'e bağlı olabileceği düşünülen enfeksiyonlarda kolistin kombinasyonları en uygun seçenek olarak karşımıza  ıkmaktadır. Bu  alışmanın  c nc  basamak sağlık hizmeti veren hastaneler arasında CAE açısından ışık tutacağına inanıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Anderson DJ, Podgorny K, Berr os-Torres SI, Bratzler DW, Dellinger EP, Greene L, Strategies to Prevent Surgical Site Infections in Acute Care Hospitals: 2014 Update. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2014; 35(6):305-37
2. Lewis SS, Moehring RW, Chen LH, et al. It is time to change our focus: surgical site infections account for the greatest proportion of hospital-acquired infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; In press
3. Uzunk y A. Cerrahi alan enfeksiyonlarında ameliyathanenin rolü. *Harran  niv. Tıp Fak Derg*, 2004; 1:38-48.
4. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of healthcare-associated infection and criteria for specific type infections in the acute care setting. *AmJ Infect Control*, 2008; 36: 309-32.
5. CLSI. Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI Document M100-S20. Clinical And Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. 2010.
6. Varela JE, Wilson SE, Nguyen NT. Laparoscopic surgery significantly reduces surgical-site infections compared with open surgery. *Surg Endosc*. 2010 Feb;24(2):270-6. doi: 10.1007/s00464-009-0569-1. Epub 2009 Jun 17.
7. Watanabe M, Suzuki H, Nomura S, Maejima K, Chihara N, Komine O, et al. Risk factors for surgical site infection in emergency colorectal surgery: a retrospective analysis. *Surg Infect (Larchmt)*. 2014 Jun;15(3):256-61. doi: 10.1089/sur.2012. 154. Epub 2014 May8.
8. Willke A, Baksan S, Palabıyık ğlu  , Erdem B, K kse T. Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi İbn-i Sina Hastanesi'nde 1992-1998 yıllarında gözlenen hastane enfeksiyonları. *Hastane İnfeksiyonları Derg*, 2001;5:31-7.
9. Yıldız O, Alp E, Duygulu F, Aygen B, Sümerkan B, Doğanay M. Erciyes Üniversitesi Hastanesinde Ortopedik Cerrahi Girişimlerden Sonra Gelişen Cerrahi Alan Enfeksiyonlarının prevalansı. *Erciyes Tıp Derg*, 2006;28(2):57-64.
10. Demirtürk N, Demirdal T. Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesinde tespit edilen cerrahi alan enfeksiyonlarının değerlendirilmesi: İki yıllık veriler. *SDÜ Tıp Fak Derg* 2011;18(1):12-75.

11. Korol E, Johnston K, Waser N, Sifakis F, Jafri HS, Lo M, et al. A systematic review of risk factors associated with surgical site infections among surgical patients. 2013 Dec 18;8(12):e83743. doi: 10.1371/journal.pone.0083743. eCollection 2013.
12. Saçar S, Toprak SK, Asan A, Cevahir N, Serin S, Tırgut H. Pamukkale Üniversitesi Hastane'sinde Hastane Enfeksiyonları Sürveyansı: Üç Yıllık Analiz. *İnfeksiyon Derg*, 2008;22(1):15-21.
13. Şardan YÇ, Aşçıoğlu S, Büke Ç, Şaban Esen, Dilara İnan, Serhat Ünal. Yoğun Bakım Ünitelerinde Hastane Enfeksiyonlarının prevalansı: Çok merkezli bir nokta prevalans çalışması *Hastane Enfeksiyonları Derg*, 2006;10:33.
14. Turner PJ. MYSTIC Europa 2007:activity of meropenem and other broad-spectrum agent nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Feb;63(2):217-22. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.11.004. Epub 2008 Dec 12.
15. Kaye KS, Schmit K, Pieper C, Sloane R, Caughlan KF, Sexton DJ, et al. The effect of increasing age on the risk of surgical site infection. *J Infect Dis* 2005 Apr 1;191(7):1056-62. Epub 2005 Feb 24..
16. Leblebicioglu H, Erben N, Rosenthal VD, Sener A, Uzun C, Senol G, et al. Surgical site infection rates in 16 cities in Turkey: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). *Am J Infect Control*. 2015 Jan;43(1):48-52. doi: 10.1016/j.ajic.2014.09.017.
17. Doğan SŞ, Paköz NE, Aral M. Laboratuvarımıza Gönderilen Yara Yeri Örneklerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotiklere Direnç Durumları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*,2010;40(4):243-9.
18. Bayram Y, Parlak M, Aypak C, Bayram İ. Three-year Review of Bacteriological Profile and Antibiogram of Burn Wound Isolates in Van, Turkey. *Int J Med Sci* 2013;10(1):19-23.
19. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/pages/index.aspx (Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014, The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 30 Aralık 2015).
20. <http://uhes.saglik.gov.tr/Login/Login.aspx?ReturnUrl=%2f> (29 Aralık 2015).
21. Korkmaz P, Çağlan FÇ, Aykın N, Alpay Y, Güldüren HM, Bilgili H, et al. Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Acinetobacter Baumannii* Suşlarında antibiyotik Direnci. *J Clin Anal Med*, Doi:10.4328/JCAM.3156.
22. Kirişçi Ö, Özkaya E, Çalışkan A, Özden S, Alkış Koçtürk S. Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* türlerinde direnç profilinin incelenmesi. *ANKEM Derg*, 2013;27(3):140-6.
23. Gözütok F, Mutlu Sarıgül F, Çelik İ, Berk E, Aydın B, Güzel D. Hastane enfeksiyonu etkeni *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal direnç oranlarının araştırılması. *ANKEM Derg*, 2013;27(1):7-12.

Bir hastane yemekhanesinde yaşanan gıda zehirlenmesinin incelenmesi

Investigation of food poisoning in a hospital cafeteria

Özlem TERZİ¹, Şule ÖZDEMİR¹, Mustafa Yasin SELÇUK²

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada bir hastane yemekhanesinde verilen öğle yemeği sonrası ortaya çıkan gıda zehirlenmesi salgınının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışma salgın inceleme basamakları takip edilerek retrospektif bir kohort araştırması olarak yapıldı. Çalışmada 08/08/2017 tarihli gıda zehirlenmesi hakkında veri toplamak amacıyla 18 soruluk bir anket hazırlandı. Gıda hazırlanması ve sunulması aşamasında besin zehirlenmesine yol açabilecek faktörler göz önüne alınarak çalışanların portörlük incelemeleri ve mutfak ortamından sürüntü örneklerinin mikrobiyolojik analizleri yapıldı. Ayrıca, resmi kurumlara gerekli bildirimlerin yapıldığı, gıda örneklerinin ve gıda yıkama-hazırlama için kullanılan su örneklerinin alındığı belirlendi. Anket sonuçlarına göre risk faktörlerinin değerlendirilmesi için Binary Lojistik Regresyon analizi yapıldı. Rölatif Risk (RR) %95 güven aralığında $p < 0,05$ ise istatistiksel anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Söz konusu tarihte hastanede bulunan personel, intörn ve refakatçi toplam 279 gönüllü kişinin anketi yanıtladığı belirlendi. Tüm katılımcıların yaş ortalaması $36,7 \pm 9,5$ yıldır ve %64,6'sı kadındır. En sık ifade edilen şikayetlerin sırasıyla ishal (%55,2), karın

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to evaluate the food poisoning outbreak after lunch given in a hospital cafeteria.

Methods: This study was conducted as a retrospective cohort study following the outbreak investigation steps. A survey of eighteen questions was designed in order to collect data on food poisoning dated 08/08/2017. Considering the factors that may lead to food poisoning during the preparation and presentation of food, microbiological analyzes of employees' portraits and swab samples from the kitchen environment were carried out. In addition, it was determined that necessary notifications were made to official institutions and also food and water samples used for food washing and preparation were taken. Binary Logistic Regression analysis was performed to evaluate the risk factors according to the survey results. Relative Risk (RR) was considered statistically significant when $p < 0.05$ for 95% confidence interval.

Results: A total of 279 volunteers from staff, interns and patient companions in the hospital answered the questionnaire. The average age of all participants was 36.7 ± 9.5 years and 64.6% were female. The most frequently reported complaints were diarrhea (55.2%),

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı AD., Samsun
²Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği AD., Samsun



İletişim / Corresponding Author : Özlem TERZİ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fak., Halk Sağlığı Ad. Kurupelit Kampüsü Samsun - Türkiye
Tel : +90 505 773 37 86 E-posta / E-mail : ozlem.terzi@omu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 31.10.2017
Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.60783

Terzi Ö, Özdemir Ş, Selçuk MY. Bir hastane yemekhanesinde yaşanan gıda zehirlenmesinin incelenmesi.
Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(3): 277-286

ağrısı (%54,8) ve bulantı (%43,0) olduğu belirlendi. İshal şikayeti olan toplam 153 kişinin %79'unda sulu ishal olduğu tespit edildi. İlk şikayetlerin başlama süresine göre ortalama inkübasyon süresi (İS): $8,7 \pm 3,4$ saattir. Çizilen salgın eğrisinin tek bir tepe noktasının olması bu salgının tek kaynaklı bir salgın olduğunu göstermekteydi. Şikayetlerinin varlığı ve sayısı dikkate alınarak yapılan değerlendirmede katılımcılardan 171 kişinin (%61,3) "vaka" ve 108 kişinin ise (%38,7) "sağlam" olduğu belirlendi. Vaka ve sağlam olarak belirlenenlerin tükettikleri yemeklere göre yapılan regresyon analizinde "fırında tavuk" için $RR=20,9$ ($p=0,004$) ve "salata" için $RR=2,2$ ($p=0,019$) olarak hesaplanırken, besinler için hesaplanan atak hızları ise %5,8 ile 66,6 arasında değişiyordu. Yapılan mikrobiyolojik analizlerde ise gıda yıkama ve hazırlama suyunda üreme olmadığı, alınan gıda örneklerinden sadece salatada *Bacillus cereus* üremesi olduğu, yemekhane çalışanlarının portörlük incelemesi sonuçlarının normal olduğu tespit edildi. Yemekhaneden alınan çevre örneklerinden ekmekek doğrama tahtası, robot açma düğmesi ve fırın açma koluna ait örneklerde de *B. cereus* üremesi olduğu belirlendi.

Sonuç: Yapılan değerlendirmeler sonucunda salgın etkeninin *B. cereus* olduğu belirlendi. Muhtemel bulaş yolunun salata yapımında kullanılan çiğ sebzelerin yeterince yıkanmaması veya mutfaktaki gıda hazırlama alanlarının ve/veya malzemelerin yeterli düzeyde temizlenmemesi nedeniyle kontamine olan salatanın tüketimi olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: salgın incelemesi, gıda zehirlenmesi, *Bacillus cereus*

abdominal pain (54.8%) and nausea (43.0%). It was determined that 79% of the total 153 people complaining of diarrhea had watery diarrhea. The mean duration of incubation according to the onset of first complaints was 8.7 ± 3.4 hours. There was only one peak of the outbreak epidemic, and it showed that this epidemic was a single-source epidemic. The 171 (61.3%) participant were determined as "case" and 108 (38.7%) participant were determined as "healthy" in the evaluation based on the presence and number of their complaints. In the regression analysis according to the foods consumed by the case and the healthy ones, $RR=20.9$ ($p=0.004$) for the "chicken in the oven" and $RR=2.2$ ($p=0.019$) for the "salad". While the attack rates calculated for food ranged from 5.8 to 66.6%. In the microbiological analyzes made, it was determined that there was no reproduction in the food washing and preparation water, only the salads were *Bacillus cereus* urea among the food samples taken, and the results of the portraits of the cafeteria workers were found to be normal. It was determined that *B. cereus* was found in the samples of taken from the hospital kitchen examples.

Conclusion: As a result of the evaluations made, it was determined that the outbreak agent was *B. cereus*. It has been concluded that the probable route of contamination is that raw vegetables used in making salads should not be washed sufficiently or that contamination has occurred through the consumption of the salad, which is contaminant, due to the fact that the food preparation areas and/or materials in the kitchen have not been sufficiently cleaned.

Key Words: epidemic investigation, food poisoning, *Bacillus cereus*

GİRİŞ

Birçok gıda, mikroorganizmaların üremeleri için uygun bir ortam oluşturmakta olup üretimden tüketime kadar olan tüm aşamalarda çeşitli kaynaklardan mikroorganizmalar gıdalara bulaşabilmektedir. Kontamine olmuş gıda ve/veya suyun tüketilmesi sonucu ortaya çıkan hastalıklara genel olarak "gıda kaynaklı enfeksiyon hastalıkları"

denmektedir (1). Gelişen gıda kaynaklı hastalıkların şiddeti, hafif bir karın ağrısından, zehirlenmelere ve ölümlere kadar değişen geniş bir spektrum şeklinde görülebilir (2-4). Yapılan çalışmalarda gıda kaynaklı enfeksiyonlardan sorumlu 27 temel patojen olduğu bildirilmektedir. Bunların içinde en önemlileri *Campylobacter*, *Salmonella spp*, *Clostridium* türleri,

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus* ve *Listeria monocytogenes* olup, bu patojenler gıda kaynaklı enfeksiyonların toplam tahmini sayısının sadece %19'unu oluşturmaktadır (5, 6).

Gıdalarda üreyen mikroorganizmaların salgıladığı toksinlere bağlı olarak ortaya çıkan durumlara ise “gıda zehirlenmeleri” denmektedir (7). Gıda zehirlenmeleri ülkeden ülkeye, yöreden yöreye büyük değişiklikler göstermekle birlikte, özellikle yaz aylarında enfeksiyon hastalıkları polikliniklerine başvuran hastaların büyük bir kısmını oluştururlar. Ancak çoğu zaman önemsenmediği için bildirim yapılmamakta ve bu nedenle toplumdaki gerçek insidansı bilinmemektedir (8). Oysa gıda zehirlenmeleri birçok ülkenin önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (9, 10). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) raporlarına göre, gıda kaynaklı hastalıklardan dolayı her yıl yaklaşık altı Amerikalıdan birinin (48 milyon kişi) hastalandığı, 128.000 kişinin hastaneye kaldırıldığı, 3.000 kişinin ise öldüğü bildirilmektedir. Yine aynı kaynaklarda 2011 yılı tahminlerine göre gıda kaynaklı hastalıkların, Birleşik Devletler’de en sık görülen hastalıklar olduğu ifade edilmektedir (11). Ülkemizde gıda zehirlenmesine ait yeterli veri olmamakla birlikte yapılan farklı çalışmalarda zehirlenme vakalarının % 2-21’inin gıda zehirlenmesi şeklinde olduğu belirtilmektedir (12-14).

Gıda zehirlenmesi tek bir kişiyi veya aynı kontamine yiyecekte yemiş bir grup insanı etkileyebilir (2, 3). Aynı yemekleri yiyen ya da suyu içen iki ya da daha çok sayıda kişide bulantı, kusma, ishal, nörolojik semptomlar ve barsak dışı başka belirtiler ortaya çıktığında gıda kaynaklı bir salgın olduğu düşünülmelidir (15-17).

Gıda kaynaklı hastalıkların oluşumunda en önemli etkenin, gıdaların hijyenik olmayan koşullarda hazırlanması ve muhafaza edilme aşamasında yapılan hatalar olduğu bilinmektedir (18). Özellikle toplu tüketime sunulan gıdalar için hazırlama, nakledilme, depolama ve servis edilme aşamalarında çeşitli riskler bulunmakta ve dikkat edilemediği durumlarda

gıdalarda kontaminasyona neden olmaktadır (19). Bu çalışmada bir hastane yemekhanesinde verilen öğle yemeği sonrası ortaya çıkan gıda zehirlenmesi salgınının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma salgın inceleme basamakları takip edilerek retrospektif bir kohort araştırması olarak yapıldı. Başhekimlik ve Dekanlık tarafından acilen bir inceleme komisyonu oluşturuldu ve komisyon kararına istinaden bu çalışmadaki araştırmacılar tarafından bir anket yapılması planlandı. Salgının nedenlerine yönelik bir çalışma olması nedeniyle kurum izinleri dışında ayrıca etik kurul onayı alınmasına gerek görülmedi. Çalışmaya 08/08/2017 tarihinde hastanede olan personel, intörn ve refakatçilerin dahil edilmesi kararlaştırıldı. Yemeklerin özel bir yemek şirketi tarafından hastane mutfağı kullanılarak gün içinde hazırlandığı ve aynı gün içinde öğle ve akşam yemeği olarak servis edildiği belirlendi. Gıda hazırlanması ve sunulması aşamasında besin zehirlenmesine yol açabilecek faktörler göz önüne alınarak çalışanların portör incelemeleri ve mutfak ortamından sürüntü örneklerinin mikrobiyolojik analizleri yapıldı. Ayrıca resmi kurumlara gerekli bildirimlerin yapıldığı, gıda örneklerinin ve gıda yıkama-hazırlama için kullanılan su örneklerinin alındığı ve yemekhanede kullanılan içme sularının 200 ml’lik ambalajlı su olduğu belirlendi.

Çalışmada 08/08/2017 tarihli gıda zehirlenmesinin kimleri etkilediği, hangi şikayetlere sebep olduğu, şikayetlerin başlama zamanı, söz konusu gün ortak olarak tüketilen gıdalar ve olayın gidişatı hakkında veri toplamak amacıyla bir anket hazırlandı. Anket formu sosyo-demografik özellikler, şikâyetler, tüketilen gıdalara ilişkin 18 sorudan oluşturuldu. Söz konusu salgın için literatür verileri dikkate alınarak “vaka” ve “sağlam” tanımları belirlendi (20). Olası vaka “08/08/2017 tarihinde hastanede öğle yemeği yiyenlerden, 08-09/08/2017 tarihlerinde ishal şikayeti olanlar veya bulantı, kusma, karın ağrısı, ateş ve halsizlik vb. şikâyetlerinden en az ikisi olan kişiler”

olarak tanımlandı. İshal veya diğer şikayetlerin en az ikisi yok ise “sağlam” olarak değerlendirilmesine karar verildi. Hazırlanan anketler 10/08/2017 tarihinde, hastanede görevli personele ve refakatçilere ön bilgilendirilme yapılarak dağıtıldı. Söz konusu tarihte hastanede bulunan personel, intörn ve refakatçı toplam 279 gönüllü kişinin anketi yanıtladığı belirlendi. Yapılan anketlerin sonuçları bilgisayar ortamında SPSS programına aktarılarak, istatistiksel analizleri yapıldı. Veriler değerlendirilirken sürekli değişkenler ortalama± standart sapma ve ortanca (en küçük-en büyük) ile, frekans veriler ise yüzde (%) ile ifade edildi. Gıda zehirlenmesi için risk faktörlerinin değerlendirilmesinde Binary Lojistik Regresyon analizi yapıldı ve bulunan Rölatif Risk (RR) %95 güven aralığında $p < 0,05$ ise istatistiksel anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Ankete katılanlardan beş kişi refakatçı ve iki kişi hasta iken, diğer 272 kişi ise hastanede görevli kişilerdi. Tüm katılımcıların yaş ortalaması $36,7 \pm 9,5$ yılı ve %

64,6’sı kadındı. Katılımcılardan 08/08/2017 tarihinde hastane yemekhanesinden öğle yemeğini yiyenlerin oranı %91,8’idi. En sık yemek yedikleri saatlerin dağılımı sırasıyla saat 12:00- 12:30 arası (%61,6) ve saat 12:30-13:00 arası (%16,1) olarak belirlendi.

Katılımcıların ilk şikayetlerinin başlama süresi dikkate alınarak hesaplanan ortalama inkübasyon süresi (İS): $8,7 \pm 3,4$ saat ve ortanca İS: 8 (Min:2- Maks:22) saattir. Çizilen salgın eğrisinde şikayetlerin ilk olarak 08/08/2017 tarihinde saat 15:00 itibariyle başladığı ve eğrinin saat 18:00-20:00 arası pik yaptığı ve daha sonra ki saatlerde ise azalarak devam ettiği gözlemlendi. Salgın eğrisinin tek bir tepe noktasının olması bu salgının tek kaynaklı bir salgın olduğunu göstermekteydi (Şekil 1. Salgın Eğrisi).

Şikayetlerinin dağılımları incelendiğinde %55,2’sinde ishal, %54,8’inde karın ağrısı, %43,0’ünde bulantı, % 17,6’sında ateş, %15,8’inde kusma ve %12,9’unda diğer (halsizlik, terleme vb) şikayetlerin olduğu tespit edildi (Birden çok şikayet bildirenler vardı). Şikayetlerinin varlığı ve sayısı dikkate



Şekil 1. İlk şikayetin başlama saatlerine göre 08/08/2017 tarihli salgın vakalarının dağılımı (salgın eğrisi)

alınarak yapılan değerlendirmede katılımcılardan 171 kişinin (%61,3) “vaka” ve 108 kişinin ise (%38,7) “sağlam” olduğu belirlendi. Buna göre vakaların yaş ortalaması $36,5 \pm 10,0$ yılı ve %64,2’si kadındı. Sağlamların ise yaş ortalaması $36,8 \pm 8,9$ yılı ve %59’u kadındı. Vakalar ve sağlamlar arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel anlamlı fark yoktu ($p > 0,05$). Vakaların %99,4’ünün “fırında tavuk”, %81,8’inin “bulgur pilavı”, %86,8’inin “salata” ve %69,8’inin “tarhana çorbası” tükettiği belirlendi (Şekil 2).

İshal şikayeti olan toplam 153 kişinin %79’unda sulu ishal, %12’sinde sarı-yeşil renkli ishal, %8’inde mukuslu ishal ve %1’inde kanlı ishal olduğu ve günde ortalama $5,8 \pm 3,4$ kez (min:1-maks:20) ishal oldukları tespit edildi.

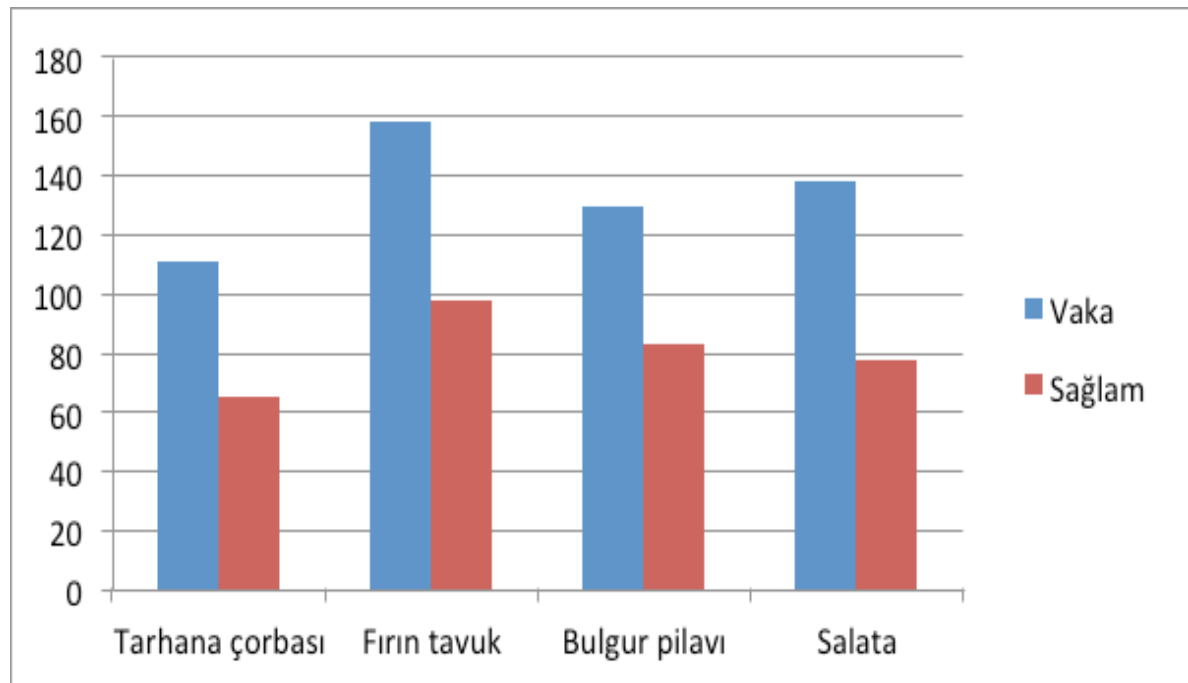
Vakaların %47,2’sinin şikâyetlerinden dolayı herhangi bir sağlık kuruluşuna başvurmadığı, %39,6’sının ise Fakülte acil servisine başvurdukları ifade edildi. Vakalardan %25,8’inin aynı gün içinde yatarak tedavi gördüğü, %7,5’inin (12 kişi) ise sağlık raporu/izin aldıkları belirlendi.

