



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 65 ■ Sayı/Number 1 ■ Yıl/Year 2008





T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI

ISSN 0377-9777

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 65 ■ Sayı/Number 1 ■ Yıl/Year 2008

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Türk Hij Den Biyol Derg

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

Sahibi

Refik Saydam Hifzıssıhha Merkezi Başkanlığı adına
Başkan Doç. Dr. Mustafa ERTEK

EDİTÖR

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN

THDBD YAYIN KURULU

EDİTÖR YARDIMCILARI

Canan BAYAR
Selçuk KILIÇ

YAYIN KURULU

Sühendan ADIGÜZEL
Alper AKÇALI
Cahit BABÜR
Bekir ÇELEBİ
Arşun ESMER
Sibel KARACA
Nesrin KARACA
Nilgün OTO GEÇİM
Ayşe PEKER ÖZKAN
Saime ŞAHİNÖZ
Serpil TURHAN
Pınar ÜNAL

TEKNİK KURUL

Murad BAYRAM
Murat DUMAN
Hüseyin GÖL
Zeynep KÖSEÖĞLU

ER YAYIN KURULU

EDİTÖR

Ayşegül GÖZALAN

EDİTÖR YARDIMCILARI

Demet KURTOĞLU
Figen SEZEN SEVİMLİ

REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI
REFİK SAYDAM NATIONAL HYGIENE PRESIDENCY
ANKARA - TÜRKİYE

Senede üç defa çıkar
The bulletin is issued three times a year

YAYINEVİ



Grafik Tasarım
RNA Multimedia

İletişim
Aşağı Öveçler M.
103. S. 10/10
Çankaya/ANKARA
Tel: 0312 482 82 66 (pbx)
Faks: 0312 482 76 29
e-posta: info@rnasaglik.com.tr

Baskı ve Cilt
İmpress Baskı Tesisleri/
ANKARA
Tel: 0312 397 91 41
Faks: 0312 397 41 52
www.impress.com.tr

Yayın Türü
Yerel Süreli Yayın

Baskım Tarihi
26/05/2008

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

YAZI İNCELEME KURULU/EDITORIAL BOARD

- Adem KILIÇ, Gebze YTE, Kocaeli
Adil ALLAHVERDİYEV, Yıldız Tek. Üniv., Kimya Fak., İstanbul
Ahmet KART, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara
Ali ALBAY, GATA, Ankara
Aşkın YAŞAR, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara
Ayhan FİLAZİ, Ankara Üniv. Vet. Fak., Ankara
Aykut ÖZKUL, Ankara Üniv., Vet Fak., Ankara
Ayşen GÜNEL ÖZCAN, Kırıkkale Üniv., Tıp Fak., Kırıkkale
Aziz SANCAR, Univ. North Carolina, Dep Bipchem & Biophysics, USA
Bahadır GÖNENÇ, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara
Banu ÇAKIR, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara
Berrin ESEN, RSHM, Ankara
Bülent ALTEN, Hacettepe Üniv., Fen Fak., Ankara
Celal GÖKÇAY, ODTÜ, Çevre Müh., Ankara
Cemal ÇEVİK, Gazi Üniv., Tıp Fak., Ankara
Cumhur ÇÖKMÜŞ, Ankara Üniv., Fen Fak., Ankara
Çağatay GÜLER, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara
Delia Teresa SPONZA, Dokuz Eylül Üniv., Çevre Müh., İzmir
Diler ASLAN, Pamukkale Üniv., Tıp Fak., Denizli
Doğan YÜCEL, Ankara Eğ. & Arş. Hast., Ankara
Dürdal US, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara
Dwight D. BOWMAN, Cornell Univ., USA
Ender YARSAN, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara
Fatih KÖKSAL, Çukurova Üniv., Tıp Fak., Adana
Gönül ŞAHİN, Hacettepe Üniv., Eczacılık Fak, Ankara
Hakan LEBLEBİCİOĞLU, 19 Mayıs Üniv., Tıp Fak., Samsun
Haluk VAHABOĞLU, Kocaeli Üniv., Tıp Fak., Kocaeli
Hasan AYÇİÇEK, GATA, Ankara
Hürrem BODUR, Numune Eğ. & Arş. Hast., Ankara
Işıl MARAL, Gazi Üniv., Tıp Fak., Ankara
İrfan EROL, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara
Kosta Y. MUMCUOĞLU, Hebrew Üniv., İsrail
Levent AKIN, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara
M.Koray SAKAR, Hacettepe Üniv., Eczacılık Fak., Ankara
Mahinur AKKAYA, ODTÜ, Kimya Müh., Ankara
Mehmet Ali ONUR, Hacettepe Üniv. Fen Fak., Ankara
Metin KORKMAZ, Ege Üniv., Tıp Fak., İzmir
Murat GÜLMEZ, Kafkas Üniv., Vet. Fak., Kars
Murat GÜNAYDIN, 19 Mayıs Üniv., Tıp Fak., Samsun
Murat ÖZSAN, Ankara Üniv., Tıp Fak., Ankara
Mustafa KAVUTÇU, Gazi Üniv., Tıp Fak., Ankara
Mükerrem KAYA, Atatürk Üniv., Ziraat Fak., Erzurum
Nazmi ÖZER, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara
Nejat AYDIN, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara
Nilay ÇÖPLÜ, RSHMB, Ankara
Nur Münevver PINAR, Ankara Üniv., Fen Fak., Ankara
Oğuz GÜRSOY, Pamukkale Üniv., Gıda Müh., Denizli
Orhan BAYLAN, GATA, Ankara
Orhan YILMAZ, KBB, Dışkapı Eğ. & Arş. Hast., Ankara
Osman GÜNAY, Erciyes Üniv., Tıp Fak., Kayseri
Pınar OKYAY, Adnan Menderes Üniv., Tıp Fak., Aydın
Rahmet ÇAYLAN, Atatürk Eğ. & Arş. Hast., Ankara
Recep AKDUR, Ankara Üniv., Tıp Fak., Ankara
Recep ÖZTÜRK, İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak., İstanbul
Rıza DURMAZ, İnönü Üniv., Tıp Fak., Malatya
S. Aykut AYTAÇ, Hacettepe Üniv. Gıda Müh., Ankara
Sami AYDOĞAN, Erciyes Üniv., Tıp Fak., Kayseri
Sema BURGAZ, Gazi Üniv., Eczacılık Fak, Ankara
Sercan ULUSOY, Ege Üniv., Tıp Fak, İzmir
Sıraç DİLBER, Karolinska Univ., Medical School, Sweden
Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Celal Bayar Üniv., Tıp Fak, Manisa
Takashi AKAMATSU, Prof. Emeritus, Japan
Tevfik PINAR, Kırıkkale Üniv., Tıp Fak, Kırıkkale
Yesim ÖZBAŞ, Hacettepe Üniv. Gıda Müh., Ankara
Yeşim ÇETİNKAYA ŞARDAN, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara
Yeşim TUNÇOK, Dokuz Eylül Üniv., Tıp Fak., İzmir
Zafer KARAER, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

Dergide yayınlanmak üzere gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallar aranır:

1- Başlık sayfasında makale başlığı, İngilizce başlık, kısa başlık, yazar adları, çalıştığı kurumlara ait birimler, yazışma işini üstlenen yazarın açık adresi, telefon numaraları (sabit ve cep), elektronik posta adresi belirtilmelidir:

- Yazının başlığı kısa olmalı ve büyük harfle yazılmalıdır.
- Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.
- Akademik unvan kullanılmadan meslek unvanı belirtilebilir.
- Makale birden fazla yazar tarafından yazılmış ise, aynı ünite de çalışan yazarların soyadları sonuna aynı miktarda yıldız konur.
- Çalışma bilimsel bir kuruluş ve/veya fon ile desteklenmişse dipnot olarak belirtilmelidir.
- Makale, kongre/sempozyumda sunulmuşsa mutlaka sunum türü ile birlikte belirtilmelidir.

2-Yazılarda 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.

3-Metin içinde geçen Latince mikroorganizma isimleri ilk kullanıldığında tam ve açık yazılmalı, daha sonraki kullanımda kısaltılarak verilmelidir. Mikroorganizmaların orijinal Latince isimleri italik yazılmalıdır: *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 ve uluslararası standartlara uygun olarak kısaltılmalıdır.

4-Yazılar bir zorunluluk olmadıkça "miş'li geçmiş" zaman edilgen kip ile yazılmalıdır.

5-A4 kağıtların yalnız bir yüzü kullanılmalı, kenarlardan 3'er cm boşluk bırakılmalıdır. 12 punto Times New Roman yazı karakteri kullanılmalı, 2 satır aralığı (double space) bulunmalıdır.

6-Metinlerin tamamı 3,5" diskete veya CD'ye kopyalanmış olarak ve basılmış üç nüsha ile bir zarf içinde gönderilmelidir. İliştirilen bir üst yazıda metnin tüm yazarlarca okunduğu ve onaylandığı, yazıların yayına kabul edilmesi halinde telif hakkının dergiye devredileceği belirtilmelidir.

7-Yayımlanmış gereçleri yeniden basmak veya deney konusu olan insanların fotoğraflarını kullanmak için alınan izinler, insanlar üzerinde ilaç kullanarak yapılan klinik araştırmalarda ilgili "Kurum Etik Kurul Onayı" ve gönüllülerden yazılı bilgilendirme ile olur alındığına dair belgeler birlikte gönderilmelidir.

8-Makale yazımında dikkat edilecek hususlar şunlardır:

a) **Araştırma yazıları;** Türkçe Özet, İngilizce Özet, Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma ve Kaynaklar bölümlerinden oluşmalıdır. Bu bölümler, sola yaslanacak şekilde büyük harflerle kalın yazılmalıdır. İngilizce makalelerde Türkçe Başlık ve Özet bulunmalıdır.

Türkçe Özet: Amaç, Yöntem, Bulgular ve Tartışma alt başlıklarından oluşmalıdır (yapılandırılmış özet) ve en az 100, en fazla 250 sözcük içermelidir.

İngilizce Özet (Abstract): Başlığı İngilizce olmalıdır. Türkçe Özet bölümünde belirtilenleri birebir karşılayacak şekilde yapılandırılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Türkçe ve İngilizce Özetlerin altında verilmelidir. Anahtar kelime sayısı 3-8 arasında olmalı ve Index Medicus Medical Subject Headings'de (MeSH) yer alan sözcükler kullanılmalıdır.

Giriş: Araştırmanın amacı, benzer çalışmalarla ilgili literatür bilgisi kısaca sunulmalı ve iki sayfayı aşmamalıdır.

Gereç ve Yöntem: Araştırmanın gerçekleştirildiği kuruluş ve tarih belirtilmeli, araştırmada kullanılan araç, gereç ve yöntem açıkça sunulmalıdır.

Bulgular: Sadece elde edilen bulgular açık bir şekilde belirtilmelidir.

Tartışma: Bu bölümde, araştırmacının sonunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulgularıyla karşılaştırılmalıdır. Araştırmacı, kendi yorumlarını bu bölümde aktarmalıdır.

Teşekkür Bölümü: Gerekli görülyorsa Kaynaklar bölümünden hemen önce belirtilmelidir.

Kaynaklar: Metnin içinde geçiş sırasına göre numaralandırılmalıdır. Numaralar, parantez içinde cümle sonlarında verilmelidir. Kaynakların yazılımlı mutlaka aşağıdaki örneklere uygun olmalıdır:

Kaynak bir dergi ise: 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 üçünü yazıp et al. "ve arkadaşları" eklenmelidir) Makalenin başlığı, Derginin Index Medicus'a uygun kısaltılmış ismi, Yıl; Cilt (Sayı): İlk ve son sayfa numarası.

Standart dergi makalesi için örnek: Demirci M, Ünlü M, Şahin Ü. A case of hydatid lung cyst diagnosed by Kinyoun staining of bronco-alveolar fluid. *Türkiye Parazitoloj 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 asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood* 1979; 54(Suppl 1): 26a.

Kaynak bir kitap ise: Yazar(lar)ın Soyadı Adının baş harf(ler)i. Kitabın Adı. Kaçınca basım 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: 406.

Kaynak kitabın bir bölümü ise: Bölüm yazar(lar)ının Soyadı, Adının başharf(ler)i. Bölüm başlığı. In: Editör(ler)in Soyadı, Adının başharf(ler)i ed/eds. Kitabın Adı. Kaçınca baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı: Bölümün ilk ve son sayfa numarası.

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

Kaynak bir web adresi ise: Web adresi, bilgiye ulaşılan tarih belirtilmelidir.

Şekil ve Tablolar: Her tablo (şekil, grafik, fotoğraf) ayrı bir sayfaya basılmalı, alt ve üst çizgiler ve gerektiğinde ara sütun çizgileri içermelidir. Tablolar, "Tablo 1." şeklinde numaralandırılmalı ve tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne yazılmalıdır. Açıklayıcı bilgiye başlıkta değil dipnotta yer verilmeli, uygun simgeler (*, +, ++, v.b.) kullanılmalıdır.

Fotoğraflar "jpeg" formatında olmalıdır. Baskı kalitesinin artırılması için gerekli olduğu durumlarda fotoğrafların orijinal halleri talep edilebilir. Maksimum 127x173 mm ebadında, kaliteli, parlak kağıda basılmış olan fotoğrafların arkasına makale başlığı ve şekil numarası yazılıp ayrı bir zarf içinde yazıya eklenmelidir.

b) **Derleme türü yazılarda;** yazar sayısı ikiden fazla olmamalı ve yazar daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olmalıdır. Derlemelerde İngilizce özet, İngilizce ve Türkçe anahtar sözcükler bulunmalıdır.

c) **Olgu sunumlarında** Türkçe ve İngilizce başlık ve özet, anahtar sözcükler yer almalı, giriş, olgu ve tartışma bölümleri bulunmalıdır. Olgu sunumlarında metin yedi sayfayı, kaynak sayısı 20'yi aşmamalıdır.

d) Daha önce yayımlanmış yazılara eleştiri getirmek, katkıda bulunmak ya da bilim haberi niteliği taşıyacak bilgilerin iletilmesi amacıyla yazılan yazılar, Yayın Kurulu'nun inceleme ve değerlendirmesinin ardından "Editöre Mektup" bölümünde yayınlanır. Bu yazıların tercihen bir sayfayı aşmaması ve en fazla beş kaynakla desteklenmesi gerekmektedir.

9- Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

10- Yazılar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

11-Yazılar aşağıdaki adrese gönderilmeli veya elden teslim edilmelidir.

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

1) Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı yayın organıdır.

2) Dergide Mikrobiyoloji, İmmünoloji, Farmakoloji, Toksikoloji, Parazitoloji, Entomoloji, Biyokimya, Gıda Güvenliği, Çevre Sağlığı, Halk Sağlığı, Epidemiyoloji, Patoloji, Fizyopatoloji, Moleküler Biyoloji ve Genetik ile ilgili alanlardaki özgün araştırma, olgu sunumu ve derleme türündeki makaleler yayımlanır.

3) Dergi dört ayda bir çıkar ve üç sayıda bir cilt tamamlanır.

4) Dergide, daha önce başka yerde yayınlanmamış ve yayınlanmak üzere başka bir dergide inceleme aşamasında olmayan makaleler yayımlanır.