Araştırmaya katılanlardan vaka ve sağlam olarak

belirlenenlerin söz konusu tarihte tükettikleri yemeklere göre yapılan regresyon analizinde “fırında tavuk” tüketenlerde vaka olma olasılığı tüketmeyenlere göre 20,9 kat daha yüksekti ve bu olasılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,004$). Benzer şekilde “salata” tüketiminde ise risk 2,2 kat bulunmuştu ($p=0,019$). Tüketim durumuna göre besinler için hesaplanan atak hızları ise %5,8 ile 66,6 arasında değişiyordu (Tablo 1).

Salgın incelemesinde yapılan istatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde 08/08/2017 tarihinde meydana gelen besin zehirlenmesi olayının aynı gün hastanenin öğle yemeği menüsünde bulunan “fırında tavuk” ve “salata” tüketiminden kaynaklanabileceği düşünüldü.

Konuyla ilgili yapılan diğer incelemelerde 15/08/2017 tarihli Samsun Halk Sağlığı Laboratuvarı analiz sonuçlarına göre gıda yıkama ve hazırlama suyunda herhangi bir kimyasal ve/veya mikrobiyolojik anormallik olmadığı, 14/08/2017 tarihli Samsun Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü’nün analiz rapor sonuçlarına göre ise salatada *Bacillus cereus* üremesi



Şekil 2. Katılımcıların 08/08/2017 tarihi öğle yemeğinde tükettiği gıdalara göre dağılımları

Tablo 1. Katılımcıların tükettikleri besinlere göre dağılımları, besinler için atak hızları ve risk analizleri

Yemek Türü	Tüketen (n)			Tüketmeyen (n)			Risk analizi sonuçları		
	Vaka	Sağlam	Atak hızı(%)	Vaka	Sağlam	Atak hızı(%)	OR	%95GA	p
Tarhana çorbası	138	70	66,3	33	38	53,5	1,4	0,8-2,5	0,180
Fırında tavuk	170	92	64,8	1	16	5,8	20,9	2,6-164,5	0,004*
Bulgur pilavı	155	88	63,7	16	20	44,4	0,9	0,4-1,8	0,840
Salata	160	80	66,6	11	28	28,2	2,2	1,1-4,2	0,019*

Tablo 2. Tüketilen gıdalardan alınan örneklerin mikrobiyolojik analiz sonuçları

Değerlendirilen parametreler				
	Tarhana çorbası	Fırın tavuk	Bulgur pilavı	Salata
<i>Salmonella spp</i>	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	-	-
Koagülaz (+) Stafilokok	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O157	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	4,3x10 ³ kob/g
Sülfid indirgeyen Anaerob	-	-	-	<10
<i>Termo. Camplobacter spp.</i>	-	-	-	-
Değerlendirme sonucu	Uygun	Uygun	Uygun	Uygun değil

olurken diğer gıdalarda mikrobiyolojik üreme olmadığı belirlendi (Tablo 2). Yemekhane çalışanlarına yönelik yapılan portörlük incelemesi sonuçlarında ise herhangi bir anormalliğe rastlanmadı. Yemekhaneden alınan çevre tarama örneklerinden ekmekek doğrama tahtası, robot açma düğmesi, fırın açma koluna ait örneklerde de *Bacillus cereus* üremesi olduğu belirlendi.

Eldede edilen laboratuvar bulguları çalışmadaki

logistik regresyon analizleri ile karşılaştırıldığında fırında tavuk için OR= 20,9 (%95 GA:2,6-164,5 p=0,004) olmasına rağmen alınan gıda örneğinde herhangi bir mikrobiyolojik üreme saptanmadığı bununla birlikte OR=2,2 (%95 GA:1,1-4,2 p=0,019) olarak belirlenen salatadan alınan örnekte ve *Bacillus cereus* üremesi olduğu belirlendi.

TARTIŞMA

Ülkemizde gıda kaynaklı salgınlar genellikle okul, hastane, otel, yurt, düğün organizasyonu gibi ortak gıda tüketiminin olduğu ve çok sayıda yemek hazırlanan yerlerde görülmekte olup en sık yaz aylarında rastlanmaktadır (21). Bu çalışmada incelenen salgında Ağustos ayında, ortalama sıcaklığın 30 °C ölçüldüğü günlerde ve kalabalık yemek tüketiminin olduğu bir hastane yemekhanesinde gerçekleşmiştir.

Salgında ilk şikayetlerin yemekten yaklaşık 2 saat sonra başladığı ve ortalama İS=8,7±3,4 saat olduğu belirlenmiştir. En sık şikayetlerin ishal ve karın ağrısı olduğu ve ishal sulu ishalin ön planda olduğu (%79) dikkate alınarak, literatür bilgisi değerlendirildiğinde, gıda zehirlenmesinden özellikle *S. aureus* veya *B. cereus* gibi etkenlerin sorumlu olabileceği kanaati oluşmuştur (22).

Çalışmada tüketilen gıdalardan fırında tavuk ve salatanın RR değeri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunurken bu bulguyla çelişkili olarak tüm gıdalar için atak hızları, tüketicilerde birbirine yakın olarak belirlenmiştir (%63,7 ile %66,6 arasında). Bu durum katılımcıların aynı anda birden çok türde gıdayı tüketmelerinden, fırında tavuk ve salata tüketim sıklığının diğerlerinden yüksek olmasından ve tüketilen gıda miktarlarının farklı olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca atak hızlarında salgına yol açan etkene karşı bağışıklık düzeylerinin kişiden kişiye farklılık göstermesi, etkenin gıdada üreme potansiyeli ve miktarı gibi pek çok faktöründe etkisinin olabileceği ifade edilmektedir (23).

Salgına neden olduğu düşünülen gıdalardan alınan örneklerinin kültür sonuçlarına göre; salata da *Basillus cereus* üremesi ve yine mutfak yüzey alanlarında aynı etkenin izole edilmesinin yanı sıra, klinik tablonun ve inkübasyon süresinin de uyumlu değerlendirilmesi sonucu bu salgının kesin etkeninin *B. cereus* olduğu kanaatine varılmıştır. *B. cereus* ortalama 28-35 °C (en düşük 4 °C, en yüksek 48 °C)'de üreyebilen ve enterotoksini ile gıda zehirlenmelerine yol açan bir bakteri olup en sık et, pirinç, süt, peynir,

puding, pasta, sebze, balık ve makarna gibi riskli gıdalarla bulaşır. Genellikle diyareik ve emetik olmak üzere iki tip gıda zehirlenmesine neden olur. Emetik tip mide bulantısı ve kusmayla karakterizedir ve inkübasyon süresi 1-5 saattir. Bu tipin klinik belirtileri en çok *Staphylococcus aureus*'un yol açtığı gıda zehirlenmeleriyle karıştırılmaktadır. Diyareik tipte ise karın ağrısı, bol sulu diyare, bazen mide bulantısı ve kusma görülmektedir, inkübasyon süresi 8-16 saattir ve *Clostridium perfringens*'in oluşturduğu hastalık tablosuyla karışmaktadır. *B. cereus* kaynaklı hastalıkların çoğu kendiliğinden geçen, kısa süreli ve hafif-orta şiddette semptomlarla seyretse de nadiren ölümlerle sonuçlanabilmektedir (23-25). Ülkemizde de *B. cereus*'a bağlı bir gıda zehirlenmesi salgınında ölüm vakası bildirimi yapılmıştır (26). *B. cereus* toprak kökenli bir etken olması nedeniyle çiğ sebze ve meyvelerde sıklıkla rastlanılmaktadır (27). Ülkemizde yapılan bir çalışmada zehirlenme veya uygunsuzluk şikayet nedeniyle mikrobiyolojik analizi yapılan 79 adet tüketime hazır yemek ürününün 18'inde uygunsuz mikrobiyolojik parametrelerin olduğu ve bu gıdalardan 12 sinde ise *B. cereus* ürediği tespit edilirken bu gıdaların sıklık sırasının et ve sebze yemekleri, makarna, pilav ve meze olduğu belirtilmiştir (28).

Bu çalışmada salgının bulaş yolu kesin olarak belirlenememekle birlikte; salata yapımında kullanılan çiğ sebzelerin yeterince yıkanmaması veya mutfaktaki gıda hazırlama alanlarının ve/veya malzemelerin yeterli düzeyde temizlenmemesi nedeniyle kontamine olan salatanın tüketimi yoluyla bulaşın olduğu öngörülmüştür. Dünya genelinde çiğ sebze ve meyvelere bağlı çok sayıda salgın bildirilmiştir. Dewart ve ark'nın çalışmasında 1990-2005 yılları arasında ABD'de yeşillik bazlı salatalardan kaynaklanan yaklaşık 200'ün üstünde salgın olduğu belirtilmektedir (29). Genel olarak hayvansal gıdalara kıyasla çiğ sebzelerde daha az patojen mikroorganizmaya rastlanılsa da, çiğ tüketilen sebzelere uygulanan kesme, doğrama, parçalama gibi işlemlerin sonucunda, bu gibi ürünlerin mikroorganizmaların üremesine daha duyarlı hale

geldikleri de ifade edilmektedir (30). Gıdaların üretim ve işlenmesi aşamalarında kullanılan kesme tahtaları, dilimleyici, karıştırıcı ve öğütücüler, işletmenin suyu, ortamın havası ile üretim koşullarında bulunmaması gereken çöpler bulaşma kaynakları olarak karşımıza çıkabilmektedir (9). Demirdal ve ark. çalışmasında, benzer şekilde bir üniversite hastanesinde yaşanan salgının nedeni, gıdaların yıkandığı su tanklarının kontaminasyonu olarak ifade edilmiştir (31). Dündar ve ark.'nın bir çalışmasında da, hastane mutfaklarında ve özellikle besin hazırlama alanlarında çeşitli uygunsuzluklar tespit edilmiş olup, hastalar ve hastane çalışanları için olası sağlık risklerine dikkat çekilmiştir (32).

Bu çalışmada istatistiksel olarak risk faktörü olarak belirlenen fırın tavukta herhangi bir üreme olmaması dikkat çekici bir bulgudur. Ancak gıda kaynaklı zehirlenmelerde, etkilenen kişilerden ve şüpheli gıdalardan her zaman kültür alınmamakta veya kültür alınanların hepsinde etken izole edilememektedir. Örneğin Manisa'daki ve Diyarbakır'daki salgın araştırmalarında vakalardan ve gıdalardan alınan örneklerde herhangi bir etken üretilmemiştir (18, 33). Demirdal ve ark.'nın yaptığı salgın incelemesinde ise gıda ve su analizlerinde etken saptanamazken, bazı hastaların dışkı örneklerinde iki ayrı bakteri izole edilebilmiştir (31). Bir salgın incelemesinde mikrobiyolojik analiz sonuçları ile elde edilen diğer sonuçların tutarlılığı elbette önemlidir. Ancak etkenin her salgın durumunda tespit edilemeyeceği düşünüldüğünde, yapılan anket çalışmasından elde edilen istatistik sonuçlar, salgından sonra alınacak önlemler için yol gösterici olacaktır. Üstelik salgına yol açan etken belirlenebilmiş olsa dahi, laboratuvar sonuçları çıkana kadar yapılacak ilk müdahalelerde zaman kazanılması sağlanacaktır. Salgınlarda tanı kesinleşinceye kadar hastalara yönelik tedavi, elde

edilen ilk bulgular ışığında olası etkenlere yönelik yapılmaktadır (34).

Çalışmada sonuç olarak salgının etkeninin *B. cereus* olduğu ve hazırlanma aşamasında kontamine olmuş salatının tüketilmesiyle bulaşın gerçekleştiği kanaatine varılmıştır. Hastane yemekhanesinde tüketime sunulmadan önce, salatının çok miktarda ve önceden hazırlandığı, uygun koşullarda saklanmadığı ve hava sıcaklığının yüksek olması nedeniyle ortamdaki salata malzemelerine bulaşan *B.cereus*'un saldırdığı toksinlere bağlı salgının ortaya çıkması olasılığının yüksek olduğu düşünülmektedir. Genel olarak *B. cereus* zehirlenmelerinin önlenmesinde, bu bakteri açısından riskli gıdaların tüketimden hemen önce ve küçük porsiyonlar halinde hazırlanması ve yeterli ısı ile işleme tabi tutulması önerilmektedir. Hemen tüketilmeyecek gıdaların ise hızla soğutulması uygun koşullarda saklanması ve tekrar ısıtma uygulanacaksa ısıtma işleminin 74°C'yi geçecek şekilde uygulanması gerektiği ifade edilmektedir (35).

Benzer salgınların tekrar yaşanmaması için; gıda sektöründe hizmet verenlerin gıda hijyeni, sanitasyonu ve saklama koşulları konularında bilinçlendirilmesi, halka açık olan ve toplu tüketim yapılan işyerlerinin, kamuya ait yemekhanelerin denetimlerinin sık yapılması, ülkemizde sık görülen düğün, cenaze vb etkinliklerde sunulan gıdaların hazırlanmasından tüketim aşamasına kadar her sürecin konu hakkında uzman kişilerce dikkatlice takip edilmesi, benzer durumların evlerde yaşanmaması için de yemek hazırlama ve saklama koşullarıyla ilgili halka yönelik eğitimlerinin verilmesi önerilmektedir. Ayrıca konuyla ilgili yapılacak her tür eğitim ve denetimde özellikle yaz aylarında hazırlama ve saklama koşullarına daha fazla hassasiyet gösterilmesi gerektiğinin vurgulanmasının olası salgınları azaltacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Küçükçetin A, Milci S. *Staphylococcus aureus* ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri. *Gıda Derg*, 2008; 33(3): 129-35.
2. Hamer DH. IDCP guidelines. Infectious diarrhea (Part II) and food poisoning. *Infect Dis Clin Pract*, 1997; 6: 141-6.
3. Fry AM, Braden CR, Griffin PM, Hughes JM. Foodborn Disease. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R et al. Principles and Practice of Infectious Diseases, Sixth ed. Philadelphia: Elsevier-Churchill Livingstone, 2005; 1286.
4. Hampikyan H, Ulusoy B, Bingöl EB, Çolak H, Akhan M. İstanbul'da tüketime sunulan bazı ızgara tipi gıdalar ile salata ve mezelerin mikrobiyolojik kalitelerinin belirlenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2008; 38 (2): 87-94.
5. Danielsson Tham ML. Staphylococcal food poisoning. *Food Associated Pathogens*. Boca Raton. CRC Press, 2013; 250-68.
6. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: An on going challenge in public health. *BioMed Res Int*, 2014; 1-9.
7. Özkaya FD, Cömert M. Gıda zehirlenmelerinde etken faktörler. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2008; 65(3): 149-158.
8. Vaillant V, Valk H, Baron E, Ancelle T, Colin P, Delmas MC et al. Foodborne infections in France. *Foodborne Pathog Dis*, 2005; 2(3): 221-32.
9. Fidan F, Ağaoğlu S. Ağrı bölgesinde bulunan lokantaların hijyenik durumu üzerine araştırmalar. *YYÜ Vet Fak Derg*, 2004; 15(1-2): 107-14.
10. Afshin J, Reza Z, Saeid S. Microbiological study of cocktail sausage during shelf life. *Middle-East J Sci Res*, 2011; 7(6): 1056.
11. Bad Bug Book. Erişim adresi : <https://www.fda.gov/downloads/food/foodborneillnesscontaminants/ucm297627.pdf> Erişim Tarihi: 30/10/2017.
12. Kalkan Ş, Tunçok Y, Güven H. İlaç ve Zehir Danışma Merkezine bildirilen olgular. *Dokuz Eylül Üniv Tıp Fak Derg*, 1998; 12: 275-83.
13. Bütün C, Beyaztaş FC, Engin A, Büyükkayhan D, Can M. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'na başvuran besin zehirlenmesi olgularının değerlendirilmesi. *Van Tıp Derg*, 2009; 16(1): 19-23.
14. Deniz T, Kandış H, Saygun M, Büyükoçak Ü, Ülger H, Karakuş A. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Servisine başvuran zehirlenme olgularının analizi. *Düzce Tıp Fak Derg*, 2009; 11(2): 15-20.
15. Şimşek F. Besin Zehirlenmeleri. *Toksikoloji Derg*, 2005; 3(1): 3-9.
16. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Botulism from home-canned bamboo shoots--Nan Province, Thailand, March 2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2006; 55(14): 389-92.
17. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Multiple outbreaks of gastrointestinal illness among school children associated with consumption of flour tortillas--Massachusetts, 2003-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2006; 55(1): 8-11.
18. Dorman V, Aslan S, Ceylan A, Nacar Küçük S, Günel A, Sarı H ve ark. Aynı fabrikadan yemek alan iki inşaat firması işçilerinde meydana gelen toplu besin zehirlenmesi. *Dicle Tıp Derg*, 2010; 37 (3): 248-53.
19. Uçak G. İstanbul'da tüketime sunulan hazır sebze salatalarının mikrobiyal güvenliğin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014.
20. Tutuş C, Börekçi D, Parcıklı G, Temel F, Sucaklı MB. 2013 yılında Muğla ili Marmaris ilçesinde görülen *Staphylococcus aureus* enterotoksin kaynaklı gıda zehirlenmesinin değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2016; 73(2) 131-138.
21. Heymann DL. Control of Communicable Diseases Manual. 19th ed. Washington: American Public Health Association, 2008; 239-250.

22. Kartal, ED. Gıda Kaynaklı İnfeksiyonlar. I. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu Kitabı, 14-15 Kasım 2006, Ankara: 187-193.
23. Demirbilek Y, Öztürk H, Şenol M, Özçelik R, Çoban SÇ, Temel F ve ark. Düğün yemeği sonrası besin zehirlenmesi; Afyonkarahisar, Çayırbağ Beldesi, 2014. TAF Preventive Medicine Bulletin, 2016; 15(1) :38-43.
24. İncili GK, Dikici A, Çaloğlu M. Bacillus Cereus . Türkiye Klinikleri Journal of Food Hygiene and Technology-Special Topics, 2015; 1(3): 87-91.
25. Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, Meyfroidt G, Devlieger H, Meulemans A et al. Fatal family outbreak of Bacillus cereus-associated food poisoning. Journal of clinical microbiology, 2005; 43(8): 4277-4279.
26. Kalkan O, Gulay M, Zhu BP, Temel F, Sucaklı B, Torunoglu MA. Outbreak of Bacillus cereus Food-Poisoning with a Fatality After a Feast Bagli Village, Bursa Province, Turkey, September 2012. <http://www.cdc.gov/eis/downloads/2013-EIS-Conference.pdf> Erişim tarihi: 30/10/2017.
27. Logan NA, Bacillus and relatives in foodborne illness. Journal of Applied Microbiology, 2012; 112(3): 417-429
28. Şenses Ş, Sarı H, Ertaş S, Berberoğlu U, Cesaretli Y, İrmak H. Tüketime sunulan çeşitli hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 199-208.
29. Dewall CS, Bhuiya F (2007). Outbreaks By The Numbers: Fruits and Vegetables. Center For Science In The Public Interest Washington, Dc 20009, <http://www.cspinet.org/foodsafety/IAFPPoster.pdf> Erişim tarihi: 30/10/2017.
30. Şengün Yİ, Karapınar M. Inactivation of Salmonella typhimurium inoculated on some vegetables by using lemon juice and vinegar. Gıda Dergisi, 2006; 31(3): 161-167.
31. Demirdal T, Demirtürk N, Aktepe OC. Bir Üniversitede saptanan besin zehirlenmesinin incelenmesi. Trakya Univ Tıp Fak Derg, 2007; 24(3): 205-208.
32. Dündar C, Elmacıoğlu F, Topbaş M, Pekşen Y. Samsun il merkezindeki hastane mutfaklarının hijyen durumunun değerlendirilmesi. Türk Hij Den Biol Derg, 2000; 57(1): 1-6.
33. Zubaroğlu AH, Boz A, Topal S, Temel F, Sucaklı MB, Levent B ve ark. Manisa'da aynı yemek şirketinden yemek alan farklı işletmelerde meydana gelen stafilocok kaynaklı besin zehirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3) :209-218.
34. Günay O. Bulaşıcı hastalık salgınlarının incelenmesi. In: Halk Sağlığı Genel Bilgiler ed: Öztürk Y, Günay O. Önder Ofset, 2011, Kayseri: 895-898.
35. Özkan M. Tüketime sunulan günlük hazır yemekler ve salataların mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.

Psychoda albipennis'e bağlı tekrarlayan üriner miyazis

Recurrent urinary myiasis caused by *Psychoda albipennis*

Çiğdem TORUN-EDİS¹, Özlem EROL¹, Aycan GAZYAĞCI², Mehmet KAVAK³

ÖZET

Miyazis canlı insan ve vertebralı hayvanların, çeşitli sinek türlerinin larvaları tarafından istilası olarak tanımlanır. Tropikal ve subtropikal ülkelerde insanlarda miyazise neden olduğu bilinen sineklerin 50'den fazla tipi vardır. Miyazis, kötü hijyen ve sağlık koşulları, hareketsizlik ve ülsere lezyonlarla ilişkilidir. İnsanlarda genitoüriner sistemi çok nadiren tutar ve alışılmadık semptomlar oluşur. Bu olguda, insanlarda tipik olarak ürogenital miyazise neden olmayan Diptera takımına ait *Psychoda albipennis*'in etken olduğu tekrarlayan üriner miyazisli bir hasta sunulmuştur. Sosyoekonomik seviyesi yüksek, şehirde apartmanda yaşayan 29 yaşındaki kadın hasta tekrarlayan, idrarda gri-krem renkli canlı kurtçuk düşürme şikayeti ile polikliniğimize başvurdu. Hastanın şikayetinin ilk iki periyodu 15-20'şer gün devam edip geçmiş; 10 gün önce başlayan son periyot ise azalarak halen devam ediyordu. Bu periyotlarda hastada karın ağrısı, pelvik ağrı, karında şişkinlik, sık idrara çıkma, idrar yapmada zorlanma şikayetleri de mevcuttu. Hastanın laboratuvar tetkikleri normal değerlerde idi. Ürolojik ve genital muayenelerinde de özellik saptanmadı. İdrardan toplanan canlı larvalar araştırılmak üzere Veteriner Fakültesi'ne yollandı ve *Psychoda albipennis* 4. dönem larvası olduğu teyit edildi. Hasta bir hafta üriner antiseptik ve antibiyotik kullanımı ile hijyen önerilerinin uygulanmasından

ABSTRACT

Myiasis is defined as the infestation of live human and vertebrate animals by larvae of varied species. There are more than 50 types of fly known to cause myiasis in humans in the tropical and subtropical countries. Myiasis is usually associated with poor health and hygiene, inactivity and ulcerating lesions. Human cases involving the genitourinary system are very rare and present with unusual symptoms. In this case, a patient is presented with recurring urinary myiasis caused by *Psychoda albipennis* from the Diptera order, which typically does not cause urogenital myiasis in humans. 29-year old woman with high socioeconomic status, living in an apartment in the city center was admitted to our hospital with repeated complaints of live maggots in the urine. The first two periods of gray, creamy-colored grubs live in patient's urine lasted for 15-20 days; The third period started 10 days before resorting to the hospital and still continues slowly decreasing in intensity. In these periods, the patient had abdominal pain, pelvic pain, abdominal bloating, frequent urination and urinary difficulties. The patient's laboratory tests were within normal values. Urologic and genital examination did not show any detectable features. The live larvae collected from urine samples were sent to investigate Veterinary Medicine. It was identified as the fourth stage of the moth fly *Psychoda albipennis*. The patient completely recovered after one week of urinary tract antiseptic, antibiotic usage and implementation of hygiene recommendations. No risk factor was identified in

¹Yüksek İhtisas Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, Kırıkkale

¹Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kırıkkale

¹Yüksek İhtisas Hastanesi, Mikrobiyoloji Kliniği, Kırıkkale



İletişim / Corresponding Author : Çiğdem TORUN-EDİS

Yüksek İhtisas Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği 71000 Kırıkkale - Türkiye

Tel : +90 532 631 70 41

E-posta / E-mail : hator71@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 07.09.2016

Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.59455

Torun-Edis Ç, Erol Ö, Gazyağcı A, Kavak M. *Psychoda albipennis*'e bağlı tekrarlayan üriner miyazis. Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(3): 287-290

sonra tamamen iyileşti. Sosyoekonomik ve hijyen koşulları yüksek olan hastada başka risk faktörü tespit edilemedi. Tekrarlayan miyazis için hasta ayrıntılı olarak sorgulandı. Hastanın banyosuna, apartman boşluğuna açılan havalandırma penceresinden devamlı küçük sineklerin geldiği öğrenildi. Hastaya banyo, tuvalet ve ortam dezenfeksiyonu anlatıldı. Bunların yapılmasını takiben hastanın şikayetleri tamamen kayboldu. Altı aylık takiplerinde de miyazis enfestasyonu tekrar izlenmedi. Sanıldığından ve kliniklerde karşılaşıldan daha fazla vaka olduğunu düşündüğümüz ürogenital miyazis konusunda toplum ve klinisyen bilincinin artırılmasına dikkat çekmek amacıyla sunulmuş bir olgudur.

Anahtar Kelimeler: *Psychoda albipennis*, miyazis, ürogenital miyazis

the patient who had proper hygienic conditions, was living in urban area and was of high socioeconomic status. The patient was questioned in detail for recurrent myiasis. It was learned that the continuous existence of small flies in the patient's bathroom. Flies were found to come from the opening of the apartment space ventilation. Disinfection of toilet, bathroom and environment was described in detail to the patient. After that the patient's complaints were completely disappeared. Myiasis infestation in our patient 6 months of follow-up was not seen again. It is thought that there are more cases than encountered in clinical urogenital myiasis; this case is presented to increase awareness of the public and the clinicians and to draw attention to the phenomenon.

Key Words: *Psychoda albipennis*, myiasis, urogenital myiasis

GİRİŞ

Hope tarafından 1840'da kullanılan miyazis terimi, Diptera takımındaki bazı sineklerin yumurta ve larvalarının canlı doku ve organlarda yerleşerek patolojik lezyonlar oluşturmasıdır. Yunanca'da myia sinek anlamında olduğundan sinek hastalığı da denilebilmektedir (1-4).

Miyazis etkenleri Artropoda şubesi Diptera takımında bulunurlar. Diptera takımından 50'den fazla sinek türü tropikal ve subtropikal ülkelerde insanlarda miyazis oluşturabilir. Diptera takımının Nematocera ve Brachycera alt takımlarından genellikle Brachycera alt takımının Cyclorhapha alt dizisindeki türler insanlarda miyazise neden olsa da Nematocera'ların bazı alt türleri de rastlantısal veya fakültatif miyazis etkeni olabilirler. İnsanlarda genitoüriner sistem çok nadiren tutulur ve alışılmadık semptomlar görülebilir. Ürogenital sistemde zorunlu parazit olan iki kanatlılar yoktur. *Ephydriidae*, *Fanniidae*, *Muscidae*, *Phoridae*, *Psychodidae*, *Sarcophagidae*, *Syrphidae*, *Scenopinidae* gibi türlerin hepsi gündelik (fakültatif) işgalcilerdir (1,4-6).

Miyazis üç başlıkta sınıflandırılır. 1- Larvaların yerleşim yerlerine göre: Kutanöz, subkutanöz ve kaviter, 2- Klinik yerleşime göre: Kutanöz, eksternal,

travmatik, furunkular, oftalmik, aural, kavikol, gastrikol, intestinal, ürogenital ve yara, 3- Patojen ve oluşturduğu enfestasyonun çeşidine göre: Larval gelişimde konağa mutlak gereksinimi olup insanlarda nadir olan zorunlu (obligatör) tip, bir konağa ihtiyacı olmayıp yumurtalarını çürüten hayvan dokuları, yara, travmatik dokular ya da organik materyallerin üzerine bırakan fakültatif (isteğe bağlı) tip ve mutlaka konağa gereksinim duymayan sineklerin yumurtalarının vücut boşluklarına girmesi veya gıdalara bırakılan yumurtaların ağızdan alınması ile oluşan aksidental (rastlantısal/pseudomyiasis) tip. İnsanlarda sık görülmeyen ürogenital miyazisler fakültatif ve rastlantısal miyazisler içinde değerlendirilir (1, 3 - 5, 7, 8). Bu olguda *Psychoda albipennis*'in etken olduğu nadir bir ürogenital miyazis olgusu sunulmuştur.

OLGU

29 yaşındaki kadın hasta, idrar yaparken günde 2-3 defa 1-1,5 cm boyunda, yuvarlak, gri-krem renkli canlı kurtçuk düşürme şikayeti ile polikliniğimize başvurdu. Anamnezinde beş ve dokuz ay önce benzer iki dönem geçirdiği öğrenildi. Dokuz ay önce her idrara çıktığında 2-3 kurtçuk düşürdüğü ve azalarak bir hafta devam etmesi üzerine kadın doğum

polikliniğine başvurduğu; doktorun inanmayarak adını hatırlamadığı ilaçlar verdiği; kullandıktan sonra şikayetinin 15 günde azalarak kaybolduğu öğrenildi. Hasta, 3-3,5 ay sonra aynı olayın tekrarladığı ve ilaç kullanmadan 20 gün içinde azalarak kaybolduğunu ve 10 gündür şikayetlerinin tekrar başlayarak günde 1-2 kurtçuk düşürmeyle devam ettiğini belirtti. Muayenede diğer dönemlerde de olan sık idrar yapma, karın-kasık bölgesinde ağrı-şişkinlik, idrar yaparken zorlanma ve kurtçuk düşürürken kesik kesik idrar yapma şikayetleri de mevcuttu.

Hastanın getirdiği yaklaşık 0,5 cm boy ve 0,5 mm enindeki kahve/siyah renkli materyal mikrobiyoloji laboratuvarında incelendiğinde ölü-kurumuş larva olduğu görüldü. Hastadan idrar, gaitada parazit incelemesi, idrar-gaita kültürleri ile kadın doğum ve üroloji konsültasyonları istendi. Laboratuvar tetkikleri ile ürolojik/vajinal muayenelerinde özellik olmayan hastadan yalancı miyazisi ekarte etmek amacıyla idrarını şişeye yaparak getirmesi istendi. Ertesi gün getirdiği canlı kurtçuk musluk suyu içinde Veterinerlik Fakültesi'ne götürülerek *Psychoda albipennis* 4. dönem larvası olduğu kesinleştirildi (Şekil 1). Hastaya bir haftalık idrar yolları antiseptiği ve antibiyotik tedavisi verildi ve üçüncü günden itibaren şikayetleri düzeldi.

Hastanın merkezde bir apartmanın üst katlarında oturduğu; ayakta duş aldığı, alaturka tuvalet kullandığı, beklemiş taharet/duş suyu kullanmadığı ve eşinde benzer şikayetlerin olmadığı; ancak banyo/tuvalet havalandırmasından sürekli küçük sineklerin içeri geldiği, havlu/bornozlarının da sürekli banyoda asılı olduğu öğrenildi.

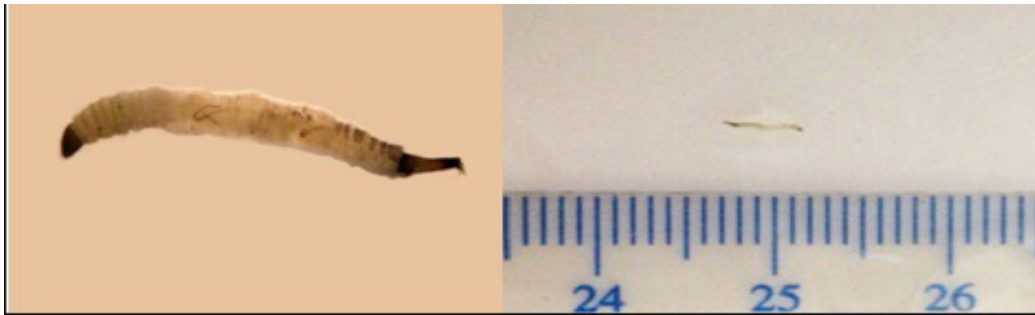
Hastaya havalandırmaları telle kapatması,

havalandırma boşluğunun ayrıntılı temizlenip sineklerin ilaçlanarak yok edilmesi ve bornoz/havlularını kaynatarak temizlemesi önerildi. Hasta bunları uyguladıktan sonra altı ay boyunca takip edildi; şikayetleri bir daha tekrarlamadı.

TARTIŞMA

Ürogenital miyazisler insanlarda nadiren görülen fakültatif veya rastlantısal miyazislerdendir. Malezya, Hindistan, Cezayir, İspanya, Brezilya ve İran gibi tropikal/subtropikal bölgelerle gelişmekte olan ülkelerde farklı sinek türleriyle; ülkemizdeyse daha çok *Eristalis tenax* ve *Lucilia sericata*'yla oluşan ürogenital miyazis olguları tanımlanmıştır (1, 3 - 5).

Diptera takımı, Psychodidae ailesinin 6 alt üyesinden Psychodinae alt ailesinden, *Psychoda albipennis* türü sineklerin Çin ve Avrupa'nın ılıman bölgelerinde ve ülkemizde de Ankara, Edirne, Tekirdağ, İstanbul ve Bursa başta olarak yaygın olduğu, intestinal/ürogenital miyazis yapabildikleri bildirilmiştir (3-5,8). Güve benzeri ergin sinekleri 1-2 mm boyutlu, sivri parlak kanatlı olup yoğun kıllarla kaplıdır. Evlerde nemli tuvalet, banyo ve klima ünitelerinde yaşarlar. Dişiler yüze yakın yumurtlayabilir ve bunları 30-40'lı yığınlar halinde bırakırlar. Larvaların sıcak, soğuk ve düşük oksijen ortamlarına toleran olmaları miyazis oluşumunu kolaylaştırır. Larvalar yassı silindirik, gri-beyaz renkli, üzeri soluk kısa tüylü veya pullu olup bazen kenarları dışıkklidir. Dört dönemde üç kez gömlek değiştirerek pupa safhasına geçerler. Hastamızda olduğu gibi enfekte insanların idrarlarında 4-10 mm boyutlarındaki dördüncü dönem larvaları görülebilir (1, 3 - 8).



Şekil 1. *Psychoda albipennis* 4. dönem larva görüntüsü

Ülkemizden de Ankara, Sakarya, Eskişehir, Kırşehir, Diyarbakır, Adana, Trabzon ve Samsun'dan *Psychoda albipennis* kaynaklı ürogenital miyazis olguları bildirilmiştir (1, 3 - 6, 9).

Psychoda albipennis'e bağlı genitoüriner enfeksiyonların genellikle kırsal bölgelerde, sosyoekonomik seviyesi düşük, sağlık ve hijyeni bozuk, hareketsiz, idrar yollarında tıkanıklık veya ülsere deri lezyonları bulunan kişilerde geliştiği bilinmektedir. Kentlerde de uzak bölgelerde biriken çöpler, durgun sular uygun yaşam alanları oluşturmaktadır. İdrar deliği etrafına bırakılan yumurtalardan larvalar 1-2 saat içinde çıkar, üretral orifisten mesaneye ulaşır; yerleşip gelişir ve idrarla atılırlar (1, 3 - 5). Hastamızda larvaların idrara sonradan karışmasıyla olan yanıtıcı miyazisi ekarte etmek amacıyla ilk larva değerlendirilmemiş, idrarı şişeye yaptırılarak düşürdüğü canlı larva değerlendirmeye alınmıştır.

Hiçbir risk faktörü bulunmayan hastamızda olduğu gibi ürogenital miyazisli bazı vakalarda yumurta veya larvanın vücuda nasıl girdiği açıklanamamaktadır (1,3-5,9). Hastamızda bornoz, musluk ucu gibi alanlara bırakılan yumurtaların üretra veya vajen girişine indirekt temasla taşınarak enfestasyona yol açmış olabileceği düşünülmüştür.

Ürogenital miyaziste semptomlar, larvaların

yerleşim yeri, türü ve sayısına bağlıdır. Kaşıntı, dizüri, pollaküri, obstrüksiyon, anüri ve bazen de hematüri gibi semptomlar görülmektedir (5). Hastamızda da üriner sistem semptomları mevcuttu.

Tedavide yara debritleme, ilgili dokuya antiseptik ve komplikasyonlara karşı antibiyotik kullanılması önerilmektedir. Ürogenital miyazis olgularında larvalar canlı veya ölü olarak kendiliğinden atılır (1, 3-5). Hastamıza larvaların atılmasını sağlamak ve komplikasyonları önlemek amacıyla üriner antiseptik ile birlikte antibiyotik tedavisi verildi.

SONUÇ

İnsanlardaki miyazis olguları nadir ve sporadik olmakla birlikte, ülkemizde ve dünyada bu tür vakaların aslında literatürlerde yayınlanan ve kliniklerde karşılaşılanlardan çok daha fazla olduğu düşünülmektedir. Gözden kaçırma nedenlerinden birisi antibiyotik kullanımı olmakla birlikte, yumurtalar bitene kadar larva atılımı sürdüğünden hastaların birçoğu sağlık kuruluşlarına başvurmadan bu süreci evde tamamlamaktadır. Dünyada ve ülkemizde miyazisi önlemenin başlıca yolu sinek ve larva mücadelesiyle birlikte toplumun bilinçlendirilmesi yanında kişisel ve toplumsal hijyen kurallarına uyulmasına dayanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Özdemir M, Bahadır MA. Olgü sunumu: Samsun'da bir ürogenital miyazis olgusu. Turk Hij Den Biyol Derg, 2013; 70(3):153-6.
- Francesconi F, Lupi O. Myiasis. In: Tying SK, Lupi O, Hengge UR editors. Tropical Dermatology. 2nd edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2006:232-9.
- KuzgunbayB, TurunçT, TurunçT, ÇolakoğluŞ, ÖzkardeşH. *Psychoda albipennis*'in neden olduğu ürogenital miyazis. FLORA İnfeksiyon Hastalıkları Klin Mikrobiyol Derg, 2010;15(4):173-5.
- Lupi O, FrancesconiF. Myiasis. Clin Microbiol Rev, 2012;25(1):79-105.
- Yenice MG, Demir T, Babur C, Nalbantoglu S, Kilit S. A case of urogenital myiasis caused by *Psychoda albipennis* (Diptera: Nematocera). Mikrobiyol Bul, 2011; 45(3):558-64.
- Oğuz U, Reşorlu B, Çizmeci Z, Ünsal A. A rare urogenital myiasis caused by *Psychoda albipennis*. Turk J Urol, 2012; 38 (3):168-9.
- Smith KGV. An introduction to the immature stages of british flies. In: WR Dolling RR Askew editors. Royal entomological Society of London, Handbooks for the Identification of British Insects. Vol. 10, Part 14. London: 2013:15-18,37.
- Lotfy WM. Gastrointestinal and urogenital myiasis caused by Psychodid fly [diptera: nematocera] in Egypt: case report. PUJ, 2011; 4(1):115-6.
- Demir AD, Iraz M, İpek DNS. Bir çocukta *Psychoda Albipennis*'in etken olduğu ürogenital miyazis. Türk Pediatri Arş, 2015; 50:65-8.

Viral enfeksiyonlarda otofaji

Autophagy in viral infections

Onur ÜLGENALP¹, Bahattin Taylan KOÇ², Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU¹

ÖZET

Viruslar hücre içi obligat parazit olmalarından ve birçok virus ailesinin farklı replikasyon stratejileri olmasından ötürü diğer mikroorganizmalara kıyasla hücre içi daha çok organel ve işlev ile yakın ilişkili olup bu mekanizmalar üzerinde etkileri mevcuttur. Bu etkilerin başında da hiç şüphesiz hücre ölüm mekanizmaları yer almaktadır. Viruslar ile yapılan replikasyon-patogenez çalışmalarında hücre ölümü olarak apoptoz ve nekroz üzerine pekçok çalışma yapılmıştır. Otofaji ise son yıllara kadar viral enfeksiyonlarda çok değerlendirilmemiş ama gündeme gelmesiyle viral enfeksiyonlarla ilişkisi araştırılmaya başlanmıştır. Otofaji ("Auto" ve "Phagy"; kelime anlamı "kendi kendini yeme"); hücrelerin çeşitli stres durumlarında kendilerini yok olmaktan korumak ve hemostazı devam ettirmek için kullandıkları katabolik bir süreç olup hücre bu süreçte ihtiyacı olan enerjiyi kendi öz kaynaklarını sindirerek elde eder. Otofaji; organizmada çift katlı membrana sahip vezikül oluşumu ile şekillenen ve makro-, mikro-, şaperon ilişkili- otofaji olmak üzere bugüne dek tanımlanmış üç çeşidi bulunan fizyolojik bir olaydır. Son yıllarda otofaji ve viral enfeksiyonlarla ilgili çalışmaların sayısında hızlı bir artış yaşanmasının sonucu olarak; otofaji ve viruslar arasındaki karşılıklı etkileşim, DNA veya RNA virüsü ailesinde bulunan birçok virus türü için

ABSTRACT

Because of the fact that viruses are intracellular obligatory parasites and many virus families have different replication strategies, their intracellular interactions are more closely related to organelles and function than other microorganisms and they have effects on these functions. Undoubtedly, cell death mechanisms are located at the top of these effects. Many studies have been carried out on apoptosis and necrosis as cell death in replication-pathogenesis studies performed with viruses. Autophagy has not been evaluated in viral infections until recent years, however, by the fact that autophagy has become a popular topic in biotechnology, investigation of the relationship between autophagy and viral infections has been begun. Autophagy ("Auto" and "Phagy", meaning "self-eating"); is a catabolic process that cells use to protect themselves from extinction in various stress situations and to maintain hemostasis, and the cell obtains the energy it needs by digesting its own resources. Autophagy; the organism is a physiological phenomenon with two types of membrane-shaped vesicle formation and three types of macro-, micro-, and chaperone-related autophagy up-to-date. As a result of a rapid increase in the number of studies on autophagy and viral

¹Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Ankara

²Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Aydın



İletişim / Corresponding Author : Tuba Çiğdem OĞUZOĞLU

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, 06110 Dışkapı - Ankara - Türkiye

Tel : +90 312 317 03 15 E-posta / E-mail : oguzoglu@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 07.02.2018

Kabul Tarihi / Accepted : 12.06.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.79923

Ülgenalp O, Koç BT, Oguzoglu TÇ. Viral enfeksiyonlarda otofaji.

Türk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(3): 291-304

araştırma konusu olarak ilgi çekmiştir. Virusların otofaji mekanizmasını immünolojik yanıtta kaçabilmek ve viral yaşam döngülerini devam ettirebilmek adına nasıl kullandıkları ve viral patogenezin moleküler mekanizmalarında otofajinin yerinin sorgulanması temel çalışma konularını oluşturmaktadır. Bu araştırmalar ışığında elde edilen bilgilere göre; otofaji ve viruslar arasında iki tarafı keskin bir bıçağa benzetilebilecek bir ilişki bulunmaktadır. Hücre ölüm mekanizmalarından olan apoptoz ve nekrozdan farklı olarak bu fizyolojik olay; hücrenin stres durumunda oluşan besin ihtiyacına bir cevap olarak ortaya çıkacağı gibi, konakçı hücrenin bazı patojenlerden kurtulmak amacıyla başlattığı bir seri mekanizmayı da tetiklemektedir. Hatta bu olay, viruslar tarafından kendi lehlerine olacak şekilde replikasyonlarını başlatabilmek veya devam ettirebilmek ve viral zarflarının oluşumuna yardımcı olarak da kullanılmaktadır. Bu fizyolojik olay ile viruslar arasındaki ilişkiyi anlamaya yönelik bilgilerin sunulduğu bu derlemede; otofaji mekanizmaları, kullanılan yolaklar, otofajiyi uyaran ve başlatan proteinler, otofajinin çeşitli viruslar (tek başına bir virus veya aynı aileden iki virus arasındaki etkileşim durumunda) tarafından nasıl kullanıldığına yönelik bilgiler bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: otofaji, viral enfeksiyon, hücre ölümü

infections in recent years, the interaction between autophagy and viruses has attracted interest as a research topic for many types of viruses in the family of DNA or RNA viruses. The fact of how viruses use the autophagy mechanism to avoid immunological response and maintain viral life cycles and to question the location of autophagy in the molecular mechanisms of viral pathogenesis constitute main study subjects. According to the obtained information in the context of these studies; there is a relationship between autophagy and viruses that can be likened to a sharp blade on both sides. Unlike apoptosis and necrosis, this physiological event; it also triggers a series of mechanisms initiated by the host cell to get rid of some pathogens, as will the response of the cell to the need for nutrients in the event of stress. In fact, this incident will be in their favor by the viruses; replication can be initiated or sustained and used to assist in the formation of viral envelopes. In this review in which present information on relation between viruses and this physiological pathway; there are the knowledge that autophagy mechanism, pathways, proteins stimulating and starting autophagy, how to use autophagy by various viruses.

Key Words: autophagy, viral infection, cell death

GİRİŞ

Otofaji; tıp alanında yerleşmiş bir terim olup, kelime anlamı olarak “kendi kendini yemek” şeklinde tanımlanmaktadır. Fizyolojik bir olay olan otofaji; hücrenin stres faktörleri altında (açlık, kanser, bakteriyel-fungal-viral enfeksiyonlar vs) söz konusu organizmanın homeostazını korumak adına gelişen hücre ölüm mekanizmasıdır (1).

Otofaji, ilk kez *Saccharomyces cerevisiae*'nin açlığa duyarlı mutant suşlarında tanımlanmasıyla, bilim dünyasının dikkatini çekmiş olup (2, 3), bu çalışmalarda tanımlanan genler, otofajinin genetik ve moleküler biyolojisinin büyük ölçüde açıklanmasını sağlamıştır. Japon bilim insanı Ohsumi, bu fizyolojik olayın mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik

çalışmaları nedeniyle 2016 yılında Nobel Tıp Ödülüne layık görülmüş ve bu sayede otofaji dünyada ilgi gören araştırma konuları arasına girmiştir (4). İlk tespitin ardından söz konusu otofaji genleri memelilerde ve bitkilerde de tanımlanmaya başlanmıştır (5, 6).

Hüresel homeostazi teşvik eden yapısal bir yıkım mekanizması olarak belirtilen otofaji, çeşitli gelişimsel süreçler, hüresel stres tepkileri ve bağışıklık mekanizmaları için de gereklidir. Hiç şüphesiz viruslar hücrede pek çok değişimi indükleyen etmenlerin başında gelmektedir. Son on yıla kadar konakçı hücre ile virus arasındaki ilişkide otofaji konusu üzerinde çok durulmamış farklı hücre ölüm mekanizmaları araştırılmıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar göstermektedir ki; virus enfeksiyonu sonucu otofaji tetiklenmekte ve farklı mekanizmalar devreye girebilmektedir. Bu bağlamda söz konusu derlemede; otofaji ve viruslar arasındaki ilişki hakkında şimdiye kadar yapılmış çalışmalar ve bu çalışmalarda elde edilen bulgular hakkında genel bilgiler sunulmaktadır.

Hücre Ölümü Mekanizmaları

Otofajiyi tanımlamak ya da anlamak için öncelikli olarak hücre ölüm mekanizmalarının ve birbirlerinden farklılıklarının anlaşılması gerekmektedir. Günümüze dek yapılan çalışmalarda hücre ölüm mekanizmaları temel olarak ikiye ayrılmıştır (5, 7, 8). Bunlar:

I. Programlı hücre ölümü: Apoptoz, Otofaji

II. Kontrolsüz (Programsız) hücre ölümü: Nekroz'dur.

Apoptoz genetik olarak kontrol edilebilen programlı hücre ölümünün asıl tipi olarak kabul edilir. Nekroz ise fiziksel travma veya hücrenin üstesinden gelemeyeceği stresler sonrasında meydana gelen kazara olan kontrolsüz hücre ölüm tipidir.

Otofaji ise, apoptoz gibi tamamen kontrol edilemeyen hücrenin kendi dinamikleri ile devreye giren programlı hücre ölümüdür. Ancak yapılan son çalışmalarda sadece bir hücre ölüm mekanizması değil, hücrede sistematik olarak görülen bir degradasyon ve

buna bağlı diğer hücreler için enerji ve geri dönüşüme uğrama olayı olarak vurgulanmaktadır. Yani apoptozdan farklı olarak hücrelerin yenilenmesi ve güçlenmesi için ayrıca bir kaynak olduğu vurgulanmaktadır. Aynı apoptozda olduğu gibi otofajiyile de ilgili proteinler vardır. Bu proteinler otofaji ilişkili proteinler olarak isimlendirilirler ki; bunlar arasında Beclin, ATG, LC3 gibi proteinler yer almaktadır. Bu proteinler içinde ATG proteinleri, mekanizmadaki çeşitlilik ve yoğunluk bakımından öne çıkmaktadır. Şimdiye kadar 35 ATG proteini tespit edilmiş, ancak otofaji mekanizmasında daha çok görev alan 18 ATG proteini üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (5).

Programlı hücre ölümü olan otofaji kendi arasında üç temel tip mekanizmaya ayrılmıştır (makro, mikro, şaperon aracılı). Genelde bu üç mekanizmada da degradasyon lizozomlar yardımıyla yapılmasına karşın, işleyiş bakımından birbirlerinden farklılık göstermektedir (9).