5) Dergi Yayın Kurulu ve Bilimsel Danışma Kurulu tarafından uygun görülen yazılar, konu ile ilgili üç Bilimsel Danışma Kurulu Üyesinden ikisinin olumlu görüşü alındığında yayımlanmaya hak kazanır. Bu kurulların, yazının içeriğini değiştirmeyen her türlü düzeltme ve kısaltmaları yapma yetkileri vardır.

6) Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlarına aittir.

7) Dergide yayınlanan yazıların yayın hakkı Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne aittir. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

YAZAR İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

- Makalenin yayınlanması ile ilgili dilekçe yazıldı.
- Bütün yazarlarca isim sırasına göre imzalanmış telif hakkı devir formu eksiksiz olarak dolduruldu.
- Özetler, tablolar, kaynaklar vb. dahil olmak üzere metnin tamamı çift aralıklı yazıldı.
- 12 punto ya da 3 mm boyutunda Times New Roman karakteri ile yazıldı.
- Metin sayfanın yalnız bir yüzüne yazılarak her bir kenardan 3 er cm boşluk bırakıldı.
- 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 (<250) kontrol edildi.
- Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler (Mesh'e uygun) verildi.
- Tüm kısaltmalar gözden geçirildi ve standart olmayan kısaltmalar düzeltilti.

- Metin içinde geçen orijinal Latince mikroorganizma isimleri italik olarak yazıldı.
- Tablolar yazım kurallarına uygun olarak ve her biri ayrı bir sayfada verildi.
- Kimyasal formüller ve grafikler yazım kurallarına uygun olarak ve her biri ayrı bir sayfada olacak şekilde hazırlandı.
- Fotoğraf boyutları maksimum 127x173 mm olup, arkasına makale başlığı ve şekil numaraları yazıldı.
- 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 noktalama yazım kurallarına uygun hale getirildi.
- Makale üç kopya olacak şekilde hazırlandı ve disket/ CD'ye kopyalandı.
- Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız:
 - * Etik kurul onayı alındı.
 - * Bilimsel kuruluş ve/veya fon desteği belirtildi.
 - * Kongre/Sempozyumda sunumu ve sunum türü belirtildi.

YAZARLARIN DİKKATİNE

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi' nin yeniden yapılanması nedeniyle, 2007 yılından itibaren geçerli olmak üzere bazı değişiklikler yapılmıştır. Bu nedenle yazarlarımızın makale gönderirken "yeni yazım kuralları ve yayın ilkelerine" göre yazılarını hazırlamaları son derece önemlidir. Yazarlarımız için "telif hakkı devir formu" örneği derginin arka sayfasında sunulmuştur. Her türlü soru, öneri ve şikayetleriniz için Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi İletişim ve Halkla İlişkiler Koordinatörlüğü ile irtibata geçebilirsiniz ve bilgi alabilirsiniz.

İLETİŞİM

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi
Yayın ve Dokümantasyon Müdürlüğü
Cemal Gürsel Caddesi No: 18
06100 Sıhhiye/ANKARA

Tel: +90 0312 458 23 64
Faks: +90 0312 458 24 08
e-posta: turkhijyen@rshn.gov.tr
http: www.rshn.gov.tr

ÖNSÖZ

Ülkelerin bilimsel gelişmelerinin değerlendirilmesindeki belirli ölçütler arasında, bilgi ve iletişim teknolojilerinin kullanımı, araştırma ve geliştirme faaliyetlerine milli gelirden ayrılan pay, bilimsel araştırmaya katılan insan gücü ve yapılan bilimsel faaliyetler yer almaktadır. Bilimsel faaliyetlerin değerlendirilmesi ise yapılan yayınlarla ölçülmektedir. Yapılan bu yayınların uluslararası kabul görmüş indeksler tarafından taranan dergilerde yer alması da önemli bir ölçüttür. Ülkemizde sağlık bilimlerinde yayınlanan dergi sayısında önemli bir artış gözlenmektedir. Böylece kendi uzmanlık alanındaki kişilerin olduğu kadar bu konulara ilgi duyanların da bilgilendirilmesine imkan verilmektedir. Bu dergiler için kurumlar, dernekler ve firmalar ciddi anlamda maddi kaynak ayırmakta, büyük bir özveri, emek ve zaman alan bir işlevi yerine getirmektedirler. Son yıllarda görülmektedir ki, bir çok dergi, ulusal ve uluslararası dizinlere girmekte bu da diğerleri için bir motivasyon kaynağı olmaktadır. Bu nitelikteki dergi sayısının artması en büyük temennimizdir.

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı olarak 1938 yılından beri yayınladığımız “Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi” nin 70. yılının gururunu ve kıvancını yaşamaktayız.

RSHMB olarak amacımız, halk sağlığını korumak ve geliştirmek için üretim, kontrol, tanı-doğrulama, eğitim ve danışmanlık alanlarında yasalarla belirlenen görevlerimizi; yeterliliği kanıtlanmış personeli ile kaliteli, güvenilir ve doğru olarak, ulusal ve uluslar arası standartlara uygun bir şekilde gerçekleştirmek, hizmet kalitesini sürekli geliştirmek ve bu çalışmalarımızı da yayınlarla desteklemektir.

Mikrobiyoloji, klinik-mikrobiyoloji, farmakoloji, toksikoloji, biyokimya, klinik-biyokimya, gıda güvenliği, çevre sağlığı, halk sağlığı ve tıbbi biyoloji alanlarında özgün araştırmalar, vaka sunumları ve derlemelere yer veren dergimiz tıp alanında yayımlanan en uzun soluklu bilimsel dergilerden birisidir.

Çağımız insanının beğeni ve alışkanlıklarını göz önüne alan Dergimiz, bilimsel ve teknik açıdan kendini yenileyerek, kolay okunabilen, çekici ve bilimsel bir dergi haline gelmiştir. Yılda üç kez, hakemli bir dergi olarak yayınlanan Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Index Copernicus, CABI gibi indekslerde taranmaktadır. Türk Tıp dizinine yaptığımız müracaattan da olumlu bir sonuç almayı umut ediyoruz.

Dergimizle ilgili tüm süreçlerin internet üzerinden yapılabileceği bir altyapının oluşturulması konusundaki çalışmalarımız son aşamasına gelmiştir. Makale toplama ve değerlendirme gibi bütün aşamaların internet üzerinden gerçekleştirilmesiyle editöryel süreçlerin daha işlevsel ve hızlı olması amaçlanmaktadır. Dergimize gönderilmesi düşünülen bir makalenin kaleme alınma aşamasından, dergiye gönderilmesi, editör ve danışman değerlendirmelerine kadar uzanan bir yelpazede tüm aşamalar kısa bir süre sonra internet ortamında gerçekleştirilebilecektir.

Değerli araştırmacılar, makalelerinizi, araştırmalarınızı, vaka sunumlarınızı ve derlemelerinizi Dergimizde yayımlamak, bilim dünyasına ve topluma sunmak için bekliyoruz. Sahip olduğunuz yeni fikirlerinizi bizimle paylaşmak, tartışmak, makale göndermek, hakem ya da yayın danışma kurulunda görev almak için lütfen bize yazınız.

E-posta adresimiz: turkhijyen@rshm.gov.tr

Saygılarımla

Doç. Dr. Mustafa ERTEK
Başkan

İÇİNDEKİLER

Araştırma makalesi

- 1. Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) Düşünülen Olgularda MEFV Gen Mutasyonları Sıklığının İncelenmesi** 1-5
Gönül ERDEN, Ceylan BAL, Oya GÜNGÖR TORUN, Nihal UĞUZ, M.Metin YILDIRIMKAYA
- 2. Pestisit Zehirlenme Şüphesi ile Gıda Toksikolojisi Laboratuvarına Gönderilen Numunelerin GC-MS ile Analizi** 7-15
Aysun DİNÇEL, Figen DEMLİ, Ramazan UZUN, Filiz ALATAN
- 3. Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokokların Metisilin, Fusidik Asit ve Mupirosin Direnci** 17-23
Nimet YIĞIT, Ayşe Esin AKTAŞ, Funda DOĞRUMAN AL
- 4. Asetikolinin İzole Kurbağa Akciğer Şeritleri Üzerine Etkilerine Yönelik Karşılaştırmalı Bir Çalışma** 25-36
Sühendan ADIGÜZEL, Ramazan UZUN
- 5. Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Üroloji Polikliniğine Başvuran Üretritli Erkek Olgularda *Trichomonas vaginalis* Sıklığı** 37-41
Gülnaz ÇULHA, Sadık GÖRÜR, Ali HELLİ, Soner AKÇİN, Ahmet Namık KİPER

Derleme

- 6. Likenler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları** 43-50
Demet CANSARAN DUMAN
- 7. Deniz Ürünlerine Bağlı Zehirlenmeler ve Etkileri** 51-60
Göknur TERZİ

CONTENTS

Original Article

- 1. Evaluating the Frequency of MEFV Gene in a Group of Patients with a Pre-diagnosis of Familial Mediterranean Fever** 1-5
Gönül ERDEN, Ceylan BAL, Oya GÜNGÖR TORUN, Nihal UĞUZ, M.Metin YILDIRIMKAYA
- 2. Examination of Food Samples Sent to the Food Toxicology Laboratory for Pesticide Contamination by GC-MS** 7-15
Aysun DİNÇEL, Figen DEMLİ, Ramazan UZUN, Filiz ALATAN
- 3. Methicillin, Fusidic Acid and Mupirocin Resistance in Staphylococci Isolated from Clinical Specimens** 17-23
Nimet YIĞIT, Ayşe Esin AKTAŞ, Funda DOĞRUMAN AL
- 4. A Comparative Study on the Effects of Acetylcholine on Frog Lung Tissue** 25-36
Sühendan ADIGÜZEL, Ramazan UZUN
- 5. The Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in Male Patients with Urethritis who Referred to Mustafa Kemal University Hospital Urology Clinic** 37-41
Gülnaz ÇULHA, Sadık GÖRÜR, Ali HELLİ, Soner AKÇİN, Ahmet Namık KİPER

Review

- 6. Lichens and Molecular Biological Applications** 43-50
Demet CANSARAN DUMAN
- 7. Seafood Poisonings and their Effects** 51-60
Göknur TERZİ

AİLESEL AKDENİZ ATEŞİ (FMF) DÜŞÜNÜLEN OLGULARDA MEFV GEN MUTASYONLARI SIKLIĞININ İNCELENMESİ

Evaluating the Frequency of MEFV Gene in a Group of Patients with a Pre-diagnosis of Familial Mediterranean Fever

Gönül ERDEN¹, Ceylan BAL¹, Oya GÜNGÖR TORUN¹, Nihal UĞUZ¹, M.Metin YILDIRIMKAYA¹

¹Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, III Biyokimya Laboratuvarı, ANKARA

İletişim:
Gönül ERDEN
Ankara Numune E. A. Hast.
Cebeci Merkez Laboratuvarı
Mamak Cad. No: 3
06340 Cebeci/ANKARA
Tel : 0312 362 14 87
Faks : 0312 362 39 72
e-posta: drgonulerden@gmail.com

ÖZET

Amaç: Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) MEFV genindeki mutasyonların neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır. Bu çalışmada bir grup Türk'te, MEFV geninde sıklıkla rastlanıldığı bildirilen E148Q, P396S, F479L, M680I (G/C), M680I (G/A), I692DEL, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H mutasyonlarının frekansı ve yüzdeleri incelenmiştir.

Yöntem: FMF ön tanısı almış toplam 98 hastada MEFV geninde 12 mutasyon araştırıldı. Hastaların yaş ortalaması \pm SD, 30 ± 12 yıl idi. MEFV genindeki mutasyonlar, ticari kit kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve ters-hibridizasyona dayanan strip-assay ile saptandı.

Bulgular: Çalışılan toplam 98 hastadan 67'sinde MEFV gen mutasyonları bulunmuştur (% 68,36). Allel frekansları yüzdeleri açısından incelendiğinde; M694V (%46,26), E148Q (%16,41), V726A (%13,43), M680I (G/C) (%5,97), R761H (%2,98) bulunmuştur. P396S (%1,49) F479L (%1,49), A744S (%0,74), allellerinin oldukça düşük frekanslarda olduğu belirlenmiştir. M680I (G/A), I692DEL, M694I ve K695R mutasyonlarına ise rastlanmamıştır.

Sonuç: Türk Toplumunda yapılan diğer çalışmalarda görüldüğü gibi, hastalarımızın büyük çoğunluğunda M694V mutasyonuna rastlanmıştır. Çalışmamızda en sık rastlanan ilk dört mutasyon türü yapılmış diğer çalışmalarla uyumludur ancak sıklığı farklı bulunmuştur. Türk Toplumunda daha önce bildirilmiş mutasyon türlerinde 12 mutasyonun tümünün sıklığını bildiren çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bu açıdan sonuçlarımızın ileride yapılacak fenotip-genotip korelasyon çalışmalarına yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF), MEFV geni, mutasyon

ABSTRACT

Objective: Familial Mediterranean Fever (FMF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in the FMF gene (MEFV). In this study, we evaluated the frequency and percentage of most common known twelve mutations (E148Q, P396S, F479L, M680I (G/C), M680I (G/A), I692DEL, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H) of MEFV gene in a group of Turkish individuals.

Methods: A commercial kit assay for the identification of MEFV gene mutations based on PCR and reverse-hybridization was used to investigate 12 mutations of the MEFV gene in 98 patients (mean age: 30 ± 12 years).

Results: Sixty-seven patients (68.6%) were found to have one of the MEFV mutations: M694V (46.26%), E148Q (16.41%), V726A (13.43%), M680I (G/C) (5.97%) and R761H (2.98%). Very low allele frequencies were observed in P396S (1.49%), F479L (1.49%), A744S (0.74%) type mutations, while the M680I(G/A), I692DEL, M694I and K695R type mutations were not detected.

Conclusion: The M694V mutation is the most frequent one among our study group similar to published estimates from Turkey. In addition, the frequency of the most common four mutation types, which were detected in this study were similar but with different percentages when compared to the previous estimates. There are not many published estimates on the 12 types of MEFV gene mutations of Turkish patients, therefore our results may be beneficial for phenotype-genotype correlation studies.

Key Words: Familial Mediterranean Fever, MEFV gene, mutation, PCR

GİRİŞ

Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) tekrarlayan ataklarla görülen ateş, peritonit, plörit, artrit veya erizipel şeklinde cilt lezyonları ile karakterize otozomal resesif geçiş gösteren kalıtsal bir hastalıktır. Hastalık tipik olarak ataklarla seyrederek ve ataklar arasında hastaların hiçbir şikayeti yoktur. Ataklar, çoğunlukla bir ila dört gün arasında sürmekte olup, atak esnasında lökositoz, yüksek sedimantasyon hızı, artmış fibrinojen ve C reaktif gibi akut faz reaktanları belirgindir. Hastalığın nadir görülen formlarında rekürren orşit ve menenjit bildirilmiştir (1, 2). Vücutta amiloid birikimi önemli bir komplikasyondur. Amiloidozisin en fazla görüldüğü organ böbreklerdir. Olgularda karşılaşılan ölümler böbrek yetmezliğine bağlı olarak gelişmektedir (3).

Bu hastalık yaygın olarak ülkemizi de içine alan kuşakta gözlenir. Türklerde, Ermenilerde, Arap ve Yahudilerde görülme sıklığı diğer toplumlara oranla daha fazladır. FMF'in ülkemizde görülme sıklığı 1/1000 olarak bilinmektedir. Taşıyıcılık oranı ise değişik araştırmalarda %15-34 olarak rapor edilmiştir. Bir başka deyişle ülkemizde her beş kişiden biri taşıyıcı konumundadır (4).

MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) lokalize olmuştur ve 781 amino asitli bir proteini (pirin) kodlamaktadır. Pirin proteininin FMF atakları sırasında inflamasyon yerinde nötrofil aktivitesi ve inflamasyonun inhibe edilmesinde rol aldığı belirtilmektedir (5, 6). MEFV geni 10 ekson içeren büyük bir genidir. Bu gene ait literatürde yaklaşık 20 farklı mutasyon tanımlandığı halde gene ait mutasyonların özellikle 10. eksonda bulunan küçük bir alana lokalize olduğu bilinmektedir (7).

Çalışmamızda FMF ön tanısı ile refere edilmiş 98 olguda MEFV geni, en sık rastlandığı belirtilen 12 mutasyon bakımından incelenmiştir. Söz konusu mutasyonlar: E148Q ekson 2 de; P396S ekson 3 de; F479L ekson 5 de ve M680I (G/C), M680I (G/A), I692DEL (2076-2078), M694V, M694I, K695R, V726A, A744S ve R761H ekson 10 da bulunmaktadır (8, 9).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Ekim 2006 - Haziran 2007 tarihleri arasında Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvurup FMF ön tanısı almış toplam 98 hasta (45 erkek, 53 kadın) alınmıştır. Çalışmada, laboratuvarımıza farklı birimlerden (romatoloji polikliniği, nefroloji polikliniği ve diğer poliklinikler) mutasyon taraması için rutin olarak başvurmuş hastaların sonuçları değerlendirilmiştir.

Mutasyon taraması için hastaların periferik venöz tam kan örnekleri kullanılmıştır. MEFV geni ile ilişkili 12 mutasyonun taranması için ters hibridizasyon yöntemini temel alan FMF strip assay kiti (ViennaLab Labordiagnostica) kullanılmıştır.

Bu yöntem toplam dört aşamadan oluşmaktadır: (a) DNA kan örnekleri standart yöntemle izole edilmiştir. (b) biyotinlenmiş primerler kullanılarak yapılan PCR amplifikasyondan sonra (c) 8 tane wild-type ve 12 tane mutant spesifik immobilize oligonükleotid problemlerini taşıyan bir test şeridine amplifikasyon ürünlerinin hibridizasyonu sağlanmıştır. Son aşamada (d) biyotinle işaretlenen dizilerin streptavidin-alkaline fosfataz ve renk substratları kullanılarak belirlenmesinin ardından sonuçlar analiz edilmiştir.

BULGULAR

FMF ön tanısı ile refere edilen 98 hastanın 67'sinde mutasyon belirlenmiştir (% 68,36). Tablo 1 ve 2'de tüm hastaların mutasyon taraması sonuçları ve sayıları allel düzeyinde belirtilmiştir. MEFV gen mutasyonları açısından 26 hasta homozigot, 24 hasta bileşik heterozigot olarak belirlenirken, 17 hastanın test edilen mutasyonlardan yalnızca birini taşıdığı görülmüştür. Bunlar arasında homozigot mutasyonlar; M694V/M694V (n=19), E148Q/E148Q (n=4), V726A/V726A (n=2), M680I (G/C)/M680I (G/C) (n=1) olarak bulunmuştur. Heterozigot mutasyonlar arasında M694V/wt (n=5), V726A/wt (n=4), E148Q/wt (n=3), M680I(G/C)/wt (n=2), R761H/wt (n=1), P396S/wt (n=1) ve F479L/wt (n=1) belirlenmiştir. İki

Tablo 1. FMF ön tanılı hastaların MEFV genotipi

Genotipler		
Allel 1	Allel 2	Hasta Sayısı
E148Q	E148Q	4
E148Q	M694V	10
E148Q	P396S	1
E148Q	wt	3
P396S	wt	1
F479L	M694V	1
F479L	wt	1
M680I (G/C)	M680I (G/C)	1
M680I (G/C)	A744S	1
M680I (G/C)	V726A	1
M680I (G/C)	R761H	1
M680I (G/C)	M694V	3
M680I (G/C)	wt	2
M694V	M694V	19
M694V	V726A	4
M694V	R761H	1
M694V	wt	5
V726A	V726A	2
V726A	R761H	1
V726A	wt	4
R761H	wt	1
wt	wt	31
Toplam		98

wt, normal allel, yabani tip

mutasyonu birlikte taşıyanlar (bileşik heterozigotluk) içerisinde M694V/E148Q (n=10), M694V/V726A (n=4), M680I(G/C)/M694V (n=3), M680I (G/C)/A744S (n=1), M680I (G/C)/V726A (n=1), R761H/V726A (n=1), M694V/R761H (n=1), M680I (G/C)/R761H (n=1), P396S/E148Q (n=1) ve F479L/ M694V=1 belirlenmiştir. M680I (G/A), I692DEL, M694I ve K695R mutasyonlarına ise rastlanmamıştır.

TARTIŞMA

Klinik tanısı zor olan FMF hastalığının moleküler genetiğinin anlaşılması yönünde son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda (16p13.3) lokalize olmuştur. FMF olgularının etyolojisinde önemli rolü olan MEFV gen

mutasyonlarının belirlenmesi hastalığın tanısına yardımcı olmada oldukça önemlidir. MEFV genindeki mutasyonların sayısı ve çeşidi toplumlar arasında değişiklik göstermektedir (4, 6, 10). Çalışmamıza FMF ön tanısı almış toplam 98 hasta dahil edilmiş ve bu hastalarda sıklıkla rastlanıldığı bildirilen 12 mutasyon incelenmiştir. Elde edilen verilere göre hastaların %68.36'sında mutasyona rastlanmıştır.

Mutasyonlu olgular içinde homozigotluk oranı % 38,81 olarak tespit edilmiştir. Homozigot mutasyonlar sıklık açısından sırasıyla M694V, E148Q, V726A, M680I (G/C) şeklinde bulunmuştur. Çeşitli mutasyonları homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan bireyler dikkate alındığında %62,7 oranında M694V mutasyonu taşıyan bireylere rastlanılmıştır. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda bu oran Türkler için % 41-45 oranında saptanırken Musevilerde %65 ve Araplarda ise %20 olarak rapor edilmiştir (11).

MEFV geninde bulunan tüm mutasyonlar arasında sırası ile M694V, M680I, V726A ve E148Q'nun en yaygın mutasyonlar içinde olduğu rapor edilmiştir (12). Çalışmamızda FMF mutasyonlarını homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan olgularda (N=67) allellerin frekansı göz önüne alındığında M694V mutasyonu %46,26 ile en fazla rastlanırken bunu sırası ile E148Q (% 16,41), V726A (% 13,439), M680I (G/C) (% 5,97) iz-

Tablo 2. MEFV mutasyonlarını homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan olgularda (N=67) allellerin frekansı ve yüzdeleri

Mutasyon	Allel sayısı	%
M694V	62	46,26
E148Q	22	16,41
V726A	18	13,43
M680I (G/C)	8	5,97
R761H	4	2,98
P396S	2	1,49
F479L	2	1,49
A744S	1	0,74
wt	17	12,68
Toplam	134	100

wt, yabani tip, normal allel

lemektedir (Tablo 2). Bu sonuç yukarıdaki verileri mutasyon türü bakımından desteklerken sıklık sırası açısından desteklememektedir.

Türk FMF çalışma grubu tarafından sonuçları bildirilmiş, Türkiye'deki çeşitli merkezlerden toplanmış hasta bilgileri ile yapılmış bir çalışma mevcuttur (10). Bu çalışma şu ana kadar Türkiye'de bu konuda yapılmış en geniş araştırmadır. Kesin FMF tanısı almış hastaların verileri incelenmiştir. Mutasyon analizi yapılmış 1090 hastada en çok görülen mutasyon tipi M694V (%51,4; 1121/2180) olarak bildirilmiştir. Bunu sırasıyla M680I (% 14,4; 313/2180) ve V726A (%8,6; 188/2180) izlemiştir (10). Bu çalışma, bizim çalışmamızdan, kesin tanı almış bireyleri incelemiş olması ve 12 değil üç tip mutasyonu araştırmış olması ile farklılık göstermektedir.

E148Q mutasyonunun ülkemiz için sıklığı % 13 olarak rapor edilmesine rağmen bizim çalışmamızda bu oran % 16,41 olarak bulunmuştur. Ayrıca birçok çalışmada sıklık açısından dördüncü sırada görülen bu mutasyonun bizim çalışmamızda ikinci sırada görülmesi, E148Q mutasyonunun daha hafif bir klinik tabloya sahip olması nedeniyle önemlidir (13).

V726A mutasyonuna ülkemiz FMF hastaları arasında %9 sıklıkta rastlanıldığı bildirilmiştir (4,14). Çalışmamızda bu mutasyon %13,43 olarak tespit edilmiştir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda M680I (G/C) mutasyonunun mutant bireyler içindeki yüzdesi %9,2 olarak ifade edilmiş bizim çalışmamızda bu oran %13,5 olarak bulunmuştur (15). Ayrıca bu mutasyon türü-

nün sıklık açısından dördüncü sırada yer alması önemlidir.

Çalışma grubumuzda R761H (% 2,98), P396S (% 1,49), F479L (% 1,49), A744S (% 0,74) mutasyonlarına düşük frekanslarda rastlanırken M680I (G/A), I692DEL, M694I ve K695R mutasyonlarına ise rastlanmamıştır.

Hasta grubu açısından bizim çalışmamıza en yakın olan iki çalışmanın en sık görülen dört mutasyon türü yönünden değerlendirilmesi Tablo 3'te bulunmaktadır (16, 17). Bu iki çalışmada M680I (G/C) ikinci sırada yer alırken, bizim çalışmamızda dördüncü sırada yer almıştır. Bu iki çalışmada E148Q üçüncü sırada yer alırken, bizim çalışmamızda ikinci sırada yer almıştır.

FMF'te genetik testlerin önemi büyüktür; klinik sendrom öncesi tanı imkanı sağlar. Risk taşıyan kardeşlerin belirlenmesinde faydalıdır. Komplike-kasyonların önlenmesi açısından, kolşisin tedavisine zamanında başlanmasında yardımcıdır.

Türk Toplumunda daha önce bildirilmiş mutasyon türlerinde 12 mutasyonun tümünün sıklığını bildiren çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bu açıdan sonuçlarımızın ileride yapılacak fenotip-genotip korelasyon çalışmalarına yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

Fenotip genotip korelasyon çalışmaları açısından hastaların takibi önem taşımaktadır. Hastaların klinikleri ve prognozları hakkında daha fazla veriye ulaşılmış yeni çalışmaların yapılması konunun netleştirilmesi açısından faydalı olacaktır.

Tablo 3. Yayınlanmış benzer iki çalışma ile mevcut çalışmadaki bireylerin mutant allel taşıma yüzdeleri açısından değerlendirilmesi.

	M694V (%)	E148Q (%)	V726A (%)	M680I(G/C)(%)
Yeşilada ve ark.(16)	31,7	9,6	3,7	12,9
Yalçınkaya ve ark.(17)	51,8	7,5	7,5	13,2
Mevcut Çalışma	46,2	16,4	13,4	5,9

Not: Taşıma yüzdeleri mutant allel sayıları baz alınarak bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Eshel G, Zemer D, Bar-Yochai A. Acute orchitis in familial Mediterranean fever. *Ann Intern Med.* 1988; 109:164-165.
2. Barakat, MH, Mustafa HT, Shakir RA. Mollaret's meningitis. A variant of recurrent hereditary polyserositis, both provoked by metaraminol. *Arc Neurol* 1998; 45: 926-7.
3. Berhmann RE, Vaughan VC. *Nelson Textbook of Pediatrics (Twelfth ed)* WB. Saunders Company, Philadelphia, 1983, p 1223.
4. Bakkaloğlu A. Familial Mediterranean Fever. *Pediatr Nephrol.* 2003; 18:853-9.
5. Konstantopoulus K, Kanta A, Deltas C et al. Familial Mediterranean fever associated pyrin mutations in Greece. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62:479-81.
6. Güran Ş, Gök F, Erdem H ve ark. Ailesel Akdeniz ateşi "Familial Mediterranean fever-FMF" düşünülen olgularda MEFV gen mutasyonları. *Moleküler Tanı Dergisi.* 2003;1:42-4.
7. Mor A, Gal R, Livneh A. Abdominal and digestive system associations of Familial Mediterranean fever. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98:2594-604.
8. Oberkanins C, Weinhausel A, Kriegshauser G, Moritz A, Kury F, Hass OA, Genetic testing for Familial Mediterranean fever in Austria by means of reverse-hybridization test strips. *Clin Chem.* 2003; 49:1948-50.
9. Tchernitchko D, Legendre M, Delahaye A et al. Clinical evaluation of a reverse hybridization assay for the molecular detection of twelve MEFV gene mutations. *Clin Chem.* 2003; 49:1942-5.
10. Turkish FMF study Group. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey, Results of a Nationwide Multicenter Study. *Medicine.* 2005; 84:1-11.
11. Yalçinkaya F, Tekin M, Çakar N, Akar N, Tümer N. Familial Mediterranean fever and systemic amyloidosis in untreated Turkish patients. *Q J Med.* 2000; 93:681-4.
12. Olgun A, Akman S, Kurt S, Tuzun A, Kutluay T. MEFV mutations in Familial Mediterranean fever: associated of M694V homozygosity with arthritis. *Rheumatol Int.* 2005;25:255-9.
13. Medlej-Hashim M, Loiselet J, Lefrank G, Megarbane A. Familial Mediterranean fever (FMF): from diagnosis to treatment *Sante.* 2004; 14:261-6.
14. Yalçinkaya F, Topaloğlu R, Yılmaz E, Emre S, Erken E. On behalf of the Turkish FMF Study Group. Distribution of MEFV mutations and phenotype genotype analysis in Turkish patients with FMF: a nationwide study (abstract). *Clin Exp Rheumatol.* 2002; 20 (Suppl 26): 90.
15. Caraneuve C, Havenasyon Z, Geneieve D et al. Familial Mediterranean fever among patient from Karabakh and the diagnostic value of MEFV gene analysis in all classically affected populations. *Arthritis Rheum.* 2003;48: 2324-31.
16. Yeşilada E, Savacı S, Yüksel Ş, Gülbay G, Otlı G, Kaygusuzoğlu E. Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) Düşünülen Olgularda MEFV Gen Mutasyonları. *İnönü Üniversitesi TF Dergisi* 2005;12(4):235-38.
17. Yalçinkaya E, Güran S, Nas BG, Dursun A, Imirzalıoğlu N. The Importance of Results of MEFV Gene Analysis in Cases Prediagnosed as 'Familial Mediterranean Fever'. *Erciyes Medical J* 2006; 28(1):19-24.