Makrootofaji

İlk akla gelen ve otofagozom oluşumunu içeren otofaji tipidir. Bu mekanizma; protein ve hasarlanmış hücre organellerinin parçalanmasını sağlar. Otofagozom oluşumunun tanımlandığı bir mekanizma olan makrootofaji sırasında, sitoplazmik proteinler, organel ya da diğer maddeler, fagoforlarla çevrelenir. Bu otofagozomlar sitoplazmik kargoların yerleşik hidrolazlar tarafından bozunduğu otolizozomları oluşturmak için lizozomlarla (veya bitkilerde vakuollerle) kaynaşır. Elde edilen bozunma ürünleri daha sonra yeniden kullanım için membran geçirgenliğini sağlayan permeazların aktivitesi vasıtasıyla sitozole geri taşınır (9).

Makrootofaji, seçici olmayan ya da son derece seçici olan bir süreç olarak iki şekilde işlev görebilir. Bu süreçlerden birincisi açlığa bağlı ve seçici olmayan yol; ikincisi ise hedefe özgü ve selektif bir otofajik yoldur (10).

Seçici olmayan veya açlığa bağlı otofajinin, hücrenin stres anındaki enerji ihtiyacını karşılayabilmek adına

proteinlerin ve organellerin bozunumu sürecinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (11). Oysa selektif otofaji, p62, NBR1 (BRCA1 geninin komşusu), BNIP3 (BCL2 ve adenovirus E1B 19 kDa etkileşen protein 3) ve NIX (NIP3 benzeri protein X) gibi spesifik adaptör proteinler sayesinde; mitokondri (mitofaji), peroksizomlar (peksofaji) ve ribozomlar (ribofaji) gibi organellerin ve ubiquitinleşmiş protein komplekslerinin tanımlanmasını takiben bu yapıların yıkılmasını için onların otofagozomlarca tanımlanmasını içerir (10). Yapılan çalışmalar seçici otofajinin, ksenofaji olarak adlandırılan tipinin, patojen bakterilerin ve virüslerin yok edilmesinde çok önemli bir rol oynadığını, böylece otofajinin işlevlerinin patojenlere karşı doğuştan ve adaptif bağışıklığa kadar etkin olduğunu göstermiştir (12).

Seçici otofaji üzerine yapılan çalışmalar, otofaji adaptör protein fonksiyonunu otofaji substrat tanımayla bağlarken, kullanılan fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi transasyon sonrası modifikasyonların, ksenofajideki önemini altını çizmektedir (10). Bunlarla birlikte, adaptör proteinlerinin seçici olmayan otofajideki rolü hala tam olarak belirlenmemiştir.

Mikrotofaji

Mikrotofaji, sitoplazmik materyallerin lizozomal veya vakuoler membranın üzerinde bulunan küçük kesecikler tarafından çevrelenip sindirilmesi olarak tanımlanır (13).

Şaperon Aracılı Otofaji

Şaperon aracılı otofaji (CMA), bir sitozolik şaperonun amino asit diziliminde bir pentapeptiti tanıması ile başlar. Anılan bu peptit motifi KFERQ (Lizin, Fenilalanin, Glutamat, Arjinin, Glutamin)'dur. Bu yapının tespit edilmesini takiben, okside olmuş veya yanlış katlanmış proteinlerin tanınması ve bu yapıya sahip olan proteinlerin lizozomal yüzeye iletilmesi ile CMA meydana gelir. Ardından bu yapılar degrede olarak ortamdaki uzaklaştırılır (14).

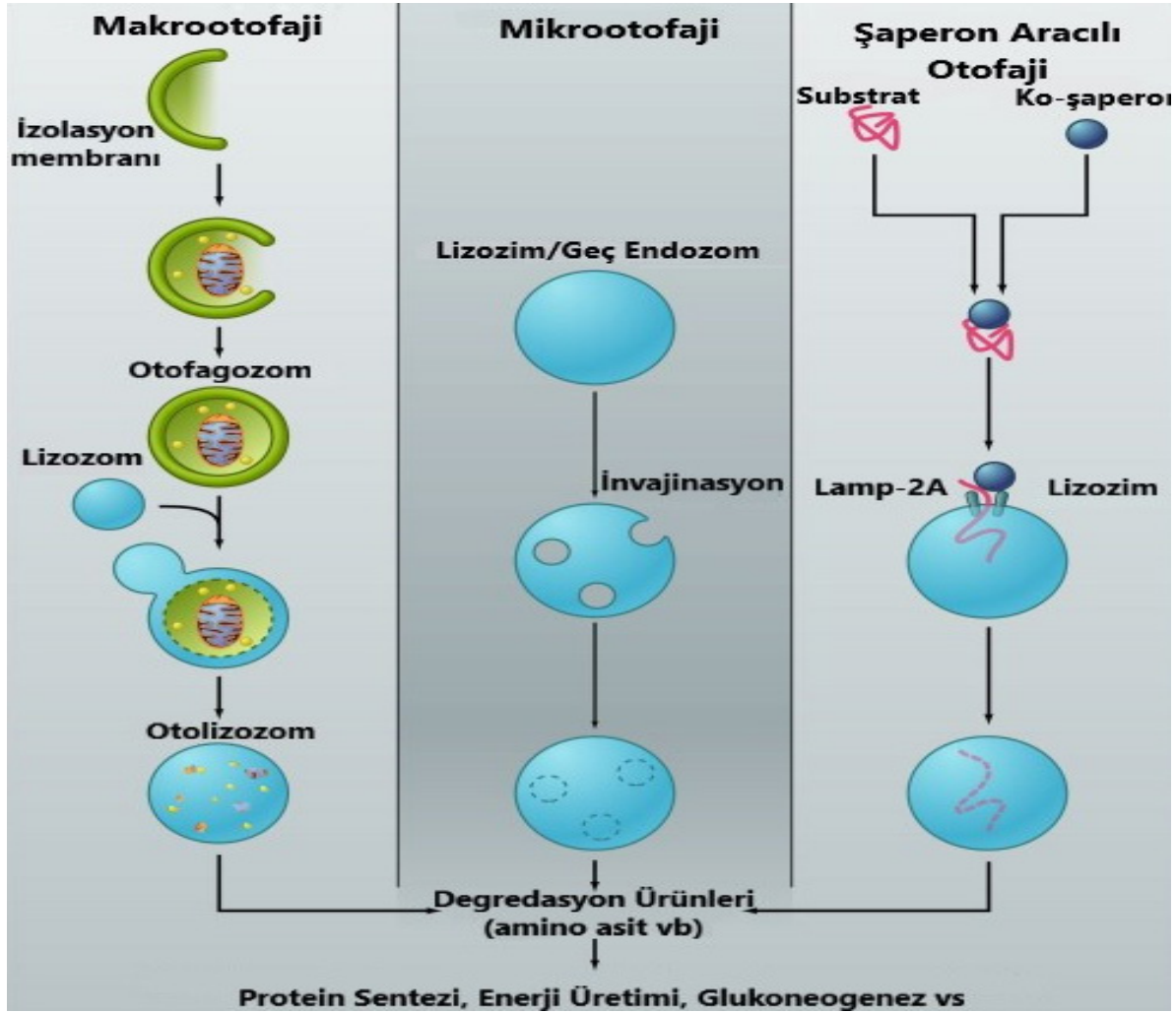
Hücrenin fizyolojik bir olayı olan açlık olgusunun, hem makrotofaji hem de CMA'yı aktive ettiği açıklanmıştır. Bununla birlikte, her iki tip aktivasyon, aynı anda gerçekleşmez. Makrotofaji'den CMA'ya geçişte, hücresel yakıtı sağlamak için gerekli amino asitleri elde etmek ve bu koşullar altında protein biyosentezini korumak adına hidrolize olabilen hücresel bileşenleri belirleyen bu iki olaydan CMA; daha yüksek seviyelerde seçicilik sağlayabildiği belirtilmektedir (14).

Makrotofaji; 4-6 saat boyunca açlık çeken çoğu hücre tipinde maksimum aktiviteye ulaşır ve kademeli olarak bazal seviyelere iner. CMA'da ise bu durum farklıdır. Eğer açlık bu sürenin üzerine çıkacak olursa, makrotofaji de azalma CMA aktivitesinde sürekli bir artışa eşlik eder. CMA çoğu hücrede 12 saatlik bir açlık sonrasında maksimum aktivasyona ulaşır ve açlık devam ettiği sürece aktif kalır (14).

Virüsler ile Otofajinin İlişkisi

Virüsler ile otofajinin ilişkisinin keşfi tahmin edilen aksine uzun bir süre öncesine dayanır. "Otofagozomların" gözlenmesi ilk kez 1965 yılında George Palade ve grubunun, Poliovirus ile enfekte HeLa hücrelerinin elektron mikroskobu görüntülerini yayınlaması ile gerçekleşmiştir (1).

Araştırmacılar, enfeksiyonun ileri evrelerinde yaptıkları gözlemlerde; çift lipid tabakalı vezikülleri tespit etmişler ve bu veziküllerin yakınında ve çoğunlukla içinde bulunan, görünür haldeki virionları gözlemlemişlerdir. O dönem için bu gözlem; tam olarak anlaşılammış ve adlandırılmamış, bu veziküllerin normal lizozomal veya transport veziküller olduğu düşünülmüştür. Daha sonra, "bileşik zar vezikülleri" olarak adlandırılan bu yapıların Cocksackievirus ile enfekte fare pankreası görüntülerinde de mevcut olduğu tanımlanmış (15); bu yapıların yani otofagozomların, hücre içi veziküllere benzer olmasına rağmen farklı görevleri olduğu anlaşılmıştır. Günümüzde bu benzersiz, çift membranlı, "otolitik veziküller", hücresel otofaji yolunun karakteristik



Resim 1. Otofaji tipleri ve işleyiş mekanizmaları. Her üç otofajiden sonra ortaya çıkan degradasyon ürünleri; yeni protein sentezi, enerji üretimi ve glikoneogenez gibi farklı amaçlar için kullanılabilir (Mizushima ve ark., 2011 (5) 'den uyarlanmıştır).

organelleri olan "otofagozomlar" olarak bilinir olmuştur (1).

Viruslar ve otofaji arasındaki ilişki; Polioviruslar üzerine yapılan çalışmalarla perçinlenmiş, bu araştırmalar sonrası belli başlı viruslar ve bunların otofaji ile olan ilişkileri sorgulanır olmuştur. Poliovirus ile yapılan ilk araştırmalarda enfeksiyonu veya viral protein ekspresyonunu takiben enfekte olmuş hücrelerdeki veziküllerinin incelenmesine odaklanılmış ve bu veziküllerin otofagozomların

özelliklerini taşıyan işaretler içerdiği tespit edilmiştir (16). Daha sonraki çalışmalarda, otofagozomların spesifik hücresel markeri olarak LC3'ün tanımlanması, Poliovirus'un indüklediği veziküller için otofajik orijininin doğrulanmasına ve tespit edilmesine olanak sağlamıştır (1).

Veziküllerin otofajik orijinleri belirginleştikçe, otofajinin viruslar üzerine negatif etkileri haricinde birçok virusa faydası olduğu da fark edilmiştir. Hücresel otofajinin artmasının virus üretimini

arttırdığı, otofajik inhibisyonun viral yükü azalttığı ve Poliovirus'ta çift membranlı veziküllerin, RNA replikasyonu için bir substrat görevi görebileceği yine bu araştırmada tespit edilmiştir (1). Bu durumun Picornaviruslar ve diğer çok sayıda başka virus için de geçerli olduğu gözlenmiştir (17). Bu araştırmaları takiben diğer bazı viruslarla ilgili bulgular tespit edilmeye başlamıştır. Örnek olarak Hepatit C Virus (HCV)'nin viral replikasyonunu başlatmak için otofajinin gerekli olduğu, replikasyonun sürdürülmesi için gerekli olmadığı belirlenmiştir (18). Dengue Virus (DENV) enfeksiyonunda; viral giriş, translasyon ve replikasyonun otofajik yol ile bağlantılı olduğu (19), lipofizlerin otofajisinde (lipofaji), DENV replikasyonu için metabolik enerji sağlandığı tespit edilmiştir (20).

Hayvansal orijinli viral enfeksiyöz ajanlardan olan, ülkemizdeki sığırlarda da varlığı/yaygınlığı ve farklı genotipleri belirlenmiş (21, 22) *Flaviviridae* ailesinden *Pestivirus* genusundaki Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) hakkında da otofaji çalışmaları yapılmıştır (23, 24). Bu enfeksiyöz ajanın konakçı hücrelerinde morfolojik bozukluk meydana getiren (sitopatojen-cpe) ve getirmeyen (nonsitopatojen-ncpe) iki biyotipi bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada; BVDV'nin her iki biyotipi ile enfekte edilen hücrelerde, iki biyotipin de otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. Aynı çalışmada otofaji inhibe edici ilaç olan 3-metiladenin (3MA) kullanımının otofajiyi ve viral replikasyonu anlamlı olarak azalttığı, ayrıca otofaji uyarıcı ilaç rapamisin kullanımının otofajiyi ve viral replikasyonu belirgin olarak arttırdığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak BVDV'nin cpe ve ncpe suşlarının benzer seviyede otofajiye neden olduğu ve viral replikasyon için otofaji mekanizmalarını kullandıkları ortaya konulmuştur (24).

Otofajinin Viral Regülasyonu

Otofajinin induksiyonu besin yoksunluğu, Endoplazmik Retikulum (ER) stresi, tehlike ile ilişkili moleküler kalıplar (DAMP'ler), hipoksi, redoks stresi ve mitokondriyal hasar gibi çeşitli stres uyarıları

tarafından tetiklenir. Bu uyarılar çeşitli hücreyel sinyaller dizisi ve fonksiyonlar içerir. Viruslar hücreye giriş sırasında ve çoğalma döngüsünün farklı aşamalarında bu uyarılardan çoğunu tetikleyebilir ve bu şekilde otofajiyi indükleyebilir. Örneğin; bazı yayınlarda, hedef hücrelerin yüzeyine bağlandığında, bazı virusların otofajiyi uyurabileceğini göstermiştir. İnsan Herpesvirus 6, Adenovirus B ve D, Measles (Kızamık) virusu da dâhil olmak üzere birçok viral patojen tarafından tanınan bir hücre yüzeyi reseptörü olan CD46'nın otofajiyi indüklemek için yeterli olduğu bilinmektedir (1).

Otofajik sinyal sisteminin virus kökenli birçok aktivatörü tespit edilmiş, ancak etkinleştirme mekanizmaları henüz fazla detaylı anlaşılmamıştır. Birçok virus, otofajik sinyal oluşmasını indükler, ancak bu sinyali veren spesifik proteinler her virus için ayrıntılı olarak bilinmemektedir (1).

Otofajinin viral regülasyonu çalışılmış virüslere örnek olarak Herpes Simpleks Virus 1 (HSV-1), Kaposi Sarkoma Virus (KSHV), Murine Gamma Herpesvirus 68 (MHV-68), Influenza A, Coxsackie virusu B3 (CVB3), İnsan Parainfluenza Virus 3 (HPIV3) ve Epstein-Barr Virus (EBV) verilebilir. Bu virüslerin kodladığı proteinler ve işlevleri kısaca şunlardır:

HSV-1, US11 proteini kodlayarak, PKR'yi inhibe eder ve bu şekilde otofajik sinyalleşmeyi inhibe ettiği gibi ayrıca ICP34.5 proteinini kodlayarak, otofaji sinyal molekülü olan Beclin 1'e bağlanarak otofagozom oluşumunu engeller (25). Aynı olgu KSHV için orf16 proteini ve MHV-68 için M11 proteini ile saptanmıştır (26).

Influenza A Virus, Influenza A2 proteinini kodlar, bu protein amfizom oluşumunu inhibe etmek için LC3'e bağlanır. HPIV3 tarafından kodlanmış P proteini, SNAP29'a bağlanır ve endozom-otofagozom füzyonunu inhibe ederek otofajiyi engeller (27).

CVB3 enfeksiyonunda ise virüsün otofagozom olgunlaşmasını engellemesi için, konağa ait olan BPIFB3'ün vezikül olgunlaşmasını önlemesi gerekir (28). Bu mekanizmanın aydınlatıldığı diğer virüsler,

Tablo 1. Bazı virüsler ve ilgili otofaji mekanizması ve otofaji ilişkili proteinleri.

VİRUS	OTOFAJİ MEKANİZMASI İLE VİRUSUN İLİŞKİSİ	VİRAL PROTEİNLER	OTOFAJİ İLE İLİŞKİLİ PROTEİNLER	KAYNAKLAR
HVC Hepatitis C Virus	Otofajiyi ve ER stresini tetikler Otofagozom birikmesi gözlenir. Otofajik kargonun degradesyonundan sorumlu cathepsin S'nin ekspresyonu HVC çekirdeği ve NS5A tarafından azaltılır.	HVC çekirdeği NS5A	UPR	18
Influenza virus	Influenza virus otofajiyi tetikler fakat otofagozom ve lizozom füzyonunu engeller. Otofagozom birikmesi gözlenir.	Matrix 2 Proteini (MP2)	LC3, Atg 5	27
DENV Dengue virus	Dengue virus ile enfeksiyon in vitro ortamda otofajiyi indükler. Viral replikasyon proteinleri ampizomlar ile ilişkilidir.	Bilinmiyor	Bilinmiyor	19
KSHV Kaposi Sarkomu Herpes Virus	Viral kaynaklı Bcl-2 benzeri proteinler direkt olarak Beclin-1 E bağlanır ve otofajiyi inhibe eder.	Bilinmiyor	Bilinmiyor	26
EBV Epstein-Barr Virus	EBV'ye ait Latent Membran Proteini 1 (LMP1) vasıtası ile otofajiyi indükler	LMP1	Bilinmiyor	29
HIV İnsan İmmünyetmezlik Virus	HIV otofajiyi tetikler fakat otofagozom ve lizozom füzyonunu engeller. HIV virusunun otofagozom ile ilişkili degradesyonuna müdahale ederken CD4 T hücrelerinde otofagozom birikmesi gözlenir.	Nef Proteini	Beclin-1	30
HVB Hepatitis B Virus	HVB DNA'sının replikasyonunu tercih eden otofajiyi tetikler. Viral zarf üretimi ve çıplak kapsidlerin salınması	Bilinmiyor	Bilinmiyor	31
VZV Varisella Zoster Virus	VZV glikoproteinlerinin biyosentezini ve işlenmesini kolaylaştıran komple otofajiyi tetikler	Bilinmiyor	Bilinmiyor	32
Adenovirus	Otofaji	Bilinmiyor	Bilinmiyor	10
CVB3 CoxsackieVirus	Otofajiyi indükler. Viral replikasyonu artırır.	Konağa ait BPIFB3	Bilinmiyor	28
HSV-1 Herpes Simpleks Virus 1	HSV-1 otofajiyi tetikler fakat otofagozom ve lizozom füzyonunu engeller. Otofagozom birikmesi gözlenir.	γ34.5 protein, Us11,	Beclin-1, Atg5	25

ilgili proteinler ve otofaji ile ilişkileri yukarıdaki tabloda (Tablo 1) verilmiştir.

Otofajinin Antiviral Fonksiyonları

Otofajinin antiviral yanıtındaki görevi ile ilgili bulgular, farelere verilen rekombinant Sindbis Virus ile yapılan deneysel bir çalışmaya dayanmaktadır (33). Bu çalışmada; otofajik yolu uyaran Beclin 1 proteini, Sindbis virus verilmesi ile sentezlenerek virus titresini ve farede oluşacak virus kaynaklı nöral apoptozisi azaltmış ve virus kaynaklı Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonundan farelerin korunduğu gözlenmiştir. Bu konu ile ilgili hipotez, ekspresyonu artan Beclin 1'in sinir hücrelerinde ksenofajiyi arttırdığı ya da buna alternatif olarak otofajinin yukarı yönde regülasyonunu arttırarak, nöral hücrelerde apoptozis miktarını azalttığı şeklindedir. Bunu takip eden sonraki çalışmalarda, Beclin 1'in antiviral yanıtın bir ana düzenleyicisi olduğu fikri geliştirilmiştir (1).

Otofajide yer alan otofagozomlar, antiviral fonksiyonlarda görev alabilirler. Virofaji olarak adlandırılan ve intrasitoplazmik viral bileşenlerin degradasyonu ile sonuçlanan olgular, virusa ait nükleik asitlerin endozomal reseptörlere (TLR'ler) iletilmesi yoluyla doğal immuniteye ait olan sinyalizasyonun aktivasyonu, major histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I ve II moleküllerine endojen viral antijenlerin sunulması ile edinsel immunitenin aktivasyonu, reaktif oksijen türleri üretimi ile doğal bağışıklığın aktivasyonunun düzenlenmesi ve hücrenin sağ kalımının teşvik edilmesi sayılabilir (34).

Viruslar ve otofaji üzerine yapılan araştırmalar sonucunda, bazı virusların otofajiyi inhibe etmek için çeşitli proteinler salgıladığını ortaya koymuştur. Örnek olarak Herpes Simpleks Virus tip 1 (HSV-1) otofajiyi inhibe etmek için iki ayrı protein sentezlemesi verilebilir. HSV-1 Beclin 1 bağlayıcı protein olarak ICP34.5 proteinini kodlar, bu protein direkt olarak Beclin 1'e yapışır ve otofaji oluşmasını önler. HSV-1 buna ek olarak US11 olarak isimlendirilmiş başka bir protein salgılayarak PKR Kinaz ile etkileşime girerek

de otofajiyi inhibe edebilir. HSV-1 virusunun otofajiyi inhibe etmek için iki ayrı yol birden geliştirmesi otofajinin antiviral bir görevi olduğunun kanıtıdır (25). Bu duruma birkaç farklı örnek olarak Murine Gamma Herpesviruslar için Bcl-XL2, ve M11 proteini gibi Bcl-2 homologlarının kodlanması ve Kaposi Sarkoma virusu için ORF16 proteini verilebilir (25). Anılan bu proteinlere farklı viruslar yönünden Tablo 1'de değinilmiştir.

Doğal Katil (NK) hücreler doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçası olarak viral enfeksiyonlara karşı konakçı savunmasında kilit rol oynamaktadır. NK hücrelerinin aktivasyonunun ve fonksiyonunun, inhibitör ve aktive edici sinyaller arasındaki etkileşim tarafından düzenlendiği bilinmektedir (35). Atg 7 ve Atg 5 geninin susturulması ile yapılan farklı iki çalışmada; Doğal Katil hücrelerinin fonksiyonu ve gelişimleri üzerine otofaji komponentlerinin rolü olduğu anlaşılmıştır. Atg 7 ve Atg 5 genlerinin silinmesi sonucunda Doğal Katil hücrelerinin gelişiminin bozulduğu tespit edilmiş (36), antiviral cevap sırasında otofajinin Doğal Katil hücrelerinin gelişimi ve fonksiyonu üzerinde de etkisi olduğuna hemfikir olunmuştur. Aynı şekilde dendritik hücrelerde de HSV-1, HSV-2 ve hRSV enfeksiyonlarındaki doğal katil hücrelerin, hücre popülasyon farklılıklarının da buna bağlı olduğu düşünülmüştür (37). Murine Noroviruslarla (MNV) yapılan başka bir araştırmada bu virusa karşı başarılı bir IFN γ cevabı için otofaji mekanizmasının yaratacağı etkinin gerekli olduğu, ancak bu etkinin otofajik bozunmayı içermediği tespit edilmiştir (38).

Otofaji konakçı savunma sisteminin bir parçası olarak ortaya çıkmaktadır, ancak antimikrobiyal otofajinin in vivo önemi ve enfeksiyon sırasında düzenlenmesinin mekanizması ve sinyal yolları fazla anlaşılammıştır. Antiviral otofaji konusundaki sinyal yolları; insanlarda ve hayvanlarda hastalık meydana getiren ve sivrisinek yoluyla taşınan bir virus olan Rift Vadisi Humması Virus (RVFV) ile yapılan bir çalışmada irdelenmiştir (39). Hem sinek hem de memelilerde var olan otofaji genlerinin tespit

edildiği bu çalışmada, enfeksiyon ile mücadelede anahtar olabilecek bu genlerin yokluğunda RVFV enfeksiyonunun arttığı ayrıca sineklerde Toll-7 reseptörü ve memelilerde toll adaptörü olan MyD88'in antiviral otofaji için gerekli olduğu anlaşılmıştır. Bu bağlamda, otofaji modülasyonu ile herhangi aşısı ve terapötik sağaltımı olmayan RVFV enfeksiyonunun tedavisinde etkili bir strateji geliştirilebileceği bildirilmiştir.