PESTİSİT ZEHİRLENME ŞÜPHESİ İLE GIDA TOKSİKOLOJİSİ LABORATUVARINA GÖNDERİLEN NUMUNELERİN GC-MS İLE ANALİZİ

Examination of Food Samples Sent to the Food Toxicology Laboratory for Pesticide Contamination by GC-MS

Aysun DİNÇEL¹, Figen DEMLİ¹, Ramazan UZUN¹, Filiz ALATAN¹

¹Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı, Zehir Araştırma Müdürlüğü, ANKARA

İletişim:
Aysun DİNÇEL
Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı,
Zehir Araştırma Müdürlüğü,
Gıda Toksikolojisi Laboratuvarı,
ANKARA
Tel : 0 312 458 23 68
Faks : 0 312 458 23 95
e-posta: aysun.dincel@rshm.gov.tr

ÖZET

Amaç: Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı Zehir Araştırmaları Müdürlüğü Gıda Toksikolojisi Laboratuvarına pestisit zehirlenme şüphesi ile gönderilen numunelerin GC-MS ile analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve Ülkemizde pestisit kullanımına ilişkin bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Toksik düzeyde bulunan pestisitlerin gıda maddelerinde ve sularında analizi GC-MS ile yapılmıştır.

Bulgular: Gıda Toksikolojisi Laboratuvarına zehirlenme şüphesi ile gönderilen numuneler GC-MS yöntemiyle değerlendirildiğinde 2001 yılında tüm numunelerin % 1,9'unda, 2002 yılında % 4,97'sinde, 2003 yılında % 1,5'inde, 2004 yılında % 3,67'sinde, 2005 yılında % 2,4'ünde, 2006 yılında ise % 3,07'sinde ve 2007 yılında % 2,54'inde pestisit tespit edilmiştir. 6 yılın (2001 ve 2007 yılları arası) ortalamasına bakıldığında Gıda Toksikolojisi laboratuvarında pestisit analizi yapılan toplam numune sayısı 2605 ve bu numuneler içerisinde pestisit tespit edilen numune sayısı 63 (% 2,42) olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Pestisitlerle zehirlenme olgusu halen ülkemiz için önemli bir halk sağlığı problemidir. Ancak zehirlenme şüphesinde, öncelikle ilgililer tarafından klinik bulgular ile epidemiyolojik verilerin iyi değerlendirildikten sonra numunelerin elde edilen bilgilerle birlikte laboratuvarlara yönlendirilmesi hem doğru sonuçlara kısa süre ulaşımları hem de halk sağlığı yönüyle kısa zamanında yardımcı olunması açısından önemlidir.

Anahtar Sözcükler: Pestisit, gıda zehirlenmesi, GC-MS

ABSTRACT

Objective: We aimed to assess samples with suspicion of pesticide poisoning, which were sent to the Poison Research Centre, Food Toxicology Laboratory, Refik Saydam Hıfzısıhha Center, Ankara, using the GC-MS technique. In addition, we aimed to review the situation of pesticides usage and food poisoning in Turkey.

Method: The analysis of toxic doses of pesticide was carried out with GC-MS.

Results: Pesticides were detected in 1.9 % of all samples in 2001, 4.97 % in 2002, 1.5 % in 2003, 3.67 % in 2004, 2.4 % in 2005, 3.07 % in 2006 and 2.54 % in 2007. The number of analyzed samples during the last six years (2001 to 2007) reached 2,605, while the number of samples in which pesticides were detected, totaled to 63 (2.42 %).

Conclusion: Poisoning with pesticide remains a public health problem in our country. It is essential that in case of intoxication with pesticides, the samples are sent together with the epidemiological and clinical findings, in order to get more precise and quicker results.

Key Words: Pesticide, food poisoning, GC-MS

GİRİŞ

Genel anlamı ile toksikoloji, “zehir bilgisi” olarak tanımlanabilirse de bu terimin anlamı toksikolojinin sınırını ve içeriğini belirlemede yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda endüstride, tarımda ve evlerde kullanılan kimyasal maddelerin gerek sayılarının gerekse miktarlarının kullanımının hızla artması; ayrıca, enerji kaynaklarının da çeşitliliğinin ve kullanımının günden güne artış göstermesi ile bir çok toksikoloji ile ilgili vakanın meydana geldiği bilinmektedir. Bu zararlı etkiler sadece insanları değil tüm biyosferi ilgilendirmektedir. Bu kimyasal maddelerin biyolojik sistemlerde ve çevrede araştırılması için gereken analiz metodolojisi temelde kimya ile ilgilidir. Bugün insanlar “kimyasal maddelerin oluşturduğu bir okyanus” içinde yaşamaktadır. Günümüzde bilinen kimyasal maddelerin sayısı milyonlarla ifade edilmektedir. Bunların 4000’den fazlası pestisit aktif maddesi olarak üretilmektedir (1).

Pestisitler, gıda maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanmaları sırasında, besin değerini bozan ve besinleri yok eden, zarar veren haşereleri, mikroorganizmaları ve diğer zararlıları (pestleri) yok etmek için kullanılan savaş maddeleridir. Ekonomik zararlı sınıfa giren pestisitler, kullanma yerlerine göre insektisitler (böcekleri öldürenler), herbisitler (yabani otlara etkili olanlar), fungusitler (mantarlara etkili olanlar), molluskisitler (yumuşakçalara etkili olanlar), rodendisitler (kemiricileri öldürenler) ve akarasitler (akar olarak bilinen parazitleri öldürenler) şeklinde adlandırılırlar (1-3).

Pestisitlerin kullanılmaları, gerek halk sağlığı gerekse açlıkla savaşta besinlerin korunması bakımından ekonomik anlamda önemli faydalar sağlamaktadır. Ancak, bu kimyasalların kontrolsüz, denetimsiz ve eğitimsiz bir şekilde kullanımı toprak, su ve havada kirlenmeler meydana getirmektedir. Kalıntı hâlindeki bu kirlenme de hem ekolojik dengenin bozulmasına sebep olmakta, hem de insan sağlığını ciddi bir şekilde tehdit edebilecek boyut kazanmaktadır. Bunların yanı sıra, bazı pestisitler spesifik olarak sadece hedef canlı türü için toksik etki gösterirken (selektif toksisite), bir kısmı ise insanlara ve diğer yararlı canlılara da zarar verirler. Hatta bilinçsiz kulla-

nım sonucunda, işlenmiş veya işlenmemiş gıda maddelerinde kalıntı veya toksik düzeyde bulunabilen pestisitler, insanlarda toksikolojik problemlere neden olabilirler (1-3).

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığına bağlı Zehir Araştırmaları Müdürlüğü (RSHMB-ZAM) Gıda Toksikolojisi Laboratuvarında yukarıda belirtilen olumsuz etkiler temel alınarak gıda maddeleri ile içme ve kaynak sularında muhtemel toksik düzeyde bulunan pestisitlerin hem varlığı ile yokluğu hem de miktarının tespitine yönelik analizler yapılmaktadır.

Bu çalışmada, öncelikli olarak Türkiye'deki pestisit kullanımı konusunda bilgilendirme yapılması, ayrıca pestisit zehirlenme şüphesi ile Merkezimize gönderilen numunelere ait çalışmaların nasıl yapıldığı ve bu numunelerin analiz sonuçlarına ait değerlendirmelerin paylaşılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gıda Toksikolojisi Laboratuvarına gönderilen gıda ve su numuneleri öncelikle ön hazırlık işlemlerine tabii tutulmakta, özellikle gıda maddelerinde bulunan yağ ve protein içerikleri uzaklaştırılmaktadır. Pestisit etken maddelerinin nitel ve nicel tayini gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS veya GC-MS-MS) kullanılarak yapılmaktadır (4-10).

Ön hazırlık

Gıda Maddelerinde Tüketme İşlemi: Gıda maddelerinde bulunan yağ ve protein içerikleri uzaklaştırılmak amacıyla yaklaşık 30-40 g numune ağzı ro-daj kapaklı 300 ml'lik erlen içerisine tartılmıştır. Üzerine 75 ml kloroform ilave edilerek 5-10 saniye kuvvetle çalkalanmış; daha sonra çalkalayıcıda 2 saat (160-180 rpm'de) bırakılmıştır.

Filtrasyon: Kloroform ile muamele edilmiş gıda numunesi, kloroform ile ıslatılmış kaba süzgeç kâğıdından 50 ml'lik bir behere süzülmüştür. Süzüntü rotary-evaporatör ile kurutulmuştur.

Silika Jel Plaka ile Arındırma ve Elüatın Toplanması: Kurutulan numune içeriğinde yağ tespit edildiği takdirde, yağlı içeriğin tamamı daha önceden hazırlanmış olan silika plaklara yayılmıştır.

İçerisine karbon tetraklorür konulmuş olan tankta sürüklenmeye bırakılmıştır. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra çeker ocak kabini içinde çözücüsünden uzaklaştırılmıştır. Kuruyan silika plak kazınarak bir behere alınır, üzerine 10 ml kloroform konularak baget yardımıyla toz silika tamamen ıslatılmış ve 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra bu karışım içerisinde 1-2 g sodyum sülfat ve cam pamuğu bulunan kloroform ile ıslatılmış kaba süzgeç kağıdından süzümüştür. Süzüntü azot gazı akışı altında kurutulmuş ve kurutulan madde 2 ml n-hegzan ile çözülür ve viyale alınarak GC-MS'e enjekte edilmiştir.

Su Numunelerinde Tüketme İşlemi: Su numunesinde 500 ml, ağzı rodajlı kapaklı 1000 ml'lik ayırma hunisi içerisine konulmuş; üzerine 75 ml kloroform ilave edilerek 3-5 dakika kuvvetle çalkalanmıştır. Faz

ayırımı için beklenir, bu ayırım iyice belirgin hâle gelince organik faz bir behere alınmıştır. İşlem diğer bir 500 ml su ile yinelenmiştir. Kloroform fazları birleştirilmiş, rotary-evaporatör ile kurutulur ve kurutulan madde 2 ml n-hegzan ile çözülmüş ve viyale alınarak GC-MS'e enjekte edilmiştir.

Meyve Suyu ve Diğer Yağsız Sıvı Numunelerde Tüketme İşlemi: Meyve suyu ve diğer yağsız sıvı numunelerinin ekstraksiyon işlemi için ağzı rodajlı kapaklı 500 ml'lik ayırma hunisi içerisine 100 ml numune konmuş ve üzerine 75 ml kloroform ilave edilerek 3-5 dakika kuvvetle çalkalanmıştır. Faz ayırımı için beklenmiş, faz ayırımı belirginleşince kloroform fazı bir behere alınmış, rotary-evaporatör ile kurutulmuş ve kurutulan madde 2 ml n-hegzan ile çözüldükten sonra viyale alınarak GC-MS'e enjekte edilmiştir.

Tablo 1. RSHMB-ZAM Gıda Toksikolojisi Laboratuvarında uygulanan GC-MS yöntemi analiz şartları ve sıcaklık programı

GC Şartları		
Kolon: (°C)		50
Sıcaklık dengeleme zamanı (dk)		0,50
Enjektör Bloğu (°C)		250
İnterface (°C)		280
Örnekleme Zamanı (dk)		1
Kolon uzunluğu (m)		30
Kolon Çapı (mm)		0,25
Kontrol Modu		Splitless
Kolon Basıncı (kPa)		100
Kolon Akışı (ml\dk)		1,7
Doğrusal Hız		47,4
Split Oranı		24
Fırın sıcaklık program.		
Sıcaklık yükselme hızı (°C/dk) analiz süresi: 44,75 dk	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)
-----	50	2,0
8	180	3
8	250	15
10	280	1
MS Şartları SCAN Mode		
Start m/z: 50,00	End m/z: 550	
Scan interval (sn): 0,50	Treshold: 1000	
Scan speed (amu/sn): 1000	Solvent cut (dak): 4.00	
GC program zamanı (dak): 4.50	Dedektör Volt (kV): 1.70 MS program	
Başlama zamanı (dak): 4.50	Bitiş zamanı (dak): 44.75	
Spektrum Display © spectrum 0 MC		

GC-MS YÖNTEMİ

Gıda maddelerinden ve sudan pestisit analizine yönelik uygulanan yöntem toksik düzeyde pestisit analizine yönelik olup literatür bilgileri dahilinde modifiye edilmiştir (5-10). Pestisit analizinde kullanılan GC-MS cihazı, analiz şartları ve uygulanan sıcaklık programı Tablo 1'de verilmiştir. Uygulanan yöntem ile laboratuvarımızda analizi yapılan pestisitlerin tam listesi ise Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. RSHMB-ZAM Gıda Toksikolojisi Laboratuvarında GC-MS yöntemiyle hâlen analizi yapılan pestisitlerin listesi

1-Organofosforlular	5-Karbamatlar
Azinfos-etil	Karbosülfan
Azinfos-metil	Karbofuran
Klorprifos-etil	Karbaril
Klorprifos-metil	6- Rodentisitler
Demeton	Bromadiolon
Diazinon	Difasinon
Etiyon	Varfarin
Malatyon	7. Piretroitler
Paratyon-etil	Sipermetrin
Paratyonmetil	Deltametrin
Diklorvos	Permetrin
2-Organoklorlular	Fenvalerat
α-Endosülfan	Lambda-sihalotrin
β-Endosülfan	8. Fungusitler
Heptaklor	Kaptan
3-Tiyadizenler	Prosimidon
Buprofezin	İprodion
4-Herbititler	
Simazin	
Atrazin	
Trifluralin	

BULGULAR

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı Zehir Araştırmaları Müdürlüğü (RSHMB-ZAM) Gıda Toksikolojisi Laboratuvarında 2001 ile 2007 yılları arasında GC-MS yöntemiyle yapılan analiz sayılarını ve saptanan pestisitleri içeren sonuçlar Tablo 3'de verilmiştir. Sonuçların grafiksel değerlendirmesi ise Şekil 1'de gösterilmiştir.

Son altı yılda Gıda Toksikolojisi Laboratuvarına zehirlenme şüphesi ile gönderilen numuneler GC-MS yöntemiyle değerlendirildiğinde 2001 yılında % 1,9,

2002 yılında % 4,97, 2003 yılında % 1,5, 2004 yılında % 3,67, 2005 yılında % 2,4, 2006 yılında ise % 3,07 ve 2007 yılında % 2,54 oranında pestisit tespit edilmiştir. Altı yılın ortalamasına bakıldığında Gıda Toksikolojisi laboratuvarında pestisit analizi yapılan toplam numune sayısı 2605 ve bu numuneler içerisinde pestisit tespit edilen numune sayısı 63 (% 2,42) olarak belirlenmiştir. Gıda Toksikolojisi laboratuvarına gönderilen numune sayısı diğer yıllarla kıyaslandığında 2007 yılı numune sayısı bir önceki yıla kıyasla % 100'lük bir artış göstermiştir.

Tüm yıllar incelendiğinde en çok tespiti yapılan pestisitlerin organofosforlu insektisit grubuna ait olduğu belirlenmiştir. Bunu sırasıyla organoklorlu insektisitler, karbamat, pretroit ve herbisit grubu insektisitler izlemektedir. Gelen numunelerde tespit edilen etken maddelerin ayrıntılı gösterimi ise Tablo 4'de verilmiştir. 2001-2007 yılları arasında pestisit şüphesi ile analizi yapılan numuneler içerisinde tespit edilen organofosforlu insektisitlerin % 31,81'ini diklorvos, % 27,27'sini metil paratyon, % 22,72'sini klorprifos; organoklorlu grup insektisitlerin ise % 93,75'ini endosülfan oluşturmaktadır.