Anti-viral otofajik olguların indüklenmesi hücreden hücreye sinyal yolu ile de olabilir. Materno-fetal enfeksiyonlarda, trofoblastların viral enfeksiyonlara direnci bilinmektedir. Plasental trofoblastlar, fetal ve maternal ortamlar arasındaki ara yüzeyi oluşturur ve virusların maternal yolla fetüse yayılımını sınırlandırmaya yarar. Yapılan bir çalışmada Kromozom 19 üyeleri olan ve neredeyse tamamının insan plasentası tarafından eksprese edildiği microRNA'ların (miRNA) trofoblast kaynaklı eksozomlar ile birleştiği ve otofajik indüksiyon sayesinde duyarlı hücrelerde virus replikasyonunu azalttığı bu yolla viral enfeksiyondan fötüsü koruduğu gözlenmiştir. Bu araştırmanın sonucu olarak nakledilebilir miRNA'ların otofaji aracılı antiviral yanıtta etkin bir rolü olduğu kanıtlanmıştır (40).

Viruslar ve Otofajiyi Kendi Yararlarına Kullanmaları

Viruslar sentezlenmelerine aracı oldukları proteinler vasıtası ile ya da hücrede stres yaratarak otofajiyi indükleyebilir ve bu uyarılar sonucu otofajiyi başlatabilirler. Bazı viruslar başlatılan otofajik akışa bir daha müdahale etmezken, bazıları kendi ihtiyaçlarına göre otofajik mekanizmanın belli basamaklarına müdahale ederler (1). Bilinen otofaji indükleyicileri haricinde virusların otofajik mekanizmaya nasıl müdahale ettiğine dair bazı araştırmalar yapılmış, bu araştırmalarda otofajiyi indüklediği görülen bazı virusların aynı zamanda otofajik bozunumu inhibe ettikleri fark edilmiştir.

Virusların otofajiyi kendi yararları için kullandığına

dair yapılmış çalışmalara örnekler olarak şunlar verilebilir:

Zarflı bir virus olan Dengue virus; yapısal bir protein olan prM'nin hücresele Furin tarafından pr ve M'ye bölünmesine gereksinim duyarken bu, bulaşıcı virusun üretilmesi için gereklidir. Şayet otofaji engellenirse, pr peptidinin viriondan salınımının yani bölünmenin azaldığı dolayısıyla viral titrenin düştüğü gözlenmiştir (41).

Zarfsız bir virus olan Poliovirus'un yapısal bir proteini olan VP0'ın, VP2'ye ve VP4'e bölünmesi genom içeren virionun viral komponentlerinin sentezi ve birleşmesi (asamble) aşamasından sonra meydana gelir. Bu bölünme, bulaşıcı virusun replikasyonu için gereklidir. Bu bölünmenin olabilmesi için gerekli olan asidik ortamın otofagozomlar sayesinde sağlandığı tespit edilmiştir (42).

Coxsackievirus B3'ün, otofaji işaretleyicisi olan LC3'ün lipidleştirilmiş formunu taşıyan mikrovezikülleri (EMV) hücre dışına salındığını ve bu mikroveziküllerin otofaji yolağından türetildiği gösterilmiştir (43).

Picornaviruslar enfeksiyonlarında otofagozomların virusun replikasyonu için substratlar sağladığı ve bu nedenle picornavirusların üretiminde de otofajinin çok sayıda rol oynadığı tespit edilmiştir (42).

Hepatit C Virusu (HCV)'nun, kendi RNA replikasyonunu teşvik etmek için katlanmamış protein yanıtı (UPR) kaynaklı otofajiyi indüklediğini bildirilmektedir. UPR kaynaklı otofaji yolunun gen susturulması veya aktivasyonu sonucu HCV türevi patojen ilişkili moleküler modelin (PAMP) aracılık ettiği IFN- β aktivasyonunu, aktive ettiği veya baskıladığı ortaya çıkmıştır. Aynı araştırmada DENV'den türetilen bir PAMP ile de benzer sonuçlar elde edilmiştir, bu da HCV ve DENV'nin doğal immun tepkiden kurtulmak için UPR-otofaji yolağını kullanabileceğini göstermiştir (41).

Başka bir örnek olarak bazı Paramyxovirusların otofajiyi indüklediği ve virus üretimini artırmak için otofaji yolaklarını kendi çıkarları için kullandığı

da yapılan araştırmalarda bildirilmiştir (44). Bir Paramyxovirus olan, İnsan parainfluenza virusu tip 3 (HPIV3), otofagozom-lizozom füzyonunu bloke ederek tamamlanmamış otofajiyi indükler ve bunun sonucu olarak kendi viral replikasyonunu artırır. Viral bir fosfoprotein (P), otofagozoma bağlı degradasyonun inhibe edilmesi için gerekli ve tek başına yeterlidir. Bu fosfoprotein, SNAP29'a bağlanır ve syntaxin17 ile olan etkileşimini engeller, böylece konağa ait bu iki SNARE proteininin otofagozom-lizom füzyonuna aracılık etmesini önler. Bunun sonucu olarak tamamlanmamış otofaji şekillenir ve bu durum otofagozom birikimini ve hücre dışı viral üretimi artırır. Ancak bu durum viral protein sentezini etkilemez. Bu bulgular, virüslerin SNARE proteinlerinin işlevini bozarak otofagozom degradasyonunu nasıl engelleyebileceğine güzel bir örnektir (45).

İnsan immün yetmezlik virusu-1 (HIV-1) enfeksiyonu, kendine ait yeni virion oluşumunu kolaylaştırmak için otofajik yolağın yıkılmasına neden olur. LC3, HIV-1'e ait bir protein olan Gag'ın virion çekirdek yapısal proteinlerine işlenmesini kolaylaştırır. Diğer bir HIV-1 proteini Nef, otofajinin merkezi düzenleyicisi olan Beclin-1 ile etkileşime girerek otofagozom olgunlaşmasını engeller. Nef'in viral genomdan silinmesi, viral kapsid proteini olan p24'ün otofajiye bağımlı bozulmasına neden olur. HIV-1, Gag proteini oluşumu için otofaji indüklemeyi gerektirir, ancak virion üretimini artırmak için bu yolağın degradasyon yeteneğini inhibe eder (30).

Aynı Aileden Olan Virüslerin Birbirleri ve Otofaji ile İlişkisi

Birçok virus otofajik mekanizmayı kendi yararları doğrultusunda kullanabilir. Bu durum, genetik özellikler yönünden birbirine yakınlık gösteren ve aynı aileye mensup virüslerin otofajiyi kendi yararları için benzer şekilde kullanabileceklerini düşündürmüştür.

Aynı aileye ait virüslerin otofaji ile ilişkileri farklılık gösterebilir. Birçok vakada genetik olarak yakınlık ilişkili virüslerin otofajik bozulma ve sinyal verme üzerine

çok farklı etkileri olduğu gösterilmiştir. Buna en güzel örnek; Picornavirus ailesi üyesi Coxsackievirus B3 (CVB3) ve Poliovirus'tur. Coxsackievirus, otofajik sinyal vermeyi ve otofagozom oluşumunu indükler ancak enfeksiyon esnasında otofagozom içeriklerinde çok az veya hiç bozunma olmaz (43). p62, otofaji ile etkili bir şekilde bozulan spesifik bir substrattır; bir hücre içindeki p62 miktarı, hücrenin otofajik etkinliği ile ters orantılıdır (5). Busebeble, p62 birikimi, otofajik akının engellendiğin gösteren iyi bir belirteçtir. P62 normal olarak başlamış ve tamamlanmış bir otofaji mekanizması sonunda degrade olur, fakat CVB3 ile yapılan deneysel bir çalışmada p62'nin degrade olmadığı gözlenmiştir (46). CVB3'de gözlenen bu durumun tersi olarak, poliovirusun p62'nin lizozomal olarak parçalanmasının da dâhil olduğu komple otofajiyi indüklediği kesindir (42). Ayrıca CVB3 tarafından degradasyonun inhibasyonu için hücrenel hedef faktör olarak, bakterisidal/geçirgenlik arttırıcı protein (BPI - bactericidal/permeability-increasing protein) katlama içeren B ailesi 3 (BPIFB3 - fold-containing family B member 3) belirlenmiştir (47). Deneysel olarak BPIFB3'ün susturulması, hem otofajik bozunmayı hem de CVB3 replikasyonunu arttırır, ancak bu işlem Poliovirus için tekrarlandığında virüsün replikasyonunu etkilemez, bu durum iki aynı aileye mensup virüsün otofajiyle birbirinden farklı bir ilişkiye sahip olduğunun önemli bir örneği ve kanıtıdır (40).

Başka bir örnek olarak birbiriyle yakınlık ilişkili iki herpes virus; HSV ve Varisella Zoster Virus (VZV), otofajik degradasyon ile farklı ilişkilere sahiptir. Bu iki virus, enfeksiyon esnasında otofajik cevabı indükler fakat bu cevabın sonucu iki virus içinde oldukça farklıdır. HSV, otofajik sinyalleşmeyi inhibe etmek için ICP34.5 ve US11 olmak üzere iki proteini kodlar; ancak VZV 'da bu proteinleri kodlayacak genler bulunmadığından bu proteinlerin her ikisi için de homologları kodlayamaz. Bunun sonucu olarak HSV enfeksiyonunda farklı olarak degradatif otofaji inhibe edilirken, VZV enfeksiyonunda otofajik degradasyon engellenmez (32).

Viral Zarfların Oluşumunda Otofajik Membranların Rolü

Çeşitli virusların otofajiyi kullanarak kendi zarflarını sentezlediği çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. Bu olguyla alakalı en önemli örneklerden biri Hepatit B Virus (HBV)'nin kendi zarfını oluşturmak için otofaji mekanizmasını kullanmasıdır. HBV'ye ait olan X proteini, fosfatidilinositol-3-kinaseclass 3 (PI3KC3) ve protein kinaz (DAPK) ile bağlanarak bunları aktive eder ve otofajik sinyalasyonu başlatır (48), otofajik bozunmayı ise inhibe eder (31). Bu sürecin sonunda enfeksiyon sırasında oluşan ve bozunma şekillenmediği için biriken otofajik membranlar viral zarflama için kullanılır (49).

Epstein-Barr virusunun (EBV) otofaji yolunu bozarak aynı zamanda fiziksel olarak viral membranlar ürettiği gözlenmiştir. Büyük zarflı bir DNA virusu olan EBV, viral membran oluşturmak için hücrel membran havuzundan yararlanır. Ayrıca EBV'nin Rta transkripsiyon faktörü, otofaji genlerinin ekspresyonunu teşvik eder (29). Bununla birlikte, EBV enfeksiyonu sırasında otofagozom oluşumu uyarılırken, oluşan bu otofagozomlar lizozomlarla kaynaşmazlar, bunun sonucunda aynı HBV örneğinde olduğu gibi otofagozom bozunumu engellenir. Bu inhibisyonu EBV kendi virus parçacığı üretimi için kullanır. Buna ek olarak, EBV'nin enfeksiyon sırasında otofajik membranları stabilize ettiği ve sitozolik olgunlaşma sırasında zarf için bu zarfları kullandığı bilinmektedir (50).

HPV'nin neden olduğu viral enfeksiyonda, otofajinin rolü ve bu rol sırasında zarf oluşumu için ortaya çıkan ürünlerin kullanması dikkat çekmiştir. HPV otofajiyi indükler, bunu yaptıktan sonra genom replikasyonu ve viral zarf oluşumu için bu hücrel sürecin bileşenlerini kullanır. Fakat bu tespitlere rağmen HPV enfeksiyonu sırasındaki otofaji bileşenleri ile virus belirleyicileri arasındaki etkileşimde rol oynayan mekanizmalar halen tartışmalıdır (49).

Lizis Olmadan Otofajik Çıkış

Viruslar ile otofaji arasındaki ilişkiler arasında ki belki de en ilginç fenomen, birçok yayında AWOL olarak isimlendirilen Lizis Olmadan Otofajik Çıkış (1).

Virion çıkışında otofajinin etkisinin görülmesi ilk olarak Poliovirus araştırmalarında göze çarpmıştır. Yapılan çalışmada enfeksiyondan altı saat sonra Poliovirus ile enfekte edilmiş hücrelerde belirgin bir hücre lizisi gözlenmemiştir. Bununla beraber virus partikülleri hem hücre içinde hem de hücre dışında tespit edilmiştir. Bu durum beklenmeyen bir durum değildir, fakat LC3 miktarı deneysel olarak azaldığında, hücre içi virus miktarında üç katlık bir azalmaya neden olurken hücre dışındaki birikimin 20 kat azaldığının tespit edilmesi araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Araştırmacılar bu bilgiler ışığında, poliovirus enfeksiyonunda geç oluşan çift zarflı veziküllerin yani otofagozomların, bulaşıcı virionları ve diğer sitoplazmik bileşenleri içerebileceği hipotezini ortaya çıkarmışlardır. Bu hipotez araştırmacıları başka bir hipoteze daha yöneltmiştir, bu da enfekte olmuş hücrelerin membranlarının virus için litik olmayan bir viral kaçış yolu sağlayabileceği hipotezidir. Fenomenin adı "Out Lysis" ile "Autophagic exit" veya "AWOL" olarak adlandırılmıştır (1). Daha sonra, *Pichia Pastoris* ve *Dictyostelium Discoideum* ile yapılan çalışmalarda, otofajinin kanonik olmayan bir salgı yolunu teşvik ettiği bulunmuştur (51). Bu bilgilerin doğrultusunda araştırmacılar poliovirus ve morbillivirus gibi bazı zarfsız virusların hücreye zarar vermeden çıkmasında otofaji mekanizmasını kullanılabileceğini düşünmüştür (52). Ama viruslar için bu çıkış yolları ayrıntılı olarak belirlenemediğinden bu durum şu an için gerçeğe yakın bir hipotez konumundadır.

Viroporinlerin Otofajideki Rolü

Viroporinler küçük, genellikle hidrofobik, çok fonksiyonlu, viruslar tarafından üretilen, konakçı hücrenin membranındaki oligomerik iyon kanallarına

veya gözeneklerine yerleşen ve bu kanalları daha geçirgen hale getiren proteinlerdir. Bu özellikleri sayesinde virionların hücreden çıkmasını kolaylaştırır ve çoğalma hızlarını arttırır. Hücrelerin zarlarını değiştirerek enfekte hücrelerden virus salınımını kolaylaştırırlar (53).

Virus kaynaklı bu hidrofobik yapıların yani viroporinlerin otofajiyile olan ilişkileri de tespit edilmiştir. İnfluenza virusunun virion morfogenezisi için Matrix Proteini (M2) gereklidir (54). M2 proteininin, aynı zamanda otofajinin bozulması için gerekli olan ve LC3 ile etkileşen bir alan (domain) içerdiği tespit edilmiştir Bu özelliği sayesinde M2, otofagozom-lizozom füzyonunu bir viroporin olarak engeller ve otofajiye engel olur (27).

Genel olarak bir viroporinde olması gereken yapısal motiflere sahip olan ve rotavirus enfeksiyonu sırasında salınan bir protein olan NSP4'ün normal görevi ER'den kalsiyum salınımıdır (55). Yapılan çalışmalarda bu proteinin otofajik sinyalleşmeyi tetikleyen bir etki yaratarak otofajiyi uyardığı tespit edilmiştir (56).

Poliovirus proteini olan 2BC'nin tek başına ekspresyonu LC3-II'yi indükleyebilir, ancak poliovirus ile enfekte hücrelerde görülen çift membranlı yapıların oluşumu için hem 2BC hem de poliovirus protein 3A'nın ekspresyonu gereklidir (1). Otofagozomları oluşumu için her ikisinin birlikte ifade edilmesi gereken, poliovirus 3A ve 2BC'nin de otofaji ile ilişkili viroporinler olduğu bildirilmiştir. (16).

SONUÇ

Otofajinin yeni tanımlandığı dönemlerde besinsel strese bağlı olarak aktive olduğu düşünülmüş ve bu sebepten dolayı araştırmalar bu olgu üzerine yoğunlaştırılmıştır. İlerleyen dönemlerde otofajinin patojenlerle alakalı görevlerinin olabileceği çalışmalar yeni bir boyut ve yoğunluk kazanmış, hücre içi bir patojen olan viruslar da otofaji yönünden incelenmeye ve gözlenmeye başlamıştır.

Birçok virusun otofajiyi proviral bir şekilde kullandığına şahit olmamıza rağmen, virusların otofajiyi indüklediği ve/veya bu yolu kendi kazanımları için manipüle ettiği spesifik mekanizmalar bulunmaya çalışılmaktadır. Otofajik alan hızla ilerlemekle birlikte, otofajiyi düzenleyen spesifik moleküller ve bu molekülleri hedef alan viral mekanizmalarla ilgili konular keşfedilmelidir. Bu bağlamda otofaji, patojenlerle savaşta güçlü bir silah olabilir.

Otofaji, sitozolik bozunum sürecini oluşturan bir unsur olarak hücre içi patojenlere doğrudan zarar verebilir. Bununla birlikte çalışmalar, otofajik mekanizmaların ve otofajik bozunmanın virus üretimini inhibe edebileceği veya aktif olarak teşvik edebileceği sayısız başka yol bulunduğunu da ortaya koymuştur. Viruslarla otofaji arasındaki ilişki konusundaki anlayış, her geçen gün genişlemektedir. Onaylanmış tedavilerin hâlihazırda var olduğu bir yol olarak otofaji, şüphesiz önümüzdeki yıllarda antiviral tedaviler için zengin bir hedef kaynağı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Jackson WT. Viruses And The Autophagy Pathway. *Virology*, 2015; 479: 450-6.
2. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 1993; 333 (1-2): 169-174.
3. Harding, TM, Morano KA, Scott SV, Klionsky DJ. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol*, 1995; 131 (3): 591-602.
4. OncoTrust. <https://www.drozdogan.com/2016-nobel-tip-odulu-otofaji-calismalari-ile-yoshinori-ohsumiye-verildi/> (Erişim Tarihi: 25.12.2017).
5. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 2011; 147 (4): 728-41.
6. Büyük İ, Soydam-Aydın S, Aras S. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2012; 69 (2): 97-107.
7. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy And Cell Death. *Curr Top Dev Biol*, 2007; 78: 217-45.

8. Karadağ A. Otofaji: Programlı Hücre Ölümü. *Ank Sağ Hiz Derg*, 2016; 18 (2): 19-25.
9. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health ve disease: a double-edged sword. *Science*. 2004; 306 (5689): 990-95.
10. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell*, 2009; 34: 259-69.
11. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular ve molecular mechanisms. *J Pathol*, 2010; 221 (1): 3-12.
12. Behrends C, Fulda S. Receptor proteins in selective autophagy. *Int J Cell Biol*, 2012; 673290: 1-9.
13. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*, 2012; 69 (7): 1125-36.
14. Bejarano E, Cuervo AM. Chaperone-Mediated Autophagy. *Proceed Am Thorac Soc*. 2010; 7 (1): 29-39.
15. Burch GE, Harb JM. Electronmicroscopic studies of viral pancreatitis in coxsackie B4 virus infected mice. *Exp Mol Pathol*, 1979; 31: 23-35.
16. Suhy DA, Giddings TH, Kirkegaard K. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol*, 2000; 74: 8953-65.
17. Klein KA, Jackson WT. Human rhinovirus 2 induces the autophagic pathway and replicates more efficiently in autophagic cells. *J Virol* 2011; 85: 9651-54.
18. Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009; 106: 14046-51.
19. Panyasrivanit M, Khakpoor A, Wikan N, Smith DR. Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *J Gen Virol*, 2009; 90(2):448-56.
20. Heaton NS, Randall G. Denguevirus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe*, 2010; 8 (5): 422-32.
21. Oguzoglu TC, Muz D, Yılmaz V, Alkan F, Akça Y, Burgu İ. Molecular characterization of Bovine virus diarrhoea viruses species 2 (BVDV-2) from cattle in Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 2010; 42: 1175-80.
22. Oğuzoğlu TC, Muz D, Yılmaz V, Timurkan MÖ, Alkan F, Akça et al. Molecular Characteristics of Bovine Virus Diarrhoea Virus 1 Isolates from Turkey: Approaches for an Eradication Program. *Transbound Emerg Dis*, 2012; 59 (4): 303-10.
23. Fu Q, Shi H, Ren Y, Guo F, Ni W, Qiao J et al. Bovine viral diarrhoea virus infection induces autophagy in MDBK cells. *J Microbiol*, 2014; 52(7): 619-25.
24. Mrigendra KSR, Karim A, Mahmoud FD, Lyle JB, Jason K, Adam DH et al. Both cytopathic ve non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus (BVDV) induced autophagy at a similar rate. *Vet Immunol Immunopathol*, 2017; 193: 1-9.
25. Lussignol M, Queval C, Bernet-Camard MF, Cotte-Laffitte J, Beau I, Codogno P et al. The herpes simplex virus 1 Us11 protein inhibits autophagy through its interaction with the protein kinase PKR. *J Virology*, 2013; 87(2): 859-71.
26. Sinha SC, Colbert CL, Becker N, Wei Y, Levine B. Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the γ -herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11. *Autophagy*, 2008; 4(8): 989-97.
27. Beale R, Wise H, Stuart A, Ravenhill BJ, Digard P, Randow F. A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host Microbe*, 2014; 15 (2): 239-47.
28. Wong J, Zhang J, Si X, Gao G, Mao I, McManus BM, Luo H. Autophagosome supports coxsackievirus B3 replication in host cells. *J Virol*, 2008; 82(18): 9143-53.
29. Hung CH, Chen LW, Wang WH, Chang PJ, Chiu YF, Hung CC et al. Regulation of autophagic activation by Rta of epstein-barr virus via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Virol*, 2014; 88: 12133-45.
30. Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol*, 2009; 186: 255-68.
31. Liu B, Fang M, Hu Y, Huang B, Li N, Chang C, et al. Hepatitis B virus X protein inhibits autophagic degradation by impairing lysosomal maturation. *Autophagy*, 2014; 10: 416-30.
32. Buckingham EM, Carpenter JE, Jackson W, Grose C. Autophagy and the effects of its inhibition on varicella-zoster virus glycoprotein biosynthesis and infectivity. *J Virol*, 2014; 88 (2): 890-902.
33. Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol*, 1998; 72(11): 8586-96.
34. Dong X, Levine B. Autophagy ve Viruses: Adversaries or Allies? *J Innate Immun*, 2013; 5(5): 480-93.

35. Brandstadter JD, Yang Y. Natural Killer Cell Responses to Viral Infection. *J Innate Immun* 2011; 3: 274-9.
36. López-Soto A, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L, Gonzalez S. Involvement of autophagy in NK cell development and function. *Autophagy*, 2017; 13(3): 633-6.
37. Raftery MJ, Wolter E, Fillatreau S, Meisel H, Kaufmann SH, Schonrich G. NKT cells determine titer ve subtype profile of virus-specific IgG antibodies during herpes simplex virus infection. *J Immunol*, 2014; 192 (9): 4294-302.
38. Hwang S, Maloney NS, Bruinsma MW, Goel G, Dual E, Zhang L et al. Nondegradative role of Atg5-Atg12/Atg16L1 autophagy protein complex in anti viral activity of interferon gamma. *Cell Host Microbe*, 2012; 11: 397-409.
39. Moy RH, Gold B, Molleston JM, Schad V, Yanger K, Salzano MV et al. Antiviral autophagy restricts Rift Valley fever virus infection ve is conserved from flies to mammals. *Immunity*, 2014; 40: 51-65.
40. Delorme-Axford E, Donker RB, Mouillet JF, Chu T, Bayer A, Ouyang Y et al. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013; 110: 12048-53.
41. Mateo R, Nagamine CM, Spagnolo J, Méndez E, Rahe M, Gale M et al. Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation. *J Virol*, 2013; 87: 1312-21.
42. Richards AL, Jackson WT. Intracellular Vesicle Acidification Promotes Maturation of Infectious Poliovirus Particles. *PLoS Pathogens*, 2012; 8(11): 1-15.
43. Kemball CC, Alirezaei M, Flynn CT, Wood MR, Harkins S, Kiosses B et al. Coxsackie virus infection induces autophagy-like vesicles and megaphagosomes in pancreatic acinar cells in vivo. *J Virol*, 2010, 84: 12110-24.
44. Manuse MJ, Briggs CM, Parks GD. Replication-independent activation of human plasmacytoid dendritic cells by the paramyxovirus SV5 Requires TLR7 and autophagy pathways. *Virology*, 2010; 405: 383-9.
45. Ding B, Zhang G, Yang X, Zhang S, Chen L, Yan Q et al. Phosphoprotein of human parainfluenza virus type 3 blocks autophagosome-lysosome fusion to increase virus production. *Cell Host Microbe*, 2014; 15: 564-77.
46. Shi J, Wong J, Piesik P, Fung G, Zhang J, Jagdeo J et al. Cleavage of sequestosome 1/p62 by an enteroviral protease results in disrupted selective autophagy and impaired NFKB signaling. *Autophagy*, 2013; 9: 1591-603.
47. Coyne CB, Bozym R, Morosky SA, Hanna SL, Mukherjee A, Tudor M et al. Comparative RNAi screening reveal host factors involved in Enterovirus infection of polarized endothelial monolayers. *Cell Host Microbe*, 2011; 9: 70-82.
48. Zhang HT, Chen GG, Hu BG, Zhang ZY, Yun JP, He ML et al. Hepatitis B virus x protein induces autophagy via activating death-associated protein kinase. *J Viral Hepat*, 2014; 21: 642-9.
49. Li J, Liu Y, Wang Z, Liu K, Wang Y, Liu J et al. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J Virol*, 2011; 85 (13): 6319-33.
50. Nowag H, Guhl B, Thriene K, Romao S, Ziegler U, Dengjel J et al. Macroautophagy proteins assist Epstein-Barr virus production and get incorporated into the virus particles. *EBioMedicine*, 2014; 1: 116-25.
51. Duran JM, Anjard C, Stefan C, Loomis WF, Malhotra V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Bio*, 2010; 188: 527-36.
52. Bird SW, Maynard ND, Covert MW, Kirkegaard K. Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014; 111 (36): 13081-6.
53. Gonzalez ME, Carrasco L. Viroporins. *FEBS Letters*, 2003; 552 (1): 28-34.
54. Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res*, 2009; 143: 147-61.
55. Dong Y, Zeng CQ-Y, Ball JM, Estes MK, Morris AP. The rotavirus enterotoxin NSP4 mobilizes intracellular calcium in human intestinal cells by stimulating phospholipase C-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94 (8): 3960-5.
56. Crawford SE, Hyser JM, Utama B, Estes MK. Autophagy hijacked through viroporin-activated calcium/calmodulin-dependent kinase- β signaling is required for rotavirus replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012; 109: 3405-13.