TARTIŞMA

Ülkemizde zirai mücadele ile ilgili öğretim ve araştırmalar 19. yüzyılın ortalarından itibaren başlamıştır. Bu anlamda ilk zirai öğretime 1846 yılında başlanmış olup ülkemizde pestisitlerle ilgili çalışmalar ise 1950 yılında formülasyon hazırlanması şeklinde olmuştur (1, 2). Bu tarihlerden sonra zirai mücadele konusunda mevzuat alt yapısının oluşturulmaya çalışıldığı da bilinmektedir.

Bugün Türkiye'de üretilen tarım ilaçları formülasyonları ve ruhsatlandırılmaları, Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yanında, Uluslar arası Ortak Pestisit Analiz Konseyi (CIPAC)'nin de spesifikasyonları ve standartları içindedir (1). Yapılan tespitlere göre hâlen aktif olarak dünyadaki ruhsatlı pestisit sayısı 2609 olarak bilinmektedir. Bu ilaçların konularına göre dağılımı ise Tablo 5'de verilmiştir.

Ülkemizde ruhsatlı pestisit aktif madde sayısı Tarım ve Köyşleri Bakanlığı tarafından bildirilen veri-

Tablo 3. RSHMB-ZAM, Gıda Toksikolojisi Laboratuvarında GC-MS yöntemiyle analiz edilen numune sayıları ve pestisit tespit edilen numunelerin yıllara göre dağılımı

Numune Tipi	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Gıda Numunesi	284	180	227	199	290	224	435
Su Numunesi	78	41	96	46	84	36	115
Toplam Analiz	362	221	323	245	374	260	550
Pestisit Tespit Edilen (Gıda ve su)	7	11	5	9	9	8	14

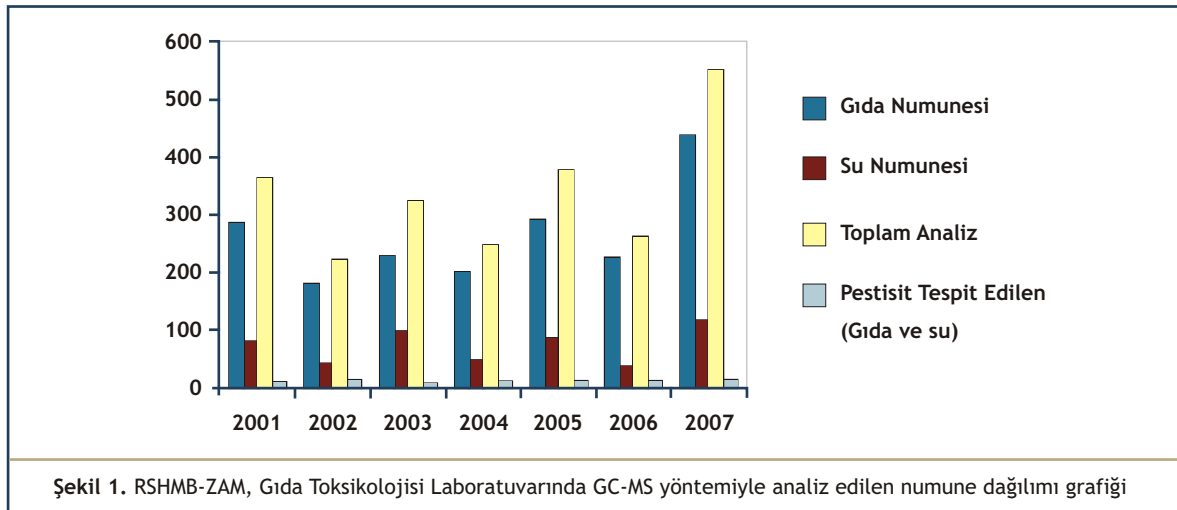
lere göre 17/05/2007 tarihi itibarıyla 408'dir. Tablo 6'da zaman zaman kullanımı yasaklanan pestisitlerin listesi verilmiştir.

Türkiye'de pestisitlerin en önemli kullanım alanı tarımsal amaçlı olup, bu alanda gruplar arasında en çok yer tutan, % 47 ile insektisit olduğu, bunu % 24 ile herbisitlerin izlediği, fungusitlerin ise % 16'lık bir kullanım payının olduğu görülmektedir. Türkiye'deki tarım ilaçları sektörünün en önemli bölümü olan insektisit satışlarının % 47'sini pamuk, % 20'sini de meyve pazarı almaktadır. İnsektisit satışlarında ise, organik fosforlu insektisitler % 40'la ilk sıralardadır. Başlıca organik fosforlu aktif maddeler klorpirifos, diazinon, diklorvos, demeton, malatyon, metamidofos, metadatyon, monokrotofos ve paratyon etil ve metildir. İnsektisit satışlarının % 21'ni sentetik piretroitler oluşturup, bunların en önemlileri arasında sipermetrin, lambda sihalotrin, tralometrin, zetasipermetrin ve alfa sipermetrin yer almaktadır.

Karbamatların da geniş kullanım alanı bulduğu Türkiye'de sıklıkla kullanılanlar karbosülfan, karbaril ve furatiokarbtır (4).

Endüstriyel atık sular ve kanalizasyon suları ile su yüzeyine doğrudan pestisit uygulamaları, artık kimyasalların kazayla yüzey sularına karışması veya kasıtlı olarak boşaltılması, alıcı sulardaki pestisit derişimlerinin önemli ölçüde artmasına sebep olmaktadır. Sudaki pestisit kalıntıları, bozunma veya dönüşüm ürünlerinin canlılara olumsuz etkilerinin bilinmesi ise pestisitlere olan ilginin gün geçtikçe artmasına yol açmakta, alıcı sulara deşarj edilen atık suların giderilmelerini, bu amaçla değişik teknolojilerin uygulanmasını ve geliştirilmesini mecburi hâle getirmektedir (1).

Ülkemizde çeşitli sebeplerle pestisitlerle zehirlenmelerin olduğu bilinmektedir. Hastanelere ulaşmış olaylar dışında oluşan zehirlenme vakalarının da varlığı düşünülürse, pestisit zehirlenmelerinin halk



Tablo 4. Gıda Toksikolojisi Laboratuvarına gelen numunelerde tespit edilen pestisit etken maddeleri

ETKEN MADDE	GRUBU	YILI	DÖNEM	BULUNDUĞU ÜRÜN
Karbofuran, karbosülfan	Karbamat insektisit	2007	Aralık	Bilinmeyen toz madde
Deltametrin	Piretroitler	2007	Kasım	Yemek
Kaptan, karbofuran	Fungusitler	2007	Ekim	Kuru Mısır
Klorpirifos etil, Diklorvos	Organofosforlu İnsektisit	2007	Ekim	Su
Sipermetrin	Piretroitler	2007	Eylül	Bardakta
Karbofuran, karbosülfan	Karbamat insektisit	2007	Ağustos	Su
Klorpirifos etil, Paratyon metil	Organofosforlu İnsektisit	2007	Ağustos	Su
Diklorvos, Paratyon metil, α, Endosülfan	Organofosforlu İnsektisit	2007	Ağustos	Su
Paratyon metil	Organofosforlu İnsektisit	2007	Ağustos	Su
Trifluralin	Herbisitler	2007	Nisan	Su (iki numunede)
Klorpirifos	Organofosforlu İnsektisit	2007	Nisan	Su (iki numunede)
Diklorvos	Organofosforlu İnsektisit	2007	Ocak	Ekmek
Paratyon-metil	Organofosforlu İnsektisit	2007	Ağustos	Su
Karbofuran, Karbosülfan	Karbamat insektisit	2007	Ağustos	Su
Klorpirifos-etil, paratyon metil	Organofosforlu İnsektisit	2007	Ağustos	Su
Diklorvos,Paratyon-metil, Endosülfan	Organofosforlu İnsektisit	2007	Ağustos	Su
Trifluralin	Herbisit	2007	Nisan	Su
Etil-Klorpirifos	Organofosforlu İnsektisit	2007	Nisan	Su (2 Adet)
Diklorvos	Organofosforlu İnsektisit	2007	Ocak	Tost ekmeği
Etil-Klorpirifos	Organofosforlu İnsektisit	2007	Ocak	Börek
Metil Paration	Organofosforlu İnsektisit	2006	Aralık	Su
Metil Paration	Organofosforlu İnsektisit	2006	Aralık	Su
Diklorvos ,Parathion-etil, Diazinon	Organofosforlu İnsektisit	2006	Ekim	Su
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2006	Haziran	Çiğ ve Pişmiş Et
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2006	Haziran,	Yoğurt
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2006	Mayıs	Ekmek, ekmek
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2006	Nisan	(buğday, arpa, kepek)
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2006	Ocak	Un, kabak, köfte, kek
Klorpirifos	Organofosforlu İnsektisit	2005	Aralık	Simit
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2005	Temmuz	Un
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2005	Temmuz	Un, Yufka
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2005	Temmuz	Lokum, pide, un, lokum
Diklorvos	Organofosforlu İnsektisit	2005	Haziran	Killtox Sinek ilacı
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2005	Haziran	Un, lavaş ekmek, hamur, tuz, pakmaya
Buprofezin	Thiadiazine insektisit	2005	Haziran	Meşgul madde
Varfarin	Kumarin rodensit	2005	Nisan	Fare zehiri
Karbofuran	Karbamat insektisit	2005	Şubat	Su
Metil paratyon	Organofosforlu İnsektisit	2004	Aralık	Su
2,4 D Metil ester	Herbisit	2004	Ekim	Su

Tablo 4' ün devamı. Gıda Toksikolojisi Laboratuvarına gelen numunelerde tespit edilen pestisit etken maddeleri

Fenitiyon	Anti epileptik ilaç	2004	Ağustos	SMA Bebek Maması
Klorpirifos	Organofosforlu İnsektisit	2004	Ağustos	Su
Klorpirifos	Organofosforlu İnsektisit	2004	Temmuz	Toz madde
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2004	Temmuz	Toz madde
Klorpmozin	Antipsychotic ilaç	2004	Mart	Meyva suyu
Brompiropilat	Benzilat akarisit	2004	Mart	Su
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2004	Şubat	Buğday
Metamidofos	Organofosforlu İnsektisit	2003	Ekim	Ekmek
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2003	Ekim	Un, palamut balığı
Malathion	Organofosforlu İnsektisit	2003	Ekim	Kırmızı biber
Aldrin	Organoklorlu İnsektisit	2003	Haziran	Bulgur pilavı, fasulye
Methomil	Karbamat insektisit	2003	Mart	Toz madde
Karbaril	Karbamat insektisit	2002	Kasım	Fare zehiri karışımı
Trifluralin	Herbisit	2002	Ekim	Su
Prosimidon	Fungusit	2002	Ekim	Üzüm
Metil paratiyon	Organofosforlu İnsektisit	2002	Eylül	Su
Metil paratiyon	Organofosforlu İnsektisit	2002	Eylül	Su
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2002	Eylül	Ev ekmeği
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2002	Eylül	Tavuk, Fasulye yemeği
Diklorvos	Organofosforlu İnsektisit	2002	Ağustos	Su
Diklorvos	Organofosforlu İnsektisit	2002	Temmuz	Su
Azinfos Metil	Organofosforlu İnsektisit	2002	Mayıs	Su
2,4 DME	Herbisit	2002	Mayıs	Margarin
Diklorvos	Organofosforlu İnsektisit	2001	Ekim	Su
Methamidopos	Organofosforlu İnsektisit	2001	Eylül	İncir
Endosülfan	Organoklorlu İnsektisit	2001	Eylül	Bulgur Pilavı
Gutiyon/Azinfos Metil	Organofosforlu İnsektisit	2001	Temmuz	Su
Diklorvos	Organofosforlu İnsektisit	2001	Nisan	Nohut yemeği
Karbaril	Karbamat insektisit	2001	Nisan	Su
2,4 D	Herbisit	2001	Mart	Su

sağlığı açısından dikkat edilmesi, gerekli önlemlerin ve uyarıların yapılması zorunluluğu hayli önem arz etmektedir. Her yıl pestisitlerden kaynaklanan çeşitli zehirlenme vakaları gözlenmektedir. Meydana gelen vakalarda sonuç genellikle tedavi edilebilir bo-yutlarda olsa da bu vakaların bir kısmında pestisitler ölümlere dahi sebep olabilmektedir.

Yapılan çalışmalarda başlıca pestisitlerle zehirlenme nedenleri aşağıdaki gibi sıralanmıştır (1, 2).

- Pestisitlerin kazaen gıda maddeleri ile karışması,

- Pestisit uygulamasından sonra, meyve ve sebze-lerin bekleme sürelerine dikkat edilmeden veya

bol su ile iyice yıkanmadan yenmesi,

- Pestisitlerin yanlış veya kasti olarak kötü amaçla kullanılması,

- Uygulama sırasında gerekli koruyucu önlemlerin alınmaması,

- Pestisitlerin üretimi ve formülasyonlarının hazırlanması sırasında uygulayıcıların ve çevredeki-lerin maruz kalması.

Halk sağlığını tehdit eden ve ölümlere kadar gi-debilen, gıda kaynaklı zehirlenme vakalarının daha kapsamlı ve daha güvenilir bir biçimde aydınlatılması için uygulanan analiz işlemlerinin standardizasyonu, optimizasyonu ve validasyonunun gerekliliği açıktır.

Tablo 5. Dünyadaki aktif olarak bulunan ruhsatlı ilaç sayıları ve (%) değerleri (1-3)

Etki Grubu	Adet	%
1. İnsektisitler	899	34,46
2. Fungisitler	704	27,00
3. Herbisitler	462	17,71
4. Akarisitler	125	4,80
5. Yağ formüllü ilaçlar	21	0,80
6. Kış mücadele ilaçları	11	0,42
7. Fumigantlar	31	1,19
8. Nematosit ve top fumigantları	40	1,53
9. Rodentisitler	18	0,68
10. Mollussisitler	7	0,26
11. Demirli bileşikler	28	1,07
12. Böcek cezbediciler ve feromonlar	8	0,30
13. Bitki gelişme düzenleyiciler	255	9,78
Genel Toplam	2609	100

Tablo 6. Türkiye' de kullanımı yasaklanan pestisitler

Adları	Yasaklanma Tarihi
Dieldrin	1971
Aldrin	1979
Endrin	1979
Lindan	1979
Heptachlor	1979
Klordane	1979
E-Paratyon	1979
2,4,5,T	1979
Leptefos	1979
Klordimefon	1979
Cıvalı ilaçlar (metoksietil cıva klorür, fenil cıva asetat, fenil cıva klorür)	1982
Arsenikli ilaçlar	1982
Klorbenzilat	1982
DDT (kısıtlama 1978)	1985
BHC (Kısıtlama 1978)	1985
Fluorodifen	1987
Klorpropilat	1987
Dinoseb	1988
Daminozid (Alar 85)	1989
Toksafene	1989
Zineb	1991
Azinfos Etil	1996

Kurumumuz, ülke genelinde gıdalardan kaynaklanan zehirlenmelerde başvurulan ilk merkezlerdendir. Gıda ve su numunelerinin analizlerinde uygulanan yöntemlerin standardizasyonu, optimizasyonu ve validasyonunda birtakım zorluklar mev-

cuttur. Özellikle ısıtma işlemi tabii tutularak yemek hâline getirilmiş çeşitli gıda maddeleri (örneğin; et ve etli ürünler, çeşitli sebze yemekleri, çorbalar, süt ve süt ürünleri vs.) gibi değişik yağ ve protein içeriklerine sahip karmaşık matris gruplarını içeren

numunelerin analizi ve bu matrikslerin analiz yöntemlerinin standardizasyonun, optimizasyonun ve validasyonunun oluşturulması Gıda Toksikolojisi Laboratuvarının analiz kalitesi açısından büyük önem arz etmektedir. Alınan numuneye uygulanan analiz işlemleri öncelikle, numuneyi meydana getiren bileşenlerin olası pestisitlerden ayrılması amacıyla ön hazırlık işlemlerini gerektirmektedir. Numunelerden kaynaklanan safsızlıklardan pestisitlerin ayrılması amacıyla uygulanan tüketme işlemlerinin iyi optimize edilmesi, kullanılan yöntemlerin validasyonunun yapılması ve rutin analizler için sistem uygunluğunun kapsadığı sürenin belirlenmesi gerekmektedir. Literatürde mevcut pestisitler için uygulanmış pek çok yöntem vardır. Ancak belirtilen bu yöntemler, numune esaslı olarak incelendiğinde, sadece tek bir gruba yönelik olup (su veya meyve ve/veya meyve sularında), pişmiş (ısıtılmış işlem uygulanmış) gıda maddelerine yönelik yöntemler az sayıdadır (5-10).

Geçmiş yıllara ait analizlerin sonuçları değerlendirildiğinde, pestisit tespit edilen numune sayısının oransal olarak az olduğu görülmektedir. Özellikle yaz aylarında, zehirlenme vakalarında toksikolojik inceleme amaçlı numune akışı artmasına karşın tespit edilen pestisitli örnek sayısı son derece azdır. Bu durum numunelerin zehirlenmenin mikrobiyolojik veya pestisit kaynaklı olup olmadığı yönünde detaylı bir değerlendirme yoluna gidilmeden yollandığı düşüncesini akla getirmektedir. Zira, gönderilen numunelerde genellikle mikrobiyolojik bir kontaminasyonun tespit edildiği yönündeki bilgilerimiz, yukarıda ifade ettiğimiz fikrimizi destekler nitelikte görülmektedir.

Sonuç olarak pestisitlerle zehirlenme olgusu halen ülkemiz için önemli bir halk sağlığı problemidir. Ancak zehirlenme şüphesinde, öncelikle ilgililer tarafından klinik bulgular ile epidemiyolojik verilerin iyi değerlendirildikten sonra numunelerin elde edilen bilgilerle birlikte laboratuvarlara yönlendirilmesi hem doğru sonuçlara kısa süre ulaşılması

hem de halk sağlığı yönüyle olaya kısa zamanında yardımcı olunması açısından önemli görülmektedir. Pestisitler konusunda halkın bilinçlendirilmesi amacıyla sektörler arası iş birliği yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Vural N., Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:56, Ankara, 1984
2. Özmen Y., Türkiye'de Tarım İlaçlarının Kullanımı ve Üretimi, <http://www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/044yilmazozmen.pdf>
3. Delen N., Durmuşoğlu E., Güngör N., Gürcan A., Turgut C., Burçak A., Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı Ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, 2005.
4. Öztürk S., Tarım İlaçları. Genişletilmiş 2. Baskı. Ak Basmevi, İstanbul, 1997, 553.
5. Pang GF, Liu YM, Fan CL, Zhang JJ, Cao YZ, Li XM, Li ZY, Wu YP, Guo TT, Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* (2006) 384: 1366-408.
6. Fernández-Gutiérrez A, Martínez-Vidal JL, Arrebola-Liébanas FJ, Gonzalez-Casado A, Vilchez JL, Determination of endosulfan and some pyrethroids in waters by micro liquid-liquid extraction and GC-MS, *Fresenius J Anal Chem* (1998) 360 : 568-72.
7. Barrek S, Paise O, Grenier-Loustalot MF, Determination of residual pesticides in olive oil by GCMS and HPLCMS after extraction by size-exclusion chromatography, *Anal Bioanal Chem* (2003) 376 : 355-59.
8. Chuanga JC, Hart K, Changa JS, Bomanb LE, Van Emonc LM, Reedc AW, Evaluation of analytical methods for determining pesticides in baby foods and adult duplicate-diet samples, *Anal Chim Acta* 444 (2001) 87-95.
9. Soliman KM, Changes in concentration of pesticide residues in potatoes during washing and home preparation, *Food Chem Toxicol* 39 (2001) 887-91.
10. Jens D, van Rijn M, Beens J, Vreuls RJJ, Brinkman UA, Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-off light mass spectrometric detection applied to the determination of pesticides in food extracts, *J Chromatog A*, 965 (2002) 207-17.

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOKLARIN METİSİLİN, FUSİDİK ASİT VE MUPİROSİN DİRENCİ

Methicillin, Fusidic Acid and Mupirocin Resistance in Staphylococci Isolated from Clinical Specimens

Nimet YİĞİT¹, Ayşe Esin AKTAŞ², Funda DOĞRUMAN AL³

¹Atatürk Üniversitesi,
Sağlık Hiz. Meslek Yüksek Okulu,
Tıbbi Laboratuvar Bölümü,
ERZURUM

²Atatürk Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Mikrobiyoloji ve Klinik,
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,
ERZURUM

³Gazi Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim
Dalı,
ANKARA

İletişim:
Nimet YİĞİT
Atatürk Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri M.Y.O.
Tıbbi Laboratuvar Bölümü,
Aziziye Araştırma Hastanesi,
Yenişehir/ERZURUM
Faks : 0 442 315 60 44
Tel : 0 533 467 87 17

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, değişik klinik örneklerden izole edilen 136 stafilokok suşunun metisilin, fusidik asit ve mupirosin duyarlılığının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Suşların metisilin, fusidik asit ve mupirosin duyarlılıkları Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile araştırılmıştır.

Bulgular: Bu suşların 36 (%26.5)'sı metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok (MRKNS), 65 (%47.8) metisilin duyarlı koagülaz negatif stafilokok (MSKNS), 14 (%10.2)'ü metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), 21 (%15.5)'i metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) olarak sınıflandırıldı. Fusidik aside direnç oranı MRKNS'lerde 10 (%27.7), MSKNS'lerde 14 (%21.6), MRSA'larda iki (%14.2), MSSA'larda üç (%14.3) olarak belirlenmiştir. Mupirosine direnç oranı MRKNS'lerde beş (%13.9), MSKNS'lerde yedi (%10.8), MRSA'larda iki (%14.2), MSSA'larda bir (%4.7) olarak saptanmıştır.

Sonuç: *S. aureus* ve KNS'ler klinik örneklerden sıklıkla izole edilmekte ve metisilin dirençleri artmaktadır. Fusidik asit ve mupirosin metisiline duyarlı ve dirençli stafilokokların etken olduğu enfeksiyonlarda iyi bir tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Stafilokok, metisilin direnci, mupirosin direnci, fusidik asit direnci

ABSTRACT

Objective: The aim of this study, was to determine susceptibility of 136 staphylococcus strains isolated from various clinical specimens against methicillin, fusidic acid and mupirocin.

Method: The methicillin, fusidic acid and mupirocin susceptibility of the strains were investigated with the Kirby-Bauer disc-diffusion method.

Results: The Staphylococcus strains were classified as follows; 36 (26.5%) methicillin resistant coagulase negative staphylococci (MRCNS), 65 (47.8%) methicillin sensitive coagulase negative staphylococci (MSCNS), 14 (10.2%) methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 21 (15.5%) methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA). The rates of resistance to fusidic acid were 10 (27.7%) in MRCNS, 14 (21.6%) in MSCNS, 2 (14.2%) in MRSA and 3 (14.2%) in MSSA. The rates of resistance to mupirocin were 5 (13.9%) in MRCNS, 7 (10.8%) in MSCNS, 2 (14.2%) in MRSA and 1 (4.7%) in MSSA.

Conclusion: *S. aureus* and CNS are common isolates from clinical specimens and an increasing proportion of them are now methicillin resistant. Fusidic acid and mupirocin can be considered as an alternative drug for the treatment of infections due to both methicillin susceptible and resistant staphylococci.

Key Words: Staphylococci, methicillin resistance, mupirocin resistance, fusidic acid resistance

GİRİŞ

Stafilokoklar, insanlarda gerek normal flora gerekse potansiyel patojen etken olarak sık bulunan bakterilerdir ve hem hastane hem de hastane dışı enfeksiyonlarda önemli rol oynamaktadırlar. Özellikle son yıllarda artış gösteren metisilin dirençli stafilokok suşları, mevcut pek çok antibiyotige ve anti-septiklere direnç göstermektedir. Çoklu antibiyotik direncinin beraberinde getirdiği tedavi güçlüğüne ve nozokomiyal epidemilere yol açabilen bir patojen olması nedeni ile metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), tüm dünyada ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Koagülaz Negatif Stafilokok (KNS) izolatlarına bağlı hastane enfeksiyonları ise *Escherichia coli* ve *S.aureus*'tan sonra birçok hastanede üçüncü sırayı almaktadır (1-3).

Fusidik asit, *Fusidium coccineum* isimli mantardan izole edilen ve bakteri protein sentezini ribozomlara bağlanmadan inhibe eden bir antibiyotiktir. Sağlam ve zedelenmiş deriye penetre olabildiği için tedavide avantaj sağlamakta ve nazal taşıyıcılık eradikasyonunda da kullanılmaktadır (1, 4). Fusidin olarak adlandırılan sodyum tuzu, ilk defa 1962 yılında Avrupa'da, 1998 yılı başlarında ise Türkiye'de üretilerek klinik kullanıma girmiştir. Başlıca penisilinaz üreten ve metisiline dirençli stafilokok suşları dahil olmak üzere gram pozitif aerob, gram pozitif ve negatif anaerob bakteriler üzerinde etkilidir. Sodyum fusidat ve beta laktam antibiyotikler arasında çapraz direnç olmadığı bildirilmektedir (2, 5). Fusidik asit çeşitli dokularda iyi dağılması, toksisitesinin ve alerjik reaksiyonlarının az olması, klinikte kullanılan diğer antibiyotiklerle çapraz reaksiyon vermemesi gibi özelliklerinden dolayı hem sistemik hem de topikal stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önerilen bir ilaçtır (4).

Pseudomonas fluorescens'den elde edilen mupirosin, bakteri RNA ve protein sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Mupirosin bir izolösin analogu olup izolösin tRNA sentetaz enzimine kompetitif bağlanarak geri dönüşümsüz olarak enzimin çalışmasını engeller; MRSA suşlarına, ayrıca streptokok ve enterokoklara karşı çok etkilidir. Stafilokok ve strep-

tokokların neden olduğu deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde, *S.aureus* ile kolonize hastane personeli ve hastalardan bu bakterilerin eradikasyonu için kullanılan topikal bir antibiyotiktir (1, 4).

Çalışmamızda değişik klinik örneklerden izole edilen 136 stafilokok suşunun metisilin, fusidik asit ve mupirosine direnç oranları araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri suşları

Çalışmamızda, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na klinik ve polikliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen 136 stafilokok suşu incelenmiştir. Klinik örneklerden %5 koyun kanlı agar yapılan ekimler, 37° C'de 18-24 saatlik inkübasyona alınmıştır. Üreyen gram pozitif koklar klasik mikrobiyolojik yöntemlerle (koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz ve tüp koagülaz testi) *S.aureus* ve KNS olarak tanımlandı. Çalışmada standart suş olarak *S.aureus* ATCC 25923 suşu kullanılmıştır.

Metisilin direnci

Klinik örneklerden izole edilerek tanımlanan bu suşların, metisilin duyarlılığı, Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile belirlenmiştir. Suşların her birinden McFarland 0.5 bulanıklığına denk gelen süspanسیونlar hazırlanmıştır. Bu süspanسیونlar Mueller-Hinton Agar Besiyerlerine yayılarak besiyeri üzerine metisilin diskleri (5µg Oxoid) yerleştirildi ve 37° C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları ölçülerek sonuçlar değerlendirildi. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standartlarına göre ≥14 mm zon çapı duyarlı, 10-13 mm zon çapı orta duyarlı, ≤9 mm zon çapı dirençli olarak kabul edilmiştir. (6).

Fusidik asit direnci

Metisilin direnci belirlenen suşların fusidik asit duyarlılığı, Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile belirlenmiştir. Suşların her birinden McFarland 0.5 bulanıklığına denk gelen süspanسیونlar hazırlandı. Bu süspanسیونlar Mueller-Hinton Agar Besiyerlerine yayılarak besiyeri üzerine fusidik asit diskleri (10µg Oxoid) yerleştirildi ve 37° C'de 24 saatlik inkübas-

yondan sonra zon çapları ölçülerek sonuçlar değerlendirildi. CLSI standartlarına göre ≥ 22 mm zon çapı duyarlı, 22 mm > zon çapı > 15 mm orta duyarlı, ≤ 15 mm zon çapı dirençli olarak kabul edildi (6).

Mupirosin direnci

Çalışmada kullanılan suşların mupirosin duyarlılığı Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi ile belirlendi. Suşların her birinden McFarland 0.5 bulanıklığına denk gelen süspansiyonlar hazırlandı. Bu süspansiyonlar Mueller-Hinton agar besiyerlerine yayılarak besiyeri üzerine mupirosin diskleri (5µgr Oxoid) yerleştirildi ve 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları ölçülerek sonuçlar değerlendirildi. CLSI standartlarına göre ≥ 14 mm zon çapı duyarlı, ≤ 13 mm zon çapı dirençli olarak tespit edildi (6).

BULGULAR

Stafilokok suşları

Çalışmada, 136 stafilokok suşu izole edilmiş bunların 101'i KNS ve 35'i *S.aureus* olarak tiplendirilmiştir. Çalışma kapsamında incelenen bu suşların

Tablo 1. Stafilokok suşlarının izole edildiği klinik örnekler

Klinik Örnek	MRSA	MSSA	MRKNS	MSKNS
Yara (n=52)	5	11	12	24
Kan (n=27)	6	1	10	10
Endotrakeal aspirat (n=22)	1	1	5	15
Kulak akıntısı (n=18)	2	4	2	10
İdrar (n=10)	-	1	4	5
Periton sıvısı (n=4)	-	1	3	-
BOS (n=3)	-	2	-	1
Toplam (n=136)	14	21	36	65

Tablo 2. Stafilokok suşlarının kliniklere göre dağılımı

Klinik	MRSA	MSSA	MRKNS	MSKNS
Ortopedi	2	3	5	10
Nefroloji	1	2	6	10
Cildiye	1	6	6	12
KBB	2	4	3	9
Pediyatri	4	2	6	7
Beyin cerrahi	1	2	1	3
Enfeksiyon hastalıkları	2	1	3	6
Nöroloji	1	1	6	8
Toplam	14	21	36	65

izole edildiği hastaların, 74'ü erkek (%54.5), 62'si (%45.5) kadın hastalara ait olarak belirlenmiştir.