Özel saklama koşulu gerektiren veya soğuk zincire tabi ilaçlar ve uygulamalar açısından değerlendirmeler

Drugs subject to special storage conditions or cold chain and evaluation in terms of applications

Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN¹, Asuman BOZKIR¹

ÖZET

Soğuk zincir; sıcaklığa hassas bir tıbbi ürünün hammadde aşamasından ambalajlı nihai ürüne dönüşüp kullanıcıya ulaşıncaya kadar geçen sürede ruhsat sahibinin öngördüğü onaylanmış sıcaklık aralıkları içerisinde kalmasını sağlayan, depolama, taşıma ve dağıtımında uygulanan özel saklama koşuludur. Soğuk zincir uygulamasına tâbi ürünler; immünomodülatörler, monoklonal antikorlar, hormonlar, enzimler, büyüme faktörleri, plazminojen aktivatörleri, koagülasyon faktörleri ve immünolojik ürünler şeklinde sınıflandırılabilir. Soğuk zincir uygulamalarının biyofarmasötik ürünün endüstride üretiminden, dağıtımına ve uygulanmasına kadar her aşamasında sağlanması gerekmektedir. Soğuk zincir kırılması durumunda ürünlerin uygulanması hasta sağlığı için risk oluştururken, bu ürünlerin bozularak atılması, üretiminde kullanılan hammaddelerin ve yöntemlerin maliyetli olması nedeniyle ülke ekonomisine zarar vermektedir. Biyofarmasötik ürünlerin, yapısında yer alan protein(ler)in kararsızlığı nedeniyle soğuk zincir uygulamasına ihtiyaç duyduğu saptanmıştır. Bu derlemede; biyolojik ve biyoteknolojik ürünlerin taşınması, saklanması ve dağıtım sırasında aktivite kaybı yaşanmaması ve ürün kalitesinin

ABSTRACT

Cold chain; is a special storage condition applied in the storage, transportation and distribution, which ensures that the temperature-sensitive medicinal product remains within the approved temperature ranges prescribed by the registration holder from the raw material stage to the packaged final product until reaching the user. Products subject to cold chain application can be classified as; immunomodulators, monoclonal antibodies, hormones, enzymes, growth factors, plasminogen activators, coagulation factors, immunological products. Cold chain applications determined by the authorities need to be supplied at every stage ranging from the industrial production, distribution and administration of biopharmaceutical products. While the application of products in case of cold chain breakage poses a risk to the patient health, the disruption of these products causes pecuniary damage to the country economy because of the use of expensive raw materials and methods in the production of these products. In this review, the cold chain conditions applied to biotechnological and biological products to avoid the loss of activity and to provide stability at every stage during transport, storage and distribution have been extensively assessed. Unlike synthetic drugs,

¹Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Asuman BOZKIR

Ankara Üni. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 06100 Ankara - Türkiye
Tel : +90 532 431 83 94 E-posta / E-mail : bozkir@pharmacy.ankara.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 26.01.2018
Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.67674

Küçüktürkm B, Bozkır A. Özel saklama koşulu gerektiren veya soğuk zincire tabi ilaçlar ve uygulamalar açısından değerlendirmeler.
Türk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(3): 305-322

her aşamada stabil kalması için uygulanan soğuk zincir koşulları kapsamlı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, biyofarmasötik ürünlerin temel yapısı olan proteinlerin degradasyon yolları ve degradasyona neden olma koşullarının preparatlar üzerindeki etkileri incelenmiş, donma ve sıcaklığa maruziyetin protein stabilitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bu kapsamda aşılardaki soğuk zincir uygulamaları, aşılardan nakli ve saklanma koşulları açısından verilen örneklerle değerlendirilmiştir. Bunu takiben soğuk zincir yönetimi ile ilgili uluslararası düzenlemeler, kılavuzlar ve Türkiye'deki soğuk zincir uygulamalarına yer verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: soğuk zincir, protein degradasyonu, liyofilizasyon, aşı, stabilite

biopharmaceutical products were found to require cold chain application due to protein instability. In addition, the degradation pathways of proteins, the basic structure of biopharmaceutical products, and the effect of degradation causing conditions on preparations were examined and the effect of exposure to freezing and exposure to temperature on protein stability was evaluated. In this context, cold chain applications have been evaluated with the examples given for transport and storage conditions of the vaccines. Following this, international regulations and guidelines on cold chain management and cold chain applications in Turkey have been included.

Key Words: cold chain, protein degradation, lyophilization, vaccine, stability

GİRİŞ

Hastalıkların tanısında, tedavisinde ve hastalıklardan korunmada kullanılan tıbbi ürünlerin üretiminde sağlanan stabilitenin raf ömrü boyunca korunması için etiketlerinde belirlenmiş saklama koşullarına uyulmalıdır. Bazı tıbbi ürünler için özel saklama koşulu veya soğuk zincir uygulamaları gerekmektedir. Soğuk zincir; sıcaklığa hassas bir tıbbi ürünün hammadde aşamasından ambalajlı nihai ürüne dönüşüp kullanıcıya ulaşıncaya kadar geçen sürede, ruhsat sahibinin öngördüğü onaylanmış sıcaklık aralıkları içerisinde kalmasını sağlayan, depolama, taşıma ve dağıtımında uygulanan özel saklama koşuludur. Ürün kalitesi ve stabilitesinin değişmemesi için taşıma sırasında soğuk zincir sıcaklığının devam ettirilmesi, bu amaçla sıcaklığının kontrolünün sağlanması zorunludur (1). Bu nedenle derlemede soğuk zincire tabi biyolojik/biyoteknolojik ürünlerde stabilitenin ürünün kullanımına kadar korunması için neden soğuk zincirle saklanması gerektiğinin WHO (World Health Organization), ICH

(International Conference on Harmonisation) ve EMA (European Medicines Agency) kılavuzlarınınca belirtilen soğuk zincir uygulama kurallarının ve ülkemizdeki uygulamaların anlatılması amaçlanmıştır.

Biyofarmasötik (Biyolojik/Biyoteknolojik) Ürünlerin Özellikleri

Avrupa Birliği biyolojik maddeyi; biyolojik bir kaynaktan üretilen veya ekstre edilen, fiziksel, kimyasal ve biyolojik test kombinasyonu ile karakterize edilen, üretim süreci kontrolünün sağlandığı maddeler olarak tanımlamıştır. Biyolojik/biyoteknolojik tıbbi ürünler; immünolojik ürünleri (aşılar), kan ve plazma ürünlerini, monoklonal antikorları, peptidomimetikleri, gen ilaçlarını ve rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş protein ve peptid yapıda ilaçları içerir (2).

Biyofarmasötik ürünlerin çoğu büyük moleküllü, karmaşık ve altbirimli yapılar

içerirler. Biyofarmasötiklerin biyolojik kaynakları ve üretimleri kendilerine özgüdür ve üretimin her aşaması için hassas biyokimyasal analizler gereklidir. Biyofarmasötik aktif maddelerin yapısal, işlevsel, güvenilirlik ve etkinlikleri ile ilgili özellikleri ana yapılarının yanısıra üretim metodlarıyla da ilişkilidir (3,4). Çalışmalarımızda uygulanan farklı formülasyonlar, formülasyon yardımcı maddeleri ve uygulamaları ile biyolojik/biyoteknolojik etkin maddelerin ve antijenlerin etkinlikleri stabiliteyi korunarak artırılmıştır (5-9). Değişken oksidasyon durumları, moleküllerin agregasyonu, disülfür bağları oluşturmaları, amidasyon, glikozilasyon gibi üretim sonrası görülen yapısal değişimler biyofarmasötik ürünleri farklı kılar. Bazı biyofarmasötiklerin üretim aşamasında hücreler veya organizmalar da yer alır. Bu da moleküler karakterizasyonlarını tam olarak belirlemeyi güçleştirir (10). Biyolojik ürünlerin moleküler yapısındaki kovalan ve kovalan olmayan etkileşimlerin, aktivite kaybına yol açmaması için ürün stabilizasyonunun sağlanması ve soğuk zincir uygulaması ile bunun sürdürülmesi de önem taşımaktadır (11).

Soğuk zincir ile taşınan bu ürünler, izole edilen

veya rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen iyi karakterize edilmiş proteinleri ve polipeptidleri kapsar (12). Bu ürünler; immünomodülatörler, monoklonal antikorlar, hormonlar, enzimler, büyüme faktörleri, plazminojen aktivatörleri, koagülasyon faktörleri, immünolojik ürünler şeklinde sınıflandırılabilir.

Protein Yapısı ve stabilizasyonu

Proteinik moleküllerin başlıca birincil, ikincil, üçüncül ve tersiyer yapıları yanısıra yapılar arasında spesifik olmayan hidrofobik etkileşimleri, spesifik etkileşimleri (tuz köprüleri, hidrojen bağları, disülfür bağları) görülür. Bazı protein moleküllerinin ise disülfür bağlarının kovalan olmayan etkileşimleriyle birkaç polipeptid zincirinin birleşmesi ile oluşan dördüncül yapıları da bulunur. Proteinik yapılar işlevleri ile doğrudan ilişkilidir. Yapının şeklini bozacak her türlü olumsuz etki proteinik yapının biyolojik aktivitesini engeller (12, 13).

Proteinler; doğal çevrelerinden uzaklaştığında kararsız yapıdadırlar. Proteinlerin kararsızlıklarına neden olan faktörler ve stabilizasyon yolları Tablo 1’de özetlenmiştir. Biyolojik/biyoteknolojik ürünlerin

Tablo 1. Protein kararsızlığına etki eden faktörler ve proteinlerin stabilizasyonu [14].

Protein Kararsızlığı			Protein Stabilizasyonu
Kimyasal	Yapısal	Mutasyonel	
- Hidroliz	- pH		-Çözelti oluşturma
- Oksidasyon	-Hidrofobik yapı		-İmmobilize etme
- β-Eliminasyon	- Basınç		-Kofaktör/Substrat ekleme
- İzopeptid oluşumu	- Sorbsiyon		-Aşırı soğutma
- Rasemizasyon	- İmmobilizasyon	-Dizilim değişimi	-Çapraz bağ oluşturma
- S-S yer değiştirmesi	-Metalbağlanması		-Kimyasal modifikasyon
- Tiyo/S-S alışverişi	- Sıcaklık/Isı		-Katı formda tutma
- Maillard reaksiyonu	- Sürtünme		-Dondurma
	- Liyotropizm		-Mutasyon

tamponlama koşulları korunmazsa çözünürlükleri azalır ve biyolojik aktiviteleri kaybolur. Proteinik moleküller Tablo 2'deki reaksiyonlar sonucu aktivitelerini kaybedebilir (14).

Proteinlerin doğal yapısı ve saklama koşullarına göre raf ömrü değişmektedir. Her protein için uygun saklama koşulu kendine özgüdür. Proteinlerin saklama sıcaklıkları değişiklik göstermektedir (Tablo 3). Ürünleri mikrobiyal ve proteolitik degradasyondan korumak için gerekli önlem alınmalıdır. Liyofilizasyon işlemi degradasyonu azaltarak proteinin uzun süreli saklanmasını sağlayabilir (15).

Protein ve peptid yapıları formülasyonlarda karşılaşılan en büyük sorun raf ömürleri süresince stabilitelerinin sağlanma gücüdür. Proteinler, en stabil olduğu sıcaklık ve pH koşulları altında muhafaza edilmelidir. Çoğu protein buzdolabı koşullarında stabildir ve liyofilize ürün olarak bulunmaktadır (16). Bazı durumlarda, peptid ve proteinleri normal buzdolabı sıcaklığında saklamak, kimyasal ve fiziksel bozunmasına karşı korumada yeterli olmayabilir. Örneğin; sığır insülinini deamidasyon ve polimerizasyon reaksiyonlarından korumak için -20 °C'de saklamak gerekmektedir (17). Donma-çözme döngüleri protein stabilitesini bozabileceği için ürünlerin dondurulmuş halde tek kullanımlık flakonlarda saklanması en iyi yoldur (15).

Proteinlerin, yapısal değişimlerine ve denatürasyonlarına yol açan mekanizmalar önlendiğinde en kararlı hale ulaşırlar. Bu yüzden proteinlerin kristalize formları ya da yoğun viskoziteye sahip camsı amorf matris formları (örneğin liyofilizasyon veya püskürterek kurutma yöntemi kullanılmış ürün) oldukça stabildir. Protein yapıları biyolojik/biyoteknolojik ürünün stabilizasyonunda kullanılan her yöntemin amacı, uygun bir raf ömrü sağlamaktır. Biyomoleküllerin stabilizasyonu amacıyla geleneksel yöntemler (liyofilizasyon, katkı maddelerinin kullanımı, püskürterek kurutma) ve yeni yöntemler (aşırı soğutma, permazim yöntemi) kullanılmaktadır. Liyofilizasyon, biyomoleküllerin stabilizasyonu için en çok tercih edilen yöntemdir (14, 18, 19).

Liyofilizasyon

Protein yapısındaki aktif maddelerin çoğu parenteral olarak kullanılmaktadır. Çözelti stabilitesi düşük olduğundan, stabilizeyi artırmak ve raf ömrünü uzatmak için çoğunlukla liyofilize edilirler. Spiers ve arkadaşları (1999) tarafından mukozal ve parenteral aşılama için hazırlanan rekombinant V ve F1 antijenlerini içeren mikroküre formülasyonunun eldesinde liyofilizasyon yöntemi kullanılmıştır. Rekombinant V ve F1 antijenlerinin

Tablo 2. Protein yapıları biyofarmasötik ürünlerde degradasyon mekanizmaları

Stabiliteyi Bozan Kimyasal Durumlar	Stabiliteyi Bozan Fiziksel Durumlar
1. Hidroliz Deamidasyon Molekül İçi Aminolizis Transpeptidasyon	1. Denatürasyon 2. Yüzey Adsorpsiyonu 3. Agregasyon 4. Presipitasyon
2. Oksidasyon	
3. Rasemizasyon	
4. β-Eliminasyon	
5. Disülfür Yerdeğişimi	

Tablo 3. Proteinlerin saklama koşullarının karşılaştırılması [15].

Karakteristik	Saklama Koşulları			
	4 °C'de çözünmüş	-20 °C'de etilen glikol veya %25-50 gliserol içinde çözünmüş	-20 °C'den -80 °C'ye kadar dondurulmuş veya sıvı azot içinde	Liyofilize
Genel raf ömrü	1 Ay	1 Yıl	Birkaç yıl	Birkaç yıl
Gerekli steril koşullar veya eklenen koruyucular	Evet	Genellikle	Hayır	Hayır
Bir ürünün kullanılma sayısı	Çoğu kez	Çoğu kez	Bir kez; donma-çözme döngüsü proteinleri degrade eder.	Bir kez; liyofilize bir ürünün çoklu kullanımı elverişsizdir.

37 °C'deki konsantrasyonu ve immünolojik aktivitesi iki haftanın üzerinde değişmeden kalmıştır (20). Liyofilize tozlar, sulandırılmadıkları sürece oldukça stabildirler. Örneğin Activase® liyofilize toz, kontrollü oda sıcaklığında dört yıldan daha fazla saklansa dahi önemli bir aktivite kaybı göstermemiştir (21). Liyofilizasyon genel olarak başarılı bir yöntem olsa da işlem süresince veya saklama koşullarında proteinler inaktif duruma geçebilmektedir. Liyofilize proteinlerin degradasyonuna çoğunlukla neme bağlı agregasyon neden olmaktadır (17). Albümin, insülin, β-galaktosidaz ve ribonükleaz A gibi proteinlerin çözelti içindeki agregasyonları non-kovalent güçlere bağlıyken, katı haldeki agregasyonları kovalent güçlere bağlıdır. Örneğin; albümin nem içeriği yüksek olduğunda agregasyona uğrar ve çözünürlüğü azalır. Liyofilize β-galaktozidazda yapılan bir çalışmada yüksek su miktarının denatürasyon oranını artırdığı gözlemlenmiştir (22). Liyofilize yapıların amorf bileşenlerinin kristalizasyonu, saklama süresince gözlenen bir diğer olaydır. Su adsorpsiyonu çökmeye ve moleküler hareketliliğin azalmasına neden olurken, kristalizasyonun gelişmesine yol açar (23).

Ürünün saklama süresince stabil kalması için, saklama sıcaklığı camsı geçiş sıcaklığının altında olmak zorundadır. Protein degradasyonu, T_g'den daha düşük sıcaklıkta (camsı durumda) azalmakta bunun aksine T_g'ye yakın sıcaklıklarda (kauçuk durumda) bu oran artmaktadır (23).

Bitmiş ürün formülasyonuna eklenen yardımcı maddelerin doğru seçimi, kurutma zamanının kısalmasına yardım eder ve stabil bir ürün oluşturulmasını sağlar. Protein çözeltisinin stabilitesinde; konsantrasyon, sıcaklık, pH, tuz ve/veya eklenen koruyucu türü gibi stabilizeyi bozan olası etkenlerin, suyun aşamalı olarak uzaklaştırıldığı dondurma aşamasında önemli değişiklikler meydana getirdiği bilinmelidir. Dondurma koşullarının optimizasyonu, homojen bir bileşim ve dokuya sahip donmuş protein konsantrasyonu oluşturmada önem taşımaktadır (14).

Soğuk Zincir

Biyoteknolojik ürünlerin çoğu reaktif yapıda olup kararsız ve pahalıdır. Proteinik yapıları

sıcaklık, karıştırma süresi ve hızı, formülasyona giren maddelerin eklenme sırası, pH ayarlanması ve kontrolü, filtre ve kapların yüzeyleriyle temas etme süresi gibi çevresel koşullara ve imalat koşullarına karşı çok hassastır. Bunun sonucunda üretimi, ambalajlanması ve saklanması son derece dikkat gerektirir ve kullanıldığı tüm alanlarda yapısının kontrolünün sağlanması gerekir (24, 25).

Soğuk zincir, biyolojik/biyoteknolojik ürünlerin ve özellikle aşıların saklanmasında kullanılan sıcaklık koşullarını içeren sistemdir. Ürünleri üretim noktasından uygulama noktasına kadar, önerilen sıcaklık aralıklarında tutmak için tasarlanan bir dizi uygulamadan meydana gelmiştir (Şekil 1). Alt satırdaki oklar biyolojik/biyoteknolojik ürünlerin sağlık tesislerine akışını, üst satırdaki oklar verilerin toplanıp, kaydedilip, kontrol ve analiz edilip, raporlanıp yedeklenerek sonraki zincirdeki akışını gösterir. Bu diziyi takip etmek soğuk zincir performansının düzenli izlenmesini ve soğuk zincir uygulaması ile ilgili gerekli bilgilerin toplanmasını sağlar (26).

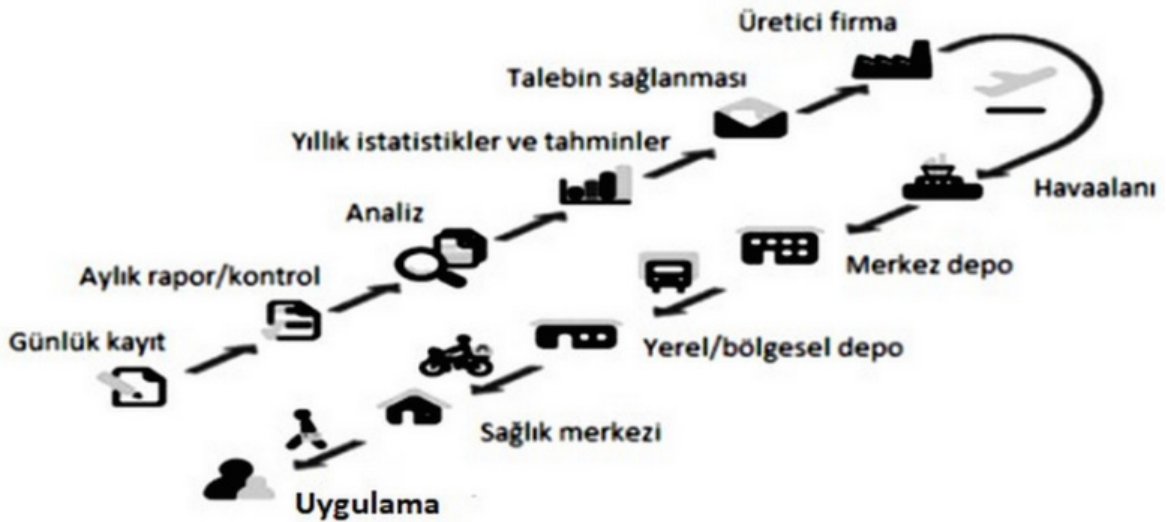
Bu bölümde soğuk zincir işleyişi aşılar üzerindeki örneklerle anlatılmıştır ancak genel kuralları tüm soğuk zincire tabi ilaçlar için geçerlidir.

Aşılarda Soğuk Zincir Uygulaması

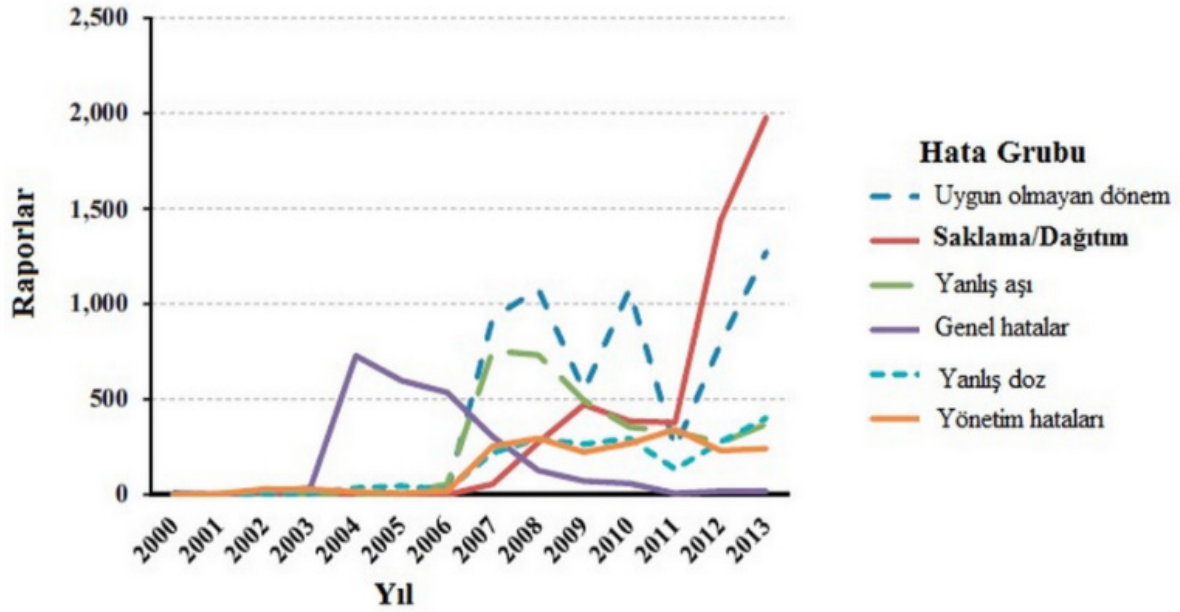
Güvenilir bir aşı soğuk zincir sistemi oluşturmak için, aşağıda belirtilen temel prosedürler takip edilmelidir:

- Aşılar ve dilüe edici maddeler her aşamada gerekli sıcaklık aralığında saklanmalıdır.
- Aşıların paketlenmesi ve taşınması tavsiye edilen prosedürlere uygun olarak yapılmalıdır.
- Aşılama süresince de soğuk zincir kurallarına uyulmalıdır (24).

FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) ve Amerikan Halk Sağlığı Birimi tarafından desteklenen Aşı Yan Etki Bildirim Sistemi (The Vaccine Adverse Event Reporting System-VAERS) verilerine göre, 2000-2013 yılları arasında ABD’de raporlanan aşılama hatalarının %23’ünün saklama ve hazırlama aşamalarından kaynaklandığı tespit edilmiştir (Şekil 2). Bu hataların çoğuna aşının stabil olduğu saklama sıcaklığı dışında tutulması veya tavsiye edilen saklama sıcaklığından daha düşük bir sıcaklığa maruz kalması neden olmuştur. Hata grubu verilerinde, buzdolabı/dondurucu sıcaklığı uygun olmadığı ve hastalara yanlış sıcaklıkta muhafaza edilen aşıların uygulandığı belirlenmiştir (27).



Şekil 1. Soğuk zincir aşamaları [26]



Şekil 2. 2000-2013 yılları arası aşılama hataları dağılım grubu VAERS raporu.

Aşılar için Gerekli olan Sıcaklık

Aşılar çevre koşullarına hassas biyolojik ürünlerdir. Bazı aşılar donmaya, bazıları sıcaklık artışına veya ışığa duyarlıdır. Aşının etkisi, yani aşılanmış hastada yeterince koruma sağlaması, aşının uygun olmayan sıcaklık koşullarına maruz kalması ile azalabilir ve kaybedilen etki (biyolojik aktivite) tekrar kazanılamaz.

Aşıların kalitesi ve stabilitesi belirli sıcaklığı sağlayan soğuk zincir uygulaması kullanılarak korunur. En çok kullanılan aşılar için saklama sıcaklıkları Tablo 4'te verilmiştir ve dondurulmuş aşılar -15 ile -25 °C arası, buzdolabında saklanması gereken ve asla dondurulmaması gereken aşılar ise +2 - +8 °C arası sıcaklık olarak belirlenmiştir (28).

Tablo 4. Soğuk zincirin her aşamasında bazı aşıların tavsiye edilen saklama sıcaklıkları.

Aşı	Merkez Depo	Bölge Depoları	İl/ilçe	Sağlık Ocağı
Depolama süresi	6 Ay	3 Ay	1 Ay	1 Ay
Oral polio				
Kızamık	-15 °C ile -25 °C arası	-15 °C ile -25 °C arası	-15 °C ile -25 °C arası	-0 °C ile +8 °C arası
Kabakulak				
DBT				
HepB				
DT				
Td	-0 °C ile +8 °C arası	-0 °C ile +8 °C arası	-0 °C ile +8 °C arası	-0 °C ile +8 °C arası
TT				
BCG				

Donmaya ve Isıya Karşı Hassasiyet

Aşıların değişen ısıya karşı duyarlılığı Şekil 3'de gösterilmektedir. Bu aşılarda altı kategoride incelenmektedir. Isıya en hassas grup A grubu, en az hassas olan F grubudur (24).

Saklama koşulları ısıya hassasiyet gösteren liyofilize aşıların sadece açılmamış flakonlarında geçerlidir; çoğu liyofilize aşılar rekonstitüe edildikten sonra etkisini hızlıca kaybeder. Aşılama esnasında veya ilk 6 saat içerisinde +2 ve +8°C arasındaki sıcaklığın korunması sağlanmalıdır. Aşıların donmaya maruz kalması da soğuk zincir aşamasında problemler meydana getirmektedir. Donma, özellikle alüminyum adjuvanlı aşılarda geri dönüşsüz aktivite kaybına yol açar. Donmaya karşı koruma ya da sıvı aşıların kriyoprotektanlarla korunması, özellikle alüminyum hidroksit ve alüminyum fosfat gibi tuzların adjuvan olarak kullanıldığı aşılarda çok önemlidir. Adsorbe aşıların (DBT ve tetanoz aşısı) donmaya maruz kalması durumunda içerisindeki alüminyum hidroksit kristalleşir ve aşının etkinliğinin kaybedilmesine, aşı uygulama yerinde apse oluşumuna yol açtığı bilinmektedir. Difteri, tetanoz, boğmaca, hepatit B ve Haemophilus tip b konjuge aşılarında koruyucu maddenin formülasyonda kullanımı en az 3 donma-

çözme döngüsüne karşı aşığı korumuştur. Alüminyum adjuvanlı aşıların donmaya karşı korunmasında yüksek konsantrasyonda (%20) poloksamer 407 uygun bulunmuştur (29). Braun ve ark.(2009) yaptıkları çalışmada, -20°C'de tekrarlanan donmaya karşı stabil olan ve 37°C'de 12 ay süresince stabil kalan yeni bir Hepatit B aşısı formülasyonu geliştirmişlerdir. Bu termostabil aşının pH'sı 5.2'dir ve orijinal aşı içeriğinin yanısıra %7.5 (h/h) propilen glikol, 40 mM fosfat ve 40 mM histidin içermektedir. Propilen glikol donmaya karşı stabilite sağlarken diğer bileşenler ısıya karşı stabilite sağlamaktadır. Bu formülasyonun, tavşanlarda yapılan deneylerde lokal ve sistemik yan etki göstermediği, iyi tolere edildiği gözlenmiştir (30). Hepatit B aşısının stabilitesinin artırılması; aşı etkinliğinin sağlanması, bağışıklık kapsamının uzaması, aşılama lojistiğinin basitleşmesi ve soğuk zincire ait maliyetin düşürülmesi açısından önem taşır. Kesinlikle dondurulmaması gereken aşılarda; kolera, DTaP-hepatit B-Hib-IPV (hexavalent), DTwP ya da DTwP-hepatitis B-Hib (pentavalent), Hepatit B, Hib, insan papillomavirüs (HPV), inaktif poliovirüs (IPV), influenza, pnömokok, rotavirus, tetanoz, DT ve Td'dir. Bu aşıların bir kez donmaya maruz kaldıklarında tekrar kullanılmaları mümkün değildir.

Isıya çok duyarlı			Isıya az duyarlı		
Grup A	Grup B	Grup C	Grup D	Grup E	Grup F
Oral Poliovirüs (OPV)	İnfluenza	İnaktif Poliovirüs (IPV) Japon Ensefaliti (Liyofilize) Kızamık yada kızamık-kızamıkçık yada kızamık-kabakulak-kızamıkçık (Liyofilize)	Kolera DTaP-Hepatit B-Hib-IPV (Heksavalent) DTwP ya da DTwP-HepatitB-Hib (Pentavalent) Hib (Sıvı) Kızamık (Liyofilize) Rotavirüs (sıvı yada liyofilize) Kızamıkçık (Liyofilize) Sarıhumma (Liyofilize)	Verem (BCG) İnsan Papilloma Virüsü (HPV) Japon Ensefaliti Tetanoz	Hepatit B Hib (liyofilize) Meningokok A Pnömokok

Şekil 3. Soldan sağa doğru ısıya en duyarlı aşılardan en az duyarlı aşıya doğru gruplandırma.

İşığa Hassasiyet

İşığa maruz kaldığında etkisini kaybeden aşılarda her zaman güneş ışığından veya yapay bir ışık kaynağından korunmalıdır. BCG, kızamık, kızamıkçık ve kabakulak aşılarda bu gruptadır. Bu aşılarda genellikle ışık hasarından koruyan koyu renkli cam flakonlarda saklanır (24).

Kontrollü Sıcaklık Zinciri

Aşıların uygunluğunun saptanması Kontrollü Sıcaklık Zinciri (Controlled Temperature Chain-CTC) ile incelenmektedir. WHO, kontrollü sıcaklık zincirini sınırlı zaman aralığında +2°C ile +8°C arası soğuk zincirin dışına çıkmış aşılarda bir WHO-önyeterlilik göstergesi olarak tanımlamaktadır. Aşılarda, +40°C nin üzerindeki sıcaklıklarda sadece kullanımdan hemen önce bulunabilir. CTC yaklaşımı, ülkelere göre özel stratejiler veya toplu aşılama kampanyaları gibi koşullar belirlenerek kabul edilir ve aşılarda bir CTC'ye göre ruhsatlandırılabilir (24).

Sağlık Merkezlerinde veya Merkeze Uzak Bölgelerdeki Sağlık Kurumlarında Soğuk Zincir

Sağlık merkezlerinde aşılarda aşağıda belirtilen maddeler uygulanarak korunabilir:

- Aşı, uygun sıcaklıkta muhafaza edilmelidir.
- Sıcaklığın +2°C ve +8°C arasında kalmasını sağlamak için sıcaklık izleme cihazı kullanılmalıdır.
- Aşı, uygun sıcaklıkta muhafazasını sağlayacak şekilde hazırlanmış bir aşı nakil kabı içinde uygulanacağı bölgeye nakledilmelidir.
- Aşılama süresince, aşı nakil kabının üstüne köpük koruyucu (varsa) takılmalıdır.

Sağlık kuruluşunda, bir kişi aşıların soğuk zincir yönetiminin genel sorumluluğunu almak zorundadır. Asıl kişi olmadığı zaman ikinci kişi bu sorumluluğun sahibidir. Bu kişiler sabah ve gün sonunda olmak üzere günde iki kez aşı sıcaklıklarını kontrol etmek

ve kayıt altına almak, aşılarda, seyrelticileri ve su akülerini uygun bir şekilde saklamak ve soğuk zincir ekipmanlarının bakımını sağlamaktan sorumludur. Bir sağlık kurumundaki tüm sağlık çalışanlarının, soğuk zincirin nasıl izleneceğini ve sıcaklık tanımlanan değerlerin dışına çıktığında ne yapacaklarını bilmeleri gerekmektedir (24).

Sağlık Merkezlerinde Soğuk Zincir Ekipmanı

Soğuk zincir sistemi, aşılarda ve seyrelticilerin gereken sıcaklık aralığında taşınması ve saklanması için farklı tipte ekipmanlara ihtiyaç duyar. Aşıların taşınmasında genellikle soğuk ve dondurucu odalar, buzdolapları, soğuk kutular ve bazı durumlarda taşıma için soğuk hava düzeneğine sahip kamyonlar kullanılır. Sağlık merkezi veya sağlık ocağında ise buzdolapları (bazı durumlarda dondurulmuş/soğutulmuş su aküleri), soğuk kutular ve aşı nakil kapları kullanılır. Aşılama programlarında kullanılan her seviyedeki soğuk zincir ekipmanının optimum performans sağlaması için WHO'nun tanımladığı ön-yeterlilik standartlarına veya ulusal düzenleyici kurumların belirlediği ilgili teknik spesifikasyonlara uygun olması zorunludur (24).

Buzdolabı

Aşıların saklanması için en emniyetli güç kaynağı seçilmelidir. Ev tipi buzdolapları aşı saklanmasına özel olarak dizayn edilmediği için WHO tarafından tavsiye edilmemektedir. 2009'dan beri tüm WHO ön-yeterliliğine sahip buz kaplı, güneş bataryalı ve güneşi direkt kullanan buzdolapları; kullanıcı tarafından ayarlanamayan termostatlarla donatılmıştır. Güç kesintileri çok uzun süreli olmadığında, bu buzdolaplarının sıcaklığı her zaman +2°C ile +8°C arasında olmalıdır. Havanın serbestçe sirkülasyonu için preparatlar aralıklı yerleştirilmeli, her zaman aşılarda ve seyrelticilerin etrafına geniş yer bırakılmalıdır. Buzdolabı, en az bir aylık aşı ve seyreltici tedarikini sağlayacak, aşı ve seyrelticilerin bir veya iki haftalık

yedek stoklarına yer verebilecek, dondurucu/soğutucusunda en az dört su aküsü içerecek bölmeye sahip olmalıdır (31, 32).

Soğuk Kutular

Soğuk kutular, taşıma sırasında veya kısa süreli saklamada aşı ve seyrelticilerin gerekli sıcaklık aralığında kalmasını sağlayan su veya buz aküleri ile kaplı yalıtılmış kutulardır. Modeline bağlı olarak soğuk kutular, aşıları iki günlük periyotlarda veya elektriğin olmadığı, buzdolabının bozuk olduğu veya buzunu çözmek gerektiği zaman saklayabilir. Bir kere paketlenildiği zaman soğuk kutular aşı ihtiyacı olana kadar açılmamalıdır. Sağlık kuruluşundaki soğuk kutular aşı ve seyrelticileri saklamak üzere eldeki stok miktarına uygun olmalıdır. Soğuk kutuların, farklı aşı saklama kapasitesine ve gereken su veya buz aküsü sayısı ve boyutuna göre değişen modelleri vardır. Soğuk kutular, ilçelerden sağlık kurumlarına aylık aşı stoğu taşımak ve bu kurumlardan daha uzak bölgelere, aşı nakil kaplarının yetersiz olduğu durumlarda aşığı taşımak için kullanılır (24).

Aşı Nakil Kapları

Soğuk kutulardan daha küçük boyutta ve taşımının daha kolay olduğu aşı nakil kapları, aşı ve seyrelticileri aşılama dönemlerinde sağlık kurumundan daha uzak bölgelere taşımak, buzdolabı bozulduğunda aşıları geçici olarak saklamak, ilçe sağlık kurumlarından küçük sağlık kuruluşlarına aylık aşı stoğu göndermek için kullanılırlar (31, 32). Aşı taşıyıcıları, +43°C'de test edildiklerinde soğuk zincirde kalma süreleri, buz aküleri ile birlikte 18 saat ile 50 saat arası, soğuk su aküleri ile birlikte 3 saat ile 18 saat arası değişmektedir (24).

Soğuk Su veya Buz Aküleri

Düz, sızdırmaz plastik kaplar olan su aküleri su ile doldurularak soğuk kutu veya aşı taşıyıcılarının içine bir hat boyunca yerleştirilirler. Bu şekilde

aşıların gerekli sıcaklık aralığında tutulmasını sağlarlar. Aşıların korunması için taşıyıcı kapaklarının içine basılmış talimatları uygulamak, doğru sayıda ve büyüklükte su aküsü kullanmak önemlidir. En yüksek performansın sağlanması için WHO tarafından önerilen su aküleri kullanılmalıdır. Sağlık kurumları, her bir soğuk kutu ve aşı taşıyıcısı için en az 2 takım su aküsü bulundurmamak zorundadır. Böylece bir set dondurucuda veya buzdolabında donarsa veya soğursa diğer set kullanılabilir (31, 32). Donmuş buz aküleri, -10°C ve -25°C sıcaklıklar arasındaki bir dondurucudan doğrudan alınmalıdır. WHO, soğuk zincir gerektiren ürünlerde kuru buz kullanımını doğru bulmamaktadır. Ürünle doğrudan temas eden kuru buzlar donmaya hassas biyofarmasötiklerde olumsuz etkilere yol açıp aktivite kaybına neden olmaktadır (33).

Köpük Koruyucular

Köpük koruyucular, bir aşı taşıyıcısı içindeki su akülerinin üstüne tam olarak uyan ve aşı taşıyıcısının kapağının tamamen kapanmasını sağlayan yumuşak süngerimsi malzemedir. Aşı taşıyıcısı üreticileri tarafından temin edilir. Köpük koruyucular, aşı flakonlarının rahatça yerleştirilmesine ve korunmasına göre kesilir. Aşılama esnasında, açılmamış flakonlar taşıyıcı içinde soğukta tutulurken, ısıya duyarlı aşıların açılmış flakonlar köpük koruyucular içinde sıcaklığın hasarından uzun süre korunabilir (24).

Sıcaklık Takip Cihazları

Soğuk zincir yönetimi boyunca aşıların sıcaklıklarının izlenmesi ve kayıt altına alınması zorunludur. Aşıların doğru sıcaklıkta saklandığını ve taşındığını kanıtlamanın tek yolu bu süreçlerde sıcaklık takip cihazı kullanılmasıdır. Sıcaklık izlem göstergeleri çok çeşitlidir. Tek üniteye veya çoklu kutulara uygulanmasına göre, zamana bağlı kümülatif sıcaklığı ölçmesi veya önerilen sıcaklığın aşıldığını göstermesine göre değişen 30 günlük elektronik sıcaklık kaydediciler, elektronik donma indikatörleri, entegre dijital termometreler, cıvalı termometreler

gibi çeşitleri vardır.

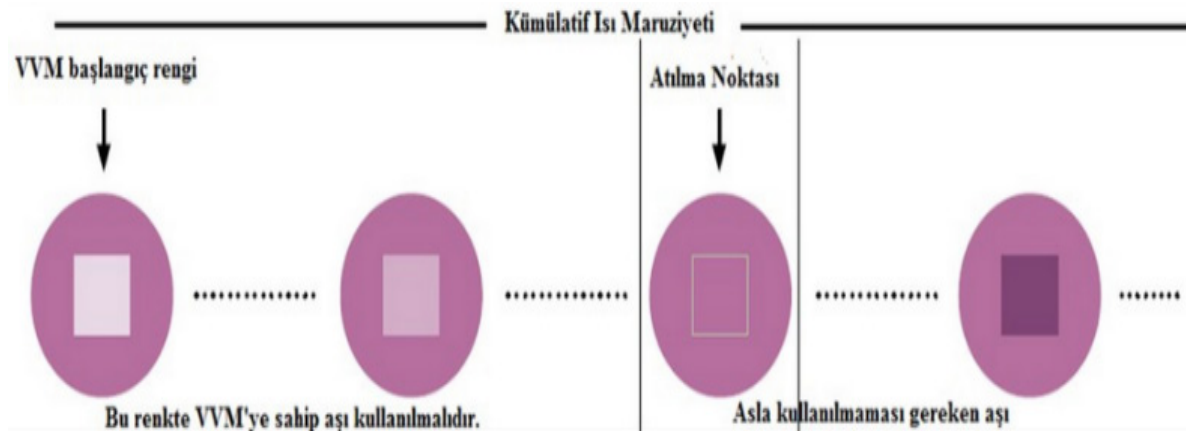
WHO, United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF) gibi kuruluşlar ve bazı ülkelerin sağlık bakanlıkları ısıya duyarlı aşılarda izlenmesinde ilk olarak Vaccine Vial Monitors (VVM) göstergelerini kullanmışlardır. VVM, soğuk zincir boyunca aşılarla eşlik eden, aşının sıcaklığını takip eden, üretici tarafından aşının içinde bulunduğu flakon, ampul veya damlalığa yapıştırılmış kimyasal bir indikatör etiketidir. Aşı, soğuk zincir süresince hareket ettikçe, VVM tarafından kümülatif ısı maruziyeti aşamalı renk değişimi sağlanarak kaydedilir (Şekil 4). Eğer daire içindeki karenin rengi daire ile aynı renkte veya daha koyu ise aşı yüksek miktarda ısıya maruz kalmıştır, kullanılmamalı ve atılmalıdır. VVM'nin amacı ısıya maruz kalmış aşılarda uygulanmamasını sağlamaktır. İlk olarak hangi aşı grubunun kullanılması gerektiğini tayin etmede yardımcı olur. Eğer VVM flakon üzerindeki etikete yapıştırılmışsa aşı flakonunu bir kez açıldığında onu izleyen 28 günlük bağışıklama süresi boyunca, ürünün formülasyonu (sıvı veya lyofilize) göz ardı edilerek kullanılabilir. VVM'in etiket üzerinden başka bir yere örneğin kapak üzerine veya ampulün boynuna yapıştırıldığı aşılarda bir kez açıldığında aşılama sonunda veya açıldıktan sonra altı saat içinde atılmalıdır (34). Aşı izlem monitörleri, donmaya maruziyeti ölçmezler. Eğer aşı donmaya karşı hassas ise ve donmadan şüpheleniliyorsa çalkalama

testine başvurulmalıdır.

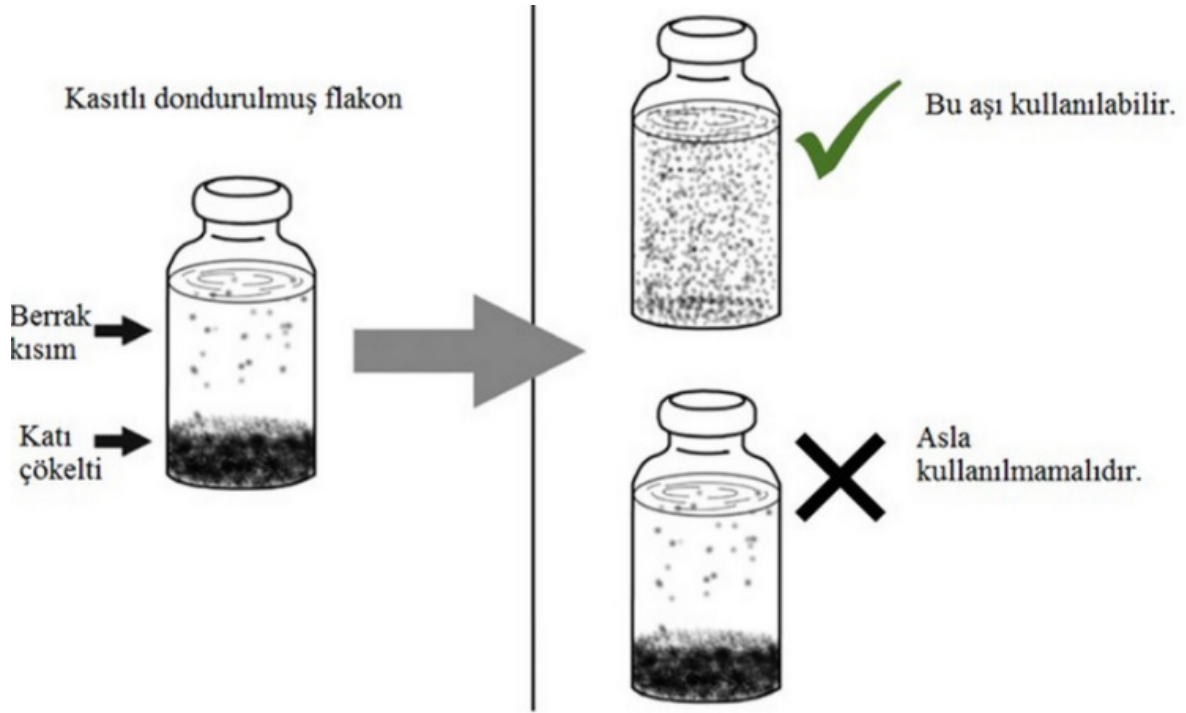
Çalkalama Testi

Çalkalama testi, 0°C'nin altındaki sıcaklıklara maruz kalan, donmaya karşı hassas aşılarda hasara uğrayıp uğramadığını kontrol etmek için kullanılmaktadır. WHO tarafından belirlenen sadece tek bir çalkalama testi yöntemi kullanılabilir. Uluslararası taşımalarda çalkalama testi rastgele aşı örnekleri üzerinde yapılmalıdır. Fakat birden fazla seri taşıma ürünü varsa her gruptan bir örnek rastgele seçilmelidir.

Çalkalama testi için aynı üreticiye sahip, aynı tip ve grup numaralı ürünlerden bir aşı flakonunu alınır ve "dondurulmuş" olarak işaretlenir. Flakon bir dondurucuda içerik tamamen katılaşıncaya kadar dondurulur. Daha sonra eritilir fakat asla ısıtılmaz. Donmuş olmasından şüphe edilen flakon "test" olarak işaretlenir. Bir elde iki flakon beraber tutulur. Her iki flakon da 10-15 saniye boyunca şiddetle çalkalanır. Düz bir yüzeye yan yana konulan her iki flakonda içeriklerin dibine çökmesi gözlemlenir (Şekil 5). Eğer test flakon çökmesi dondurulmuş flakondan daha yavaşsa aşı kullanılabilir, herhangi bir hasar görmemiştir. Eğer çökme süresi her iki flakonda da aynı ise veya test flakonunda dondurulmuş flakondan daha hızlı çökelti oluşuyor ise aşı zarar görmüştür ve asla kullanılmamalıdır (24, 31).