Metisilin direnci. Çalışma sonucunda 136 suşun 36'sı (%26.5) metisilin dirençli KNS (MRKNS), 65'i (%47.8) metisilin duyarlı KNS (MSKNS) olarak; 136 suşun 14'ü (%10.2) MRSA, 21'i (%15.5) metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) olarak belirlenmiştir. Bu suşların, klinik örnekler göre dağılımı Tablo 1'de, gönderildikleri kliniklere göre dağılımı Tablo 2'de verilmiştir.

Fusidik asit ve mupirosin direnci. MRKNS'lerden beşi (%13.9) mupirosine, onu (%27.7) fusidik aside; MSKNS'lerden yedisi (%10.8) mupirosine, 14'ü (%21.6) fusidik aside dirençli bulunmuştur. 136 stafilokok suşunun MRSA suşlarının ikisi (%14.2) mupirosin, ikisi (%14.2) fusidik aside dirençli, MSSA'ların biri (%4.7) mupirosin, üçü (%14.3) fusidik aside dirençli bulunmuştur. MRSA suşlarından biri (%7.1), MSSA suşlarından ikisi (%9.6), MRKNS suşlarından ikisi (%5.5) ve MSKNS suşlarından dördü (%6.1) fusidik aside orta dirençli olarak bulunmuştur. Metisilin duyarlı ve dirençli bulunan stafilokok suşlarının mupirosin ve fusidik asit direnci Tablo 3'de verilmiştir.

TARTIŞMA

Hayatı tehdit eden nozokomiyal enfeksiyonlardan en sık soyutlanan etkenlerin başında gelen stafilokoklar, antibiyotiklere karşı gittikçe artan dirençleri nedeniyle gerek hastanelerde gerekse toplum kökenli enfeksiyonlarda büyük bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Stafilokok enfeksiyonlarında doğru tedavinin yapılabilmesi için metisilin direncinin saptanması gereklidir. Metisilin direncinin bilinmesi, hem beta-laktam hem de beta-laktam olmayan bazı antibiyotiklerin seçimi ve klinik kullanımında rehber olabilmektedir (7, 8).

Stafilokokların metisilin direnci, ülkeden ülkeye hatta bölgeden bölgeye değişiklik göstermektedir. Ülkemizde yapılan değişik çalışmalarda metisilin direnci *S.aureus* suşlarında %30-%55.2, KNS suşlarında ise %14-46 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir (1, 2, 7, 9-11). Çalışmamızda 136 stafilokok suşunun 14'ü (%10.2) MRSA, 21'i (%15.5) MSSA, 36

Tablo 3. Metisilin dirençli ve duyarlı stafilocok suşlarının mupirosin ve fusidik asit direnci

Stafilocokoklar	Mupirosin				Fusidik Asit					
	Duyarlı		Dirençli		Duyarlı		Orta Duyarlı		Dirençli	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
MRSA (n=14)	12	86.0	2	14.2	11	78.5	1	7.1	2	14.2
MSSA (n=21)	20	95.2	1	4.7	16	76.1	2	9.6	3	14.3
MRKNS (n=36)	31	86.1	5	13.9	24	66.6	2	5.5	10	27.7
MSKNS (n=65)	58	89.2	7	10.8	47	72.3	4	6.1	14	21.6
Toplam	121	88.9	15	11.0	98	72.0	9	6.6	29	21.4

Yüzdeler satır yüzdesidir

Mupirosin için: ≥ 14 mm duyarlı, ≤ 13 mm dirençli.Fusidik asit için: ≥ 22 mm duyarlı, 22 mm > zon çapı > 15 mm orta duyarlı, ≤ 15 mm dirençli.

(%26.5)'sı MRKNS ve 65'i (%47.8) MSKNS olarak tanımlanmıştır. Metisiline direnç oranı *S.aureus* suşlarında %10.2, KNS suşlarında ise %26.5'dir. MRSA suşlarının altısı kan, beşi yara, ikisi kulak akıntısı ve biri endotrakeal aspirat örneğinden; MRKNS suşlarının ise 12'si yara, 10'u kan, beşi endotrakeal aspirat, dördü idrar, üçü periton sıvısı ve ikisi kulak akıntısı örneklerinden izole edilmişlerdir. Metisilin dirençli stafilocok suşları, en sık yara ve kan örneklerinden izole edilmiştir.

Beta-laktam antibiyotiklere dirençli *S.aureus*'un neden olduğu enfeksiyonların insidansında ve prevalansındaki artış ve beta-laktam allerjisi nedeniyle stafilocok enfeksiyonlarının tedavisinde fusidik asidin kullanımı gündeme gelmiştir. Fusidik asit, steroid yapıda bir antibiyotiktir. Bakteri hücrelerinde elongasyon faktör G (EF-G)-ribozom kompleksine bağlanarak EF-G'nin GTPaz aktivitesini inhibe eder ve peptid bağlarının oluşmasını engeller. Böylelikle protein sentezi durdurulur. Dar spektrumlu olan fusidik asit, metisiline dirençli suşlar da dahil olmak üzere stafilocoklar üzerinde etkilidir. *Staphylococcus saprophyticus*'a etkinliği ise kısıtlıdır (12). Gerek metisiline dirençli gerekse duyarlı olan stafilocok suşlarında in vitro fusidik asit duyarlılığı yüksektir. Bu nedenle özellikle metisiline dirençli suşlarla gelişen hafif ve orta şiddetteki stafilocok enfeksiyonlarının tedavisinde oral olarak kullanılabilme özelliği fusidik asidi önemli kılmaktadır (2). Akut enfeksiyon tedavisi sırasında fusidik asit kullanıldığında direnç gelişme olasılığı, %0.2 olup stafilocoklarda direnç, kromo-

zomal mutasyonlar ya da plazmid aracılığı ile gelişmektedir (13). Fusidik asit direncinin araştırıldığı çalışmalarda (Tablo 4) farklı direnç oranları belirlenmiştir (2,3,9,11-13, 18-22).

Çalışmamızda MRSA'larda %14.2 oranında, MSSA'larda %14.3 oranında, MRKNS'lerde %27.7 oranında, MSKNS'lerde ise %21.6 oranında fusidik asit direnci belirlenmiştir. Fusidik aside dirençli iki MRSA suşu kan, üç MSSA suşundan biri kan, ikisi yara, 10 MRKNS suşunun sekizi kan, biri yara, biri kulak akıntısı, 14 MSKNS suşunun beşi kan, sekizi yara, biri de endotrakeal aspirat örneklerinden izole edilen suşlardır. Özellikle kan ve yara örneklerinden izole edilen suşlardaki direnç dikkat çekicidir. Çalışmamız diğer çalışmalara paralellik göstermekte olup, fusidik asit direnci, KNS'lerde daha yüksek olarak belirlenmiştir.

Fusidik asit ABD'de lisanslı olmadığı için, NCCLS önerileri içinde duyarlılık sınırına dair değer bulunmamaktadır (14). Ancak gerek İngiliz Antimikrobiyal Kemoterapi Derneği, gerek Fransa Mikrobiyoloji Derneği, gerekse bu konuda standart oluşturmak amacıyla yapılmış çalışmalar, fusidik asidin stafilocoklar için MİK değerlerini duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olmak üzere sırasıyla; ≤ 0.125 mg/L, $0.5-1$ mg/L ve ≥ 2 mg/L olarak, disk difüzyon için ≥ 22 mm zon çapı duyarlı, 22 mm > zon çapı > 15 mm orta duyarlı, ≤ 15 mm zon çapı dirençli olarak bildirmektedir (15-17).

Çalışmamızda, fusidik asit için orta duyarlılık değerleri MRSA suşlarında %7.1, MSSA suşlarında %9.6,

Tablo 4. Değişik çalışmalarda stafilocoklarda saptanan fusidik asit direnç oranları

Kaynak	Yıl	Yöntem	Fusidik Asit Direnci (%)			
			MSSA	MRSA	MSKNS	MRKNS
Özyurt ve ark. (18)	1999	Disk difüzyon	6.8	3.8	17.4	15.4
Tünger ve ark. (19)	1999	Disk difüzyon	1.5	5.4	6.9	10
Gökdal ve ark. (20)	1999	Disk difüzyon	15.4	33.4	22.9	23.5
Altun ve ark. (9)	2003	Disk difüzyon	0	3	0	13
Şengöz ve ark. (2)	2004	Disk difüzyon	1	9	21	33
Çelen ve ark. (11)	2005	Disk difüzyon	3.6	20.3	-	-
Akçay ve ark. (13)	2005	Disk difüzyon	-	13	-	-
Azap ve ark. (12)	2005	Mikro dilüsyon	0	0.8	-	-
Shittu and Lin (3)	2006	Disk difüzyon	0	0	-	-
Kuzucu ve ark. (21)	2003	Disk difüzyon	-	4	-	27
		Mikro dilüsyon	-	6	-	24
Beğendik ve ark. (22)	2000	Disk difüzyon	-	12	-	16.5
		Mikro dilüsyon	-	12	-	16.5

MRKNS suşlarında %5.5 ve MSKNS suşlarında %6.1 olarak bulunmuştur. Azap ve ark. (12) mikrodilüsyon yöntemi ile MRSA suşlarında fusidik asit için orta duyarlılık oranını %1.6 olarak, Akçay ve ark. (13) disk difüzyon yöntemi ile orta duyarlılık oranını MRSA'da %3 olarak, Öztürk ve ark.(5) mikrodilüsyon yöntemi ile orta duyarlılık oranını MRSA'larda %1.2 olarak, Çelen ve ark. (11) ise disk difüzyon yöntemi ile fusidik aside orta duyarlı suşların oranını MRSA'larda %8.7 MSSA'larda ise %8.9 olarak belirlemişlerdir.

Mupirosin, stafilocoklarda oluşan dirence alternatif olarak kullanılan diğer bir antibiyotik olup dünyada 1985, Türkiye'de 1991 yılında klinik kullanıma girmiştir (1). Mupirosin özellikle nazal taşıyıcılığın ve deri kolonizasyonunun eradikasyonunda, dermatit, impetigo ve yanık yaralarının tedavisinde başarıyla kullanılan bir antibakteriyeldir. Metisilin dirençli stafilocokların neden olduğu primer ve sekonder cilt enfeksiyonlarının tedavisinde de deneysel olarak oldukça etkili olduğu bildirilmektedir (13). Mupirosinin klinik kullanımından çok kısa bir süre sonra stafilocoklarda direnç görülmüştür. Stafilocoklarda mupirosine direnç gelişimi, düşük ve yüksek düzeyde olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Düşük düzeyde direnç, daha fazla görülmekte ve kromozom üzerinde nokta mutasyonla meydana gelmektedir.

Yüksek düzeyde direnç ise plazmidler aracılığı ile oluşmaktadır (1). Mupirosin direncinin araştırıldığı çalışmalarda (Tablo 5), farklı direnç oranları belirlenmiştir (1,13, 23-27).

Çalışmamızda MRSA'larda %14.2 oranında, MSSA'larda %4.7 oranında, MRKNS'lerde %13.9 ve MSKNS'lerde %10.8 oranında mupirosin direnci belirlenmiştir. Mupirosine dirençli iki MRSA suşu kan, bir MSSA suşu kulak akıntısı, yedi MSKNS suşundan üçü kan, üçü endotrakeal aspirat, biri yara, beş MRKNS suşu ise kan örneklerinden izole edilmiştir. Diğer çalışmalarda KNS'larda *S.aureus*'a göre daha yüksek oranda mupirosin direnci belirlenmiş olmasına karşın çalışmamızda MRSA suşlarında, daha yüksek bir direnç oranı belirlenmiştir (Tablo 5).

Yapılan çalışmalarda, fusidik asit ve mupirosinin gerek in vitro, gerekse klinik olarak deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde oldukça etkili olduğu bildirilmektedir. Akılcı olmayan antibiyotik kullanımı sonucu artan direnç gelişiminin önlenmesi için fusidik asidin diğer antibiyotikler ile kombine olarak kullanılması önerilmektedir (11, 13).

Sonuç olarak antibiyotik direncinin in vivo olarak başarısızlığa neden olduğu MRSA ve MRKNS enfeksiyonlarında fusidik asidin etkili bir antibiyotik olduğu düşünülmektedir. Fusidik asit ve diğer anti-sta-

Tablo 5. Değişik çalışmalarda stafilocoklarda saptanan mupirosin direnç oranları

Kaynak	Yıl	Yöntem	Mupirosin Direnci (%)			
			MSSA	MRSA	MSKNS	MRKNS
Öngen ve ark. (23)	2000	Disk difüzyon	3	5	25	41
Yun ve ark. (24)	2003	Disk difüzyon	0.3	4.7	4.0	23.0
Kresken ve ark. (25)	2004	Disk difüzyon	0.5	16.6	0.7	18.2
Gales ve ark. (26)	2004	Disk difüzyon	1.7	5.4	4.6	33.7
Akçay ve ark. (13)	2005	Disk difüzyon		9		
Gündüz ve ark. (27)	2005	Disk difüzyon	10.8	14	22.5	28.2
Ünlü ve ark. (1)	2006	Disk difüzyon	10.6	31.6	3.6	16.7

filokokal ajanlara direnç gelişimini engellemek amacıyla tedavi endikasyonlarının doğru konması, kullanılacak antimikrobiyal ilacın kültür ve antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre seçilmesi ve bu şartların yerine getirilebilmesi için kültür ve duyarlılık testi sonuçlarının ilgili kliniğe süratle ulaştırılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Ünlü VG, Ünlü M, Yağmuroğlu A. Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocok izolatlarında mupirosin direnci. ANKEM Derg 2006; 20(4): 222-25
2. Şengöz G, Yıldırım F, Yaşar KK, Şengöz A, Nazlıcan Ö. Stafilocok suşlarının fusidik asit ve çeşitli antibiyotiklere direnci. ANKEM Derg 2004; 18(2): 105-8
3. Shittu AO, Lin J. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in KwaZulu-Natal province, South Africa. BMC Infect Dis.2006; 6: 125-9
4. İşgör A, Sultan N. Topikal antibiyotik kullanımı gerekli mi? ANKEM Derg 2007; 21(2): 118-24
5. Öztürk F, Öngüt G, Demirbakan H, Dağlar D, Kızılateş F, Öğünç D, Gültekin M. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında fusidik asit duyarlılığının sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması. ANKEM Derg 2005; 19(3): 135-8
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (Çeviri Editör Gür D.): Antibiyotik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları; Onbeşinci Bilgi Eki, M100-S15; CLSI: Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2005
7. Yakupoğulları Y, Gündüz A, Özcan M, Doğukan M, Seyrek A, Yılmaz M. *Staphylococcus aureus* suşlarının siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin Duyarlılıkları. Fırat Tıp Dergisi 2006;11(1):45-7
8. Hasbek M, Hakgüdenler Y, Kaya S, Bakıcı ZM. Stafilocoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle belirlenmesi ve çoğul antibiyotik direnci. C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 24(4): 179-84
9. Altun B, Kocagöz S, Haşçelik G, Uzun Ö, Akova M, Ünal S. Çeşitli hastanelerde izole edilen stafilocok suşlarının fusidik asit ve sık kullanılan diğer antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2003; 33: 8-11
10. Erdemoğlu A, Özsoy FM, Emekdaş G, Öncül O, Pahsa A. İdrardan izole edilen oksasiline duyarlı ve dirençli stafilocok suşlarının fusidik asit ve diğer antimikrobik maddelere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2000; 30: 6-12
11. Çelen MK, Ayaz C, Özmen E, Geyik MF, Hoşoğlu S. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının fusidik asit direnci. Klimik Dergisi, 2005; 18(3): 114-6.
12. Azap A, Aygün H, Özkan S, Memikoğlu O, Bozkurt GY, Genç A, Şahintürk H, Tekeli E. Fusidik asidin *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı in-vitro etkinliği. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2005; 58: 39-41
13. Akçay SŞ, Oğuzoğlu N, İnan AŞ, Küçükercan M, Çobanoğlu F. Deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının fusidik asit ve mupirosin duyarlılığı. Klimik Dergisi, 2005;18(3):117-20.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-Sixth Edition: Approved Standard M7-A6. NCCLS, 2003, PA, USA.
15. Contant C, Olden D, Bell J. Disk diffusion interpretive criteria for fusidic acid susceptibility testing of *Staphylococci* by the NCCLS method. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 25: 9-13
16. Working party on antibiotic sensitivity testing of the