Şekil 4. VVM'de renk değişimi ve yorumlanması [33].



Şekil 5. Kasıtlı olarak dondurulmuş flakon ile donmasından şüphelenilen flakonun karşılaştırılması [32].

Eczacıların Soğuk Zincir Uygulamasındaki Yeri

İlaçların hazırlanması ve dağıtımında yetkili meslek mensubu olan eczacılar, eczane ve hastanelerde özel saklama koşulu gerektiren ve soğuk zincirde saklanan ilaçların depolanmasında görevlidir. Biyoteknolojik ürünlerin eczaneye girmesiyle eczacıların bu ürünlerin saklanması ve soğuk zincir uygulamaları konusunda bilgilendirilmesi, meslek içi eğitim alması önem kazanmıştır (35). Farmasötik ürünlerin kalitelerinin güvence altında olması için saklanmasından sorumlu olan üretim, dağıtım, bağımsız eczane ve hastane eczanesi personelinin nitelikli ve yeterli sayıda olması gerekmektedir. Tüm sorumlu personel, soğuk zincir ile ilgili iyi saklama uygulamaları, düzenleme, prosedür ve güvenlik eğitimini almalıdır. Sıcaklığa duyarlı biyolojik ürünlerin saklanması ve kullanılması ile ilgili kılavuzlara uyulmalı, saklama koşullarına bağlı gelişen emniyetsiz ürün kullanılarak insanların

sağlığı riske edilmemelidir. Çoğu biyolojik ürün, ürün etiketinde belirtildiği gibi güvenlik, saflık ve etkinliğinin korunması için özel saklama koşulları gerektirir. Bakteriyel aşılar, viral aşılar ve plazma ürünlerini de kapsayan bu tür biyolojik/biyoteknolojik ürünler soğutulmuş veya dondurulmuş saklamayı gerektirir. Düşük sıcaklıkta saklanması gereken ürünler kesinlikle dondurulmamalıdır. Kontrollü oda sıcaklığında saklanabilen biyolojik ürünler de mevcuttur. Kapalı bir buzdolabında veya dondurucuda saklanan ürünler elektrik kesintisi durumunda, buzdolabı veya dondurucunun sıcaklığı önemli ölçüde yükselmedikçe etkilerini koruyabilirler. Eczacı belirli bir ürünün etkinliği veya maruziyeti konusunda endişe ettiğinde üretici firmaya danışılabilir. Eczanede aylık ısı izlem çizelgesi ve eczane buzdolabı günlük ısı kontrol formu soğuk zincir sorumlusu olan eczacı tarafından düzenli olarak doldurulmalıdır (36).

İlgili Kılavuzlar ve Düzenlemeler

Soğuk zincire tabi ürünler için mevcut durumda tek bir standart, kılavuz, belge veya belirli bir bölgeye uyumlu soğuk zincir düzenlemesi yoktur. Bunun yerine üretim ve dağıtımları için birçok düzenleme, konferans, teknik raporlar ve öneriler mevcuttur (37). Soğuk zincir yönetimiyle ilgili WHO, FDA, Kanada Federal Sağlık Bakanlığı (Health Canada) ve Avrupa Birliği Komisyonu (EC)'nin kılavuzları bulunmaktadır. Bu kılavuzlardaki ana fikir tıbbi ürünlerin belirlenen saklama koşullarını taşıma süresince sağlaması, kontrollü saklama sıcaklığı gerektiren ürünlerin uygun, özel bir araçla taşınması ve sıcaklığın izlenerek kayıt altına alınması gerekliliğidir.

WHO tarafından farmasötik ürünlerin başlangıçtaki kalitesini korumak amacıyla dağıtımındaki her faaliyetin Good Storage Practices-İyi Saklama Uygulamaları (GSP) ve Good Distribution Practice-İyi Dağıtım Uygulamaları (GDP) prensiplerine göre gerçekleştirilmesi gerektiği belirtilmiştir. GSP'ye göre biyofarmasötik ürünlerin saklama alanları iyi saklama koşullarına göze tasarlanmalı ya da uyarlanmalıdır. Özellikle alanların temiz, kuru, yeterince aydınlatılmış ve kabul edilir sıcaklık aralığını korumuş olması gerekmektedir. Özel saklama koşulu gerektiren (sıcaklık ve nem gibi) durumlarda uygun şartlar sağlanmalı, kontrol edilmeli, izlenmeli ve kayıt altına alınmalıdır (33). Dünya Sağlık Örgütü'nün, QAS/04.068 numaralı GSP uygulamaları kapsamında, farmasötik ürünlerin dağıtımında görev alan tüm kişilere ve üreticilere yani ara ürün ve/veya bitmiş ürünlerin üreticileri, araçları, tedarikçileri, dağıtımçıları, toptancıları, nakliye şirketleri vb. için uygulanmaktadır. Taşıma süresince özel saklama koşullarının (örneğin sıcaklık ve bağıl nem) gerektiği ürünlerde kontrol, izleme ve kayıt altına alma sağlanmalıdır. Bu kılavuz farmasötik ürünün kalitesinin tüm dağıtım aşamalarında sağlanmasını amaçlamıştır (38).

FDA tarafından yayınlanan stabilite kılavuzu, olumsuz taşıma ve çevre koşullarının ürün kalitesinde

zararlı etkiler oluşturabildiğini işaret etmiştir (39). GDP'deki eksiklikler, araştırmacıların çalışmalarıyla saptanarak taşıma sırasındaki sıcaklık kontrolü ve izleminin önemi vurgulanmıştır (40).

Kanada Federal Sağlık Bakanlığı; tıbbi ürünlerin tedarik zincirindeki üretim, dağıtım, taşıma ve satışında görevli kişilerin, ilacın kullanıcıya ulaşımına kadar olan sorumluluklarını belirten bir kılavuz yayınlamıştır (41).

Avrupa Birliği GDP Kılavuzuna göre tıbbi ürünlerin dağıtımçıları tarafından yürütülen kalite sistemi, belirlenen saklama koşullarını taşıma süresince sağlamalı ve kontrollü saklama sıcaklığı gerektiren ürünler uygun, özel bir araçla taşınmalıdır (42).

USP standartları, İyi Saklama ve Taşıma Uygulamaları'nda <1079> belirtilmiştir (43). İlaçlar ve aşıların taşıma süresince sıcaklık ve nem değişimi görüldüğü, sıcaklık kayıt cihazlarının 60°C gibi yüksek sıcaklık değerleri kaydetmesi dolayısıyla ısıya maruziyetin belgelendiği, bu nedenle GSP ve GDP'nin önemi vurgulanmıştır (44).

ICH'ın diğer otoritelerle ortak yayınladığı Q1A(R2) (Yeni İlaç Hammaddeleri ve Ürünlerinin Stabilite Testleri) çalışmasına göre bir tıbbi ürünün saklama koşulları altında termal stabilitesi, neme hassasiyeti ve çözücü kaybı olasılığı değerlendirilmelidir (45). Saklama koşulları; depolama, taşıma ve sonraki kullanımı karşılamak için yeterli olacak şekilde seçilmelidir. Hızlandırılmış ve ara ürün saklama koşulunun, etiketteki saklama koşulu dışında kısa dönemli sıcaklık değişimlerinin (örneğin taşıma sırasında) ürüne etkisini değerlendirmek için kullanılabilirliği belirtilmiştir (12).

ICH, biyoteknolojik/biyolojik ürünlerin stabilite testleri için yayınladığı kılavuzda saklama koşullarını altı ana başlık altında incelemiştir (12). Bunlar sıcaklık, nem, hızlandırılmış ve stres koşulları, ışık, ambalaj/kapak etkileşimi ve liyofilize ürünlerin çözücü ile karıştırıldıktan sonraki stabilitesidir. Bu kılavuza göre;

- Biyoteknolojik/biyolojik bitmiş ürün için kesin

saklama sıcaklıkları belirlenmelidir. Gerçek zamanlı/ gerçek sıcaklıkta yapılan stabilite çalışmalarına bağlı olarak belirlenen saklama koşulları, önerilen saklama sıcaklığı ile sınırlandırılabilir.

-Biyoteknolojik/biyolojik ürünler genellikle neme karşı koruyucu kaplarda taşınırlar. Bu nedenle önerilen kapların neme karşı yeterli koruma sağladığı ispat edilmelidir.

-Son kullanma tarihi, gerçek zamanlı/gerçek sıcaklık verilerine dayanmalıdır.

Stres koşulları altında yapılan çalışmalar, ürüne zarar veren ve önerilen koşulların dışında yer alan hava koşullarının belirlenmesinde yararlıdır. Ürün stabilitesinde, hangi spesifik test parametresinin en iyi indikatör olduğunu değerlendirmede kullanılabilir. İlaç hammaddeleri ve ilaç ürünlerinin üzerinde, ekstrem koşullarda yapılan çalışmalar degradasyon yollarının ortaya konulmasına yardımcı olur.

Biyoteknolojik/biyolojik ürünler etkinliğini, saflığını ve kalitesini; ambalajlardaki, paketlerdeki ve/veya prospektüslerdeki talimatlarda belirtilen en uzun sürede sürdürmelidir. Bu tür etiketlemeler ulusal / bölgesel gerekliliklere uygun olmalıdır. Ürün kalitesindeki değişiklikler, biyoteknolojik/biyolojik ürün ile ambalaj/kapak arasındaki etkileşimlere bağlı olarak meydana gelebilir. Stabilite çalışmaları, dik konumdaki üründe olduğu gibi, ters çevrilmiş veya yatay pozisyondaki numuneleri de içermeli, ürün kalitesinde kapağın etkileri bulunmalıdır. Çok dozlu flakonlarda kullanılan kapağın, tekrarlanan batırma ve çekme durumuna dayanabilecek kapasitede olduğu gösterilmelidir. Liyofilize ürünlerin çözücü ile karıştırılıp sulandırıldıktan sonraki stabilitesi; ürünün ambalajı, paketi veya prospektüslerin üzerinde belirtilen en uzun saklama süresi ve koşullarında açıklanmalıdır (12).

Türkiye'de Soğuk Zincir Uygulamaları

T.C. Sağlık Bakanlığı'nın 2009 yılında yayımladığı Genişletilmiş Bağışıklama Programı (GBP) Genelgesine

göre, soğuk zincire tabi aşuların il ve ilçe düzeylerinde, sağlık ocakları/ aile hekimleri/ toplum sağlığı merkezlerine nakli ve bu merkezlerde saklanması belirli kurallar çerçevesinde yürütülmektedir. Genelgede; zamanında ve istenilen miktarda aşı temin edilemediğinde aşı uygulamalarında aksamalar olacağı, kullanılan aşular etkin değilse %100 aşılama hızlarına ulaşılsa bile bağışık bir toplum oluşturma hedefine ulaşamayacağı, bu nedenle soğuk zincirin GBP'nin en önemli bileşenlerinden biri olarak büyük önem taşıdığı vurgulanmıştır. Soğuk zincir uygulamasında sürekli ısı izlemlerinin yapılarak kayıt altına alınmasının önemli olduğu ve sürekli ısı kaydeden sistemlerin kullanılması yaygınlaştırılması gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca, buzdolapları, aşı nakil kapları ve buz aküleri gibi uygun ekipmanların kullanımına ait kurallar ve sorumlu personelin görev ve sorumlulukları detaylı bir şekilde yer almaktadır (46).

SONUÇ

Çevre koşullarına hassas yapıdaki biyolojik/ biyoteknolojik ürünlerin imalatı sentetik geleneksel ilaçlara göre daha pahalı, zor ve karmaşık uygulamalar gerektirir. Ürün, birçok stabilizasyon işlemi sonrasında kullanıcılara etkin bir şekilde ulaştırılmaktadır. Bu ulaşım aşamasında ürünün üretimden stabil halde çıkması tek başına yeterli olmamaktadır. Isıya duyarlı olan etkin maddeyi bozunmaya uğramadan, kararlı bir yapıda formülasyon içerisinde tutmak için soğuk zincirle saklama, taşıma ve dağıtım gerekmektedir. Üretim yerinden ecza depolarına, depolardan sağlık merkezlerine ve eczanelere nakledilen biyofarmasötik ürünlerin stabilite kaybı genellikle taşıma evresinde ortaya çıkmaktadır. Soğuk zincirden sorumlu personelin bu konuda yeterince eğitilmiş olmaması, uygun sıcaklık takip cihazlarına göre takip edilmemesi, yanlış bilinen uygulamalar (dondurulan bazı aşı vb. biyolojik ürünün çözülünce tekrar aktif olabileceğinin sanılması) soğuk zincir kırılmasını kaçınılmaz hale getirmektedir.

Soğuk zincirden sorumlu kişilerin, diğer sağlık çalışanları ve ürünü kullanacak hastayı da saklama koşulları hakkında bilgilendirmesi gerekmektedir. Sağlık hizmetlerinde ilacın her aşamasında yetkin ve donanımlı olan eczacıların; eczane, hastane ve çalıştıkları diğer ortamlarda soğuk zincir uygulamaları ve işleyişinde daha aktif olmaları gerekmektedir.

Sonuç olarak; her dozaj formunun etken maddesinin, yardımcı maddesinin, üretim ve formülasyon özelliklerinin birbirinden farklı olması nedeniyle, üretici firmaların kendi geliştirdikleri ürünleri için yapmış oldukları stabilite testleri sonucu, kanıtlanarak belirlenmiş depolama koşulları ve son kullanma tarihleri ile ilgili bilgiler son derece

önemlidir. Soğuk zincire tabi ilaçların saklama koşulları ile ilgili özellikler ve son kullanma tarihi; üretici firma tarafından, ürünün formül geliştirme aşamasında; uluslararası kılavuzlara uygun olarak zorlayıcı, hızlandırılmış ve uzun süreli stabilite testleri ile incelenip, yapılan değerlendirmelerin sonuçları ürünün ambalajında belirtilmek zorundadır. Bunun yanı sıra, Eczacılar ve Eczaneler Hakkındaki güncel Yönetmeliğin 20/7. Maddesinde belirtildiği gibi özel saklama koşulu gerektiren veya soğuk zincire tâbi ilaçların saklama koşullarına uygun olarak eczaneye kabul edilmesi, saklanması ve aynı şartlara uygun olarak hastalara sunulması son derece önemli ve gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Parenteral Drug Association Technical Report No. 39: Cold Chain Guidance for Medicinal Products: Maintaining the Quality of Temperature-Sensitive Medicinal Products through the Transportation Environment. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2005; 59: 1-12.
2. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of The Council of 6 November 2001 on the Community Code Relating to Medicinal Products for Human Use. http://ec.europa.eu/health//sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_cons2009/2001_83_cons2009_en.pdf Erişim tarihi: 01.07.2017.
3. Saka OM, Bozkır A. Eczacılıkta Yenilikler -2: Current and Future Approaches of Biomacromolecules: Formulation Design and Applications. Ankara University Faculty of Pharmacy Press No: 99, 2010; 117-42.
4. Bozkır A, Saka OM. Multiple Emulsions: Delivery System for Antigens. In: Aserin A, eds. Multiple Emulsion: Technology and Applications. New Jersey: John Wiley & sons Inc, 2008.
5. Saka OM, Bozkır A. Formulation and in vitro characterization of PEGylated chitosan and polyethylene imine polymers with thrombospondin-I gene bearing pDNA. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2012; 100(4): 984-92.
6. Bozkır A, Saka OM. Chitosan-DNA nanoparticles: effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency. J Drug Target, 2004; 12(5):281-8.
7. Özbilgin N, Saka OM, Bozkır A. Preparation and In vitro In vivo Evaluation of Mucosal Adjuvant In situ Forming Gels With Diphtheria Toxoid. Drug delivery, 2013; 21(2): 140-147.

8. Bozkır A, Hayta G. Preparation and Evaluation of Multiple Emulsions water-in-oil-in-water (w/o/w) as Delivery System for Influenza Virus Antigens. *J Drug Target*, 2004, 12(3): 157-64.
9. Bozkır A, Hayta G, Saka OM. Comparison of biodegradable nanoparticles and multiple emulsions (water-in-oil-in-water) containing influenza virus antigen on the in vivo immune response in rats. *Pharmazie*, 2004, 59(9):723-5.
10. Rader RA. (Re)defining biopharmaceutical. *Nature Biotechnology*, 2008; 26(7): 743-51.
11. Groves JM. *Pharmaceutical Technology*, second edition, Taylor & Francis Group, 2006.
12. ICH Q5C: Stability testing of Biotechnological/Biological products, Annex to the tripartite ICH guideline for stability of new drug substance and products, 1995. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C_Guideline.pdf Erişim tarihi: 01.07.2017.
13. Ratnaparkhi MP, Chaudhari SP, Pandya VA. Peptides and proteins in pharmaceuticals. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2011; 3(2): 1-9.
14. Mathias SF, Franks F, Hatley RHM. The stabilization of proteins by freeze-drying and by alternative methods. In: Hider RC, Barlow D, eds. *Polypeptide Protein Drugs: Preparation, Characterization and Formulation*. Chichester: Ellis Horwood, 1991.
15. PierceBiotechnology, Protein stability and storage, Technical Resource Inc, USA, 2005. <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=567af49b5cd9e3c4138b4567&assetKey=AS%3A309905293021184%401450898587197> Erişim tarihi: 15.12.2017.
16. Nail SL, Jiang S, Chongprasert S, Knopp SA. Fundamentals of freeze drying. In: Nail SL and Akers MJ, eds. *Development and Manufacturing of Protein Pharmaceuticals*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002.
17. Banga AK. *Therapeutic peptides and proteins: formulation, processing, and delivery systems*. Third edition. New York: CRC press, 2015.
18. Walsh G. *Proteins: biochemistry and biotechnology*. Second edition. England: John Wiley & Sons Ltd, 2002.
19. Devrim B, Bozkır A, Canefe K. Preparation and evaluation of PLGA microparticles as carrier for the pulmonary delivery of rhIL-2:1. Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. *J Microencapsul*, 2011; 28(6): 582-94.
20. Spiers ID, Alpar HO, Eyles JE, Bozkır A, Williamson ED. Studies the Co-encapsulation, Release and Integrity of Two Subunit Antigens: rV on and rF1 from Yersinia Pestis. *J Pharm Pharmacol*, 1999; 51: 991-7.
21. Nguyen TH, Ward C. Stability characterization and formulation development of alteplase, a recombinant tissue plasminogen activator. In: Wang YJ, Pearlman R, eds. *Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs*. New York: Plenum Press, 1993.
22. Yoshioka S, Aso Y, Izutsu K, Terao T. Aggregates formed during storage of beta-galactosidase in solution and in the freeze-dried state. *Pharmaceutical Research*, 1993; 10(5): 687-91.
23. Izutsu, K, Yoshioka, S. Stabilization of protein pharmaceuticals in freeze-dried formulations. *Drug Stability*, 1995; 1: 11-21.

24. Pezzuto JM, Johnson ME, Manasse HR. Biotechnology and pharmacy. Dordrecht: Springer Science & Business Media, 1993.
25. Akers MJ. Special challenges in production of biopharmaceutical dosage forms. Bioprocess International, 2006; 4(11): 36-43.
26. WHO, Module 2: The vaccine cold chain, Immunization in practice, A practical guide for health staff, 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/193412/1/9789241549097_eng.pdf Erişim tarihi: 01.07.2017.
27. Hibbs BF, Moro PL, Lewis P, Miller ER, Shimabukuro TT. Vaccination errors reported to the Vaccine Adverse Event Reporting System, (VAERS) United States 2000-2013. Vaccine, 2015; 33(28): 3171-8.
28. WHO: Safe vaccine handling, cold chain and immunizations. Geneva, 1998. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64776/1/WHO_EPI_LHIS_98.02.pdf Erişim tarihi: 01.07.2017.
29. Chittineni SP, Maheshwari SC, Mangamoori NL. Formulation and Evaluation of Aluminum Adjuvanted Combination Vaccine with Reduced Freeze Sensitivity. IOSR Journal of Pharmacy, 2014; 4(5): 54-60.
30. Braun LJ, Jezek J, Peterson S, Tyagi A, Perkins S, Sylvester D, Guy M, Lal M, Priddy S, Plzak H, Kristensen D, Chen D. Characterization of a thermostable hepatitis B vaccine formulation. Vaccine, 2009; 27(34): 4609-14.
31. Kurt AÖ. Mersin ilindeki sağlık ocaklarında soğuk zincir donanımı ve uygulamalarının değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2005.
32. Kale G. KATKI Pediatri Dergisi. Ankara: Alp Ofset Matbaacılık San.veTic. LTd.Şti, 2006.
33. WHO Technical Report Series: No. 908, Annex 9, 2003. http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/GuideGoodStoragePracticesTRS908Annex9.pdf Erişim tarihi: 01.07.2017.
34. WHO, Temperature Sensitivity of Vaccines, 2006. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69387/1/WHO_IVB_06.10_eng.pdf Erişim tarihi: 01.07.2017.
35. Öner Bulut F. Biyoteknolojinin Tıpta ve Eczacılıktaki Uygulamaları. Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi, 2002; 3-4: 42-52.
36. FDA: Biologic Product Security, 2015. <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/ProductSecurity/ucm147243.htm> Erişim tarihi: 01.07.2017.
37. Bishara RH. Cold chain management-an essential component of the global pharmaceutical supply chain. American Pharmaceutical Review, 2006; 9(1): 105-9.
38. WHO Working document QAS/04.068/Rev.2: Good Distribution Practices (GDP) for Pharmaceutical Products, 2005. http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS_068Rev2_GDPdraft.pdf Erişim tarihi: 01.07.2017.
39. FDA, Draft Guidance for Industry, Stability Testing of Drug Substances and Drug Products, 1998. <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/980362gd.pdf> Erişim tarihi: 01.07.2017.

40. Lucas TI, Bishara RH, Seevers RH. A Stability Program for the Distribution of Drug Products. *Pharmaceutical Technology*, 2004; 68-73.
41. Health Canada: Guidelines for Temperature Control of Drug Products During Storage and Transportation (GUIDE-0069), 2005. https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/dhp-mps/alt_formats/pdf/compli-conform/gmp-bpf/docs/GUI-0069-eng.pdf Erişim tarihi: 01.07.2017.
42. European Union: Guidelines on Good Distribution Practice of Medicinal Product for Human Use, (94/C63/03), 1994. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/2013_c343_01/2013_c343_01_en.pdf Erişim tarihi: 01.07.2017.
43. General Chapter [1079] Good Storage and Shipping Practices. In: U.S. Pharmacopoeia [USP 28] Supplement 2. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention Inc, 2004.
44. Okeke CC, Watkins JW, Williams W, Medwick T, Bailey LC, Grady LT: A Study of the Temperature and Humidity Variations in the Shipping and Distribution of Anthrax Vaccines. *Pharmacoepial Forum* 2000, 26(3): 865-882.
45. FDA, Draft Guidance for Industry, Stability Testing of New Drug Substances and Drug Products, 2003. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073369.pdf> Erişim tarihi: 01.07.2017.
46. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü: Genişletilmiş Bağışıklama Programı Genelgesi, GENELGE 2009 / 17, 2009. <https://www.saglik.gov.tr/TR,11137/genisletilmis-bagisiklama-programi-genelgesi-2009.html> Erişim tarihi: 01.07.2017.

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE



HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

...../...../20...

Makale Türü/Article Type:

(...) Araştırma/Research (...) Derleme/Review (...) Olgu Sunumu/Case Report (...) Editöre Mektup/Letter to Editor

Makale Başlığı/Article Entitled :

Sayın Editör,

Yayınlanması dileğiyle Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;

1. Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orjinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
2. Makalenin; derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
3. Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
4. Yayın haklarının Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here, we affirm and warranty as the author(s) of this manuscript submitted to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology that;

1. The article I / We submitted to the Bulletin is original and responsibilities are belong to us ethically and scientifically,
2. The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under the evaluation of this bulletin,
3. The article contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights,
4. The article publishing rights belong to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology.

(...1) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...2) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...3) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...4) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...5) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

Not / Note : 1. İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz / Please indicate the corresponding author with (X)

2. Formu aşağıdaki adrese faks/posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below by faks or mail or deliver personally.

HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ / GENERAL DIRECTORATE OF PUBLIC HEALTH

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 Refik Saydam Yerleşkesi 06100 Sıhhiye-ANKARA-TURKEY

Tel/Phone : +90 312 565 55 80

Faks/Fax : +90 312 565 55 91

e-posta/e-mail : thsk.thdbd@saglik.gov.tr