- British Society for Antimicrobial Chemotherapy. A guide to sensitivity testing. J Antimicrob Chemother 1991;27(suppl D): 1-50
17. Comite de L'antibiogramme de la Societe Française Microbiologie. Communiqué 1996. Pathol Biol 1996; 44: 1-8
 18. Özyurt M, Saraçlı MA, Aydoğan H., Başustaoğlu A. Nozokomiyal stafilocok izolatlarında fusidik asidin in vitro etkinliği. 9. Türk Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 3-8 Ekim 1999, Antalya.
 19. Tünger Ö, Kurutepe S, Arısoy AS, Akçalı S, Özbakaloğlu B. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan stafilocok suşlarında fusidik asit duyarlılığının araştırılması. 9. Türk Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 3-8 Ekim 1999, Antalya.
 20. Gökdal İİ, Çağlar K, Rota S. *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocok suşlarının fusidik aside duyarlılıkları. 9. Türk Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 3-8 Ekim 1999, Antalya.
 21. Kuzucu Ç, Dalgalar M, Durmaz B. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocoklarda fusidik asit duyarlılığı. ANKEM Derg 2003; 17(1): 7-9.
 22. Beğendik F, Fidan I, Sultan N, Türet S. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilocok suşlarının fusidik aside direnç durumu. ANKEM Derg 2000; 33: 8-11.
 23. Öngen B, Otağ F, Gürler N, Töreci K. Klinik örneklerden izole edilen stafilocok suşlarında fusidik asit ve diğer antimikrobik maddelere direnç. ANKEM Derg 2000; 14(1): 36-8.
 24. Yun HJ, Lee SW, Yoon GM. et al: Prevalence and mechanisms of low-and high-level mupirocin resistance in *Staphylococci* isolated from a Korean hospital. J Antimicrob Chemother 2003; 51 (3): 619-23.
 25. Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, Wichelhaus TA. Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the Antimicrobial Resistance Surveillance Study of the Paul-Ehrlich Society for Chemotherapy. Int J Antimicrob Agents 2004; 23(6): 577-81.
 26. Gales AC, Andrade SS, Sader HS, Jones RN. Activity of mupirocin and 14 additional antibiotics against *Staphylococci* isolated from Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. J Chemother 2004; 16(4): 323-8.
 27. Gündüz T, Tosun S, Demirel MM. Bir çocuk hastanesinde izole edilen stafilocokların mupirosin duyarlılığı. İnfeksiyon Dergisi 2005: 19(3) : 345-7.

ASETİKOLİNİN İZOLE KURBAĞA AKCİĞER ŞERİTLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNE YÖNELİK KARŞILAŞTIRMALI BİR ÇALIŞMA

A Comparative Study on the Effects of Acetylcholine on Frog Lung Tissue

Sühendan ADIGÜZEL^{1,2}, Ramazan UZUN²

¹Çukurova Üniversitesi,
Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı,

²Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi
Başkanlığı,
Zehir Araştırma Müdürlüğü,
ANKARA

İletişim:
Sühendan ADIGÜZEL
Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi
Başkanlığı,
Zehir Araştırma Müdürlüğü,
ANKARA
Tel : 0 312 458 24 60
Faks : 0 312 458 23 95
e-posta: suhendana.adiguzel@rshm.gov.tr

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, parasempatomimetik etkili bir nörotransmitter olan asetilkolinin, tatlı su kurbağasının (*Amfibia*) akciğer dokusunda intrinsek tonus üzerindeki etkilerinin, fizostigmin içeren ve içermeyen ortamlarda değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Kurbağa akciğer dokusuna 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 M konsantrasyonlarında asetilkolin uygulamaları, fizostigmin içermeyen gruplarda ve 10^8 , 5×10^8 ve 10^7 ve 5×10^7 M konsantrasyonlarında fizostigmin içeren gruplarda olmak üzere tek doz tekniği ve kümülatif teknik kullanılarak yapılmış. Oluşan kasılma ve gevşemeler değerlendirilmiştir.

Bulgular: Tek doz asetilkolin uygulamalarında intrinsek tonus üzerine ek bir kasılma elde edilmiş ve bu kasılma kararlılığını korumuştur. Kümülatif tekniğin uygulandığı deneylerde asetilkolinin sebep olduğu kasılma konsantrasyona bağımlı olarak artış göstermiştir. Fizostigminli ortamlarda ise intrinsek tonus üzerine gelişen asetilkolinin yol açtığı kasılmalar kararlılığını koruyamamıştır. Kümülatif asetilkolin uygulamalarının yapıldığı fizostigminli ortam deneylerinde ise fizostigmin içermeyen ortamda yapılan asetilkolin uygulamalarına benzer sonuçlar elde edilmiş; ancak, kasılma boyları daha küçük bulunmuştur.

Sonuç: Otonom sinir sisteminin birçok nörotransmitterinden biri ve somatik sinir sisteminin tek nörotransmitteri olan asetilkolinin etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması ile ilacın etkötör hücre ve / veya gangliyon hücreleri üzerindeki etki güçlerinin farklı olabileceğini ve bu farklılığın ortaya çıkabileceği söylenebilir. Ancak farkın gerçek nedeninin ortaya konulabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Asetilkolin, fizostigmin, intrinsek tonus

ABSTRACT

Objective: The effects of acetylcholine, a parasympathomimetic agent, and acetylcholine plus physostigmine were determined on intrinsic tone of the frog lung tissue.

Method : Acetylcholine was applied to the frog lung tissue *in vitro* at 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 M concentrations in the presence of physostigmine at 10^8 , 5×10^8 , 10^7 and 5×10^7 M concentrations and without physostigmine by using single or cumulative dose techniques. Isometric contractions and relaxations observed during the experiments were measured time- dependently.

Results : During the experiments in which single dose technique was used, acetylcholine caused an additional contraction on intrinsic tone while the contraction did not show any tendency to decrease in monitoring period. The experiments in which cumulative dose during technique was used, a dose-dependent increase was observed in acetylcholine induced contractions. On the other hand, in the presence of physostigmine, the tonus due to acetylcholine exerted a decline with time similar to those in the presence of physostigmine. However, the amplitude of the contractions caused by acetylcholine was smaller than those in the absence of physostigmine.

Conclusion: Acetylcholine, which is one of many neurotransmitters in the autonomic nervous system and the only neurotransmitter used in the somatic nervous system could have a different effect on effector cell and on ganglion. However further studies are necessary to show this.

Key Words: Acetylcholine, physostigmine, intrinsic tone.

GİRİŞ

Vücut fonksiyonlarını düzenleyen ve kontrol eden temel sistemler; sinir sistemi ve endokrin sistemidir. Bu iki sistemdeki temel farklılık, bilginin iletilme şeklindedir. Endokrin sistemde iletim, esas olarak kan dolaşımına salınan kimyasal maddelerle olur. Oysa sinir sisteminde sinir lifleri boyunca bir elektriksel iletim söz konusudur. Ancak sinir hücreleri arasındaki bu iletimde de sinir uçlarından salınan çok küçük miktarlardaki transmitter veya "nöromediyatör" adı verilen kimyasal maddeler rol alır. Salınan kimyasal aracı sinaps aralığını geçer ve özel reseptörlere bağlanarak sinir hücrelerini etkiler (1). Sinir ucu ile kontrol edilen organ hücresi arasında (nöroefektör kavşak) iletimi sağlayan kimyasal aracı, sempatik sistemde noradrenalin; parasempatik sistemde ise asetilkolin (ACh)'dir. O nedenle sempatik sisteme adrenerjik sistem, parasempatik sisteme de kolinerjik sistem adı verilir. Bu kimyasal araçlar, kendilerine özgü reseptörleri aktive ederek etkilerini gösterirler. Bu reseptörler de adrenerjik veya kolinerjik reseptörler adını alır. Adrenerjik reseptörler fonksiyonları bakımından alfa ve beta reseptörler olarak ikiye ayrılır. Kolinerjik reseptörler de nikotinik ve muskarinik reseptörler olarak gruplandırılır. Ancak kolinerjik sistemde sinir ucunun etkilediği efektör hücredeki reseptörler, genellikle muskarinik tiptedir. Asetilkolin, düz kaslar ve enterik sinir sistemi salgı hücrelerinde eksitator etki gösteren birincil transmitterdir (1, 2). Asetilkolin parasempatik ve kolinerjik sinirler üzerine etkili önemli bir nörotansmitter olmasına rağmen etkisi çok kısa sürdüğünden tedavide ilaç olarak pek kullanılmaz (3-5). Fizostigmin ise doğal olarak oluşan bir karbamattır ve tersier amin yapısındadır. Tedavide kullanımını Miyastenia Gravis hastalığı ile sınırlıdır (2). Vücutta etkisini asetilkolinesterazın substratı olarak gösteren fizostigminin oluşturduğu enzim-substrat bileşiği asetilkolinesterazı geçici olarak inhibe ederek kolinerjik aktivitenin artmasına sebep olur (1). Diğer taraftan kolinerjik reseptörlere bağlanarak asetilkolinin etkilerini taklit eden karbakol ve betanekol gibi sentetik esterler vardır. Karbakol, hem muska-

rinik hem de nikotonik etkiler gösteren bir maddedir (6).

Tatlı su kurbağası (*Amfibia*)'nın, akciğer dokusunda asetilkolinin, fizostigmin içeren ve içermeyen ortamlarda oluşturduğu cevaplar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu çalışmada, elde edilen verilerle, vücutta çok önemli bir nörotansmitter olan asetilkolinin etkilerinin efektör hücre ve / veya gangliyon hücreleri üzerindeki etki güçlerinin ortaya konulması ve ileri çalışmalara katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanı

Çalışmada ağırlıkları 20 ± 5 g olan tatlı su kurbağası kullanılmıştır. Kurbağa gazlı bez ile yakalanarak içinde eter emdirilmiş pamuk bulunan bir kavanoza konularak uyutulmuştur. Makas ile gözlerin birleştiği çizginin arkasından kesilerek kurbağalar dekapite edilmiştir (7). Daha sonra, sırt ortasındaki vertebral kanala stile sokularak *medulla spinalis* harap edilmiştir.

Organ Banyosu Çalışmaları

Sağ ve sol akciğerler bütün olarak çıkarılmış, akciğerler, Ringer solüsyonu (RS) (102.5 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.19mM NaHCO₃ ve 2.77mM Glukoz) içerisine alınmıştır. Sağ ve sol akciğerlerden uzunlamasına alınan şeritler (1,52 cm), sıcaklığı 25 °C de sabit tutulan ve sürekli oksijen (% 95 O₂; % 5 CO₂) verilen organ banyosuna konulmuştur (7). Şeritlere, 0,5 g tansiyon uygulanmış ve Ringer solüsyonunda üç saat inkübasyon sonunda oluşan intrensek tonus 10 dk süre ile kaydedilmiştir (7). Organ şeritlerinin sebep olduğu izotonik kasılmalar kimograf ile 810 kez büyütülerek kaydedilmiştir.

Asetilkolin ve Fizostigmin Uygulamaları

Tek doz Asetilkolin uygulamaları 10^{-6} (n=6), 10^{-5} (n=7), 10^{-4} (n=7), 10^{-3} (n=7) M konsantrasyonlarında, kümülatif uygulamalar ise fizostigminsiz ve 10^{-8} , 5×10^{-8} ve 10^{-7} ve 5×10^{-7} M konsantrasyonlarında fizostigmin içeren ortamlarda yapılmıştır. Bunun sonunda, asetilkolinin meydana getirdiği kasılmalar ve gevşemeler kaydedilmiştir.

Her asetilkolin konsantrasyonu için ayrı bir grup oluşturulmuştur. Uygulamayı takiben organ şeritleri normal Ringer ile yıkanmış ve bir saat süresince tonusdaki düzelme izlenmiştir. İkinci grupta ise fizostigminli ortamlarda kümülatif asetilkolin uygulamalarının etkisi gözlenmiştir. Her bir konsantrasyonun temas süresi 15 dk olacak şekilde ortama sırasıyla 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M konsantrasyonlarında asetilkolin ilave edilmiştir.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Tek ve kümülatif doz uygulama tekniği ile elde edilen intrensek tonus cevapları Adıgüzel (8) tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir. Kümülatif tekniğin kullanıldığı deney gruplarında, her dozun 15. dakikasında oluşan intrensek tonus ölçümleri mm olarak ifade edilmiştir. Her bir konsantrasyondaki veriler $X_1 - X_2$, $X_2 - X_1$ ve $X_3 - X_2$ formülü ile oluşan kasılma ve gevşemeler Adıgüzel (8) tarafından tanımlanan ölçüte uygun olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel Analiz

Ölçümlerde elde edilen değerler mm olarak ifade edilmiştir. Çalışmada, tek doz ACh uygulamasından elde edilen gevşeme/kasılma değerleri ile fizostigminli ortamda farklı konsantrasyondaki asetilkolin uygulamasından elde edilen gevşeme/kasılma değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında iki yönlü tekrarlı ölçümlü varyans analizi (two-way repeated measure ANOVA) kullanılmıştır. Burada ölçülen gevşeme ve kasılma değerleri için farklı dozların, sürenin, ayrıca doz ile sürenin birlikte etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı araştırılmıştır.

Fizostigminli ortamda her bir farklı konsantrasyonda ölçülen değerlerin, kontrol grubu olarak kabul edilen tek doz ACh uygulamasına göre anlamlı bulunan ortalama farklılıkları, ileri karşılaştırma (post hoc) testi olan Dunnett testi ile araştırılmıştır. Ayrıca ortalama gevşeme değerleri açısından farklılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunan zaman dilimleri, LSD (Limiting Dose for Stimulation) testi ile irdelenmiştir. Çalışmada $p < 0.01$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel de-

ğerlendirmede SPSS istatistik paket programı kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmada toplam 35 su kurbağası kullanılmış ve kurbağalar gruplara rasgele olarak dağıtılmıştır. Çalışmanın istatistiksel olarak değerlendirmesinde tercih edilen iki yönlü tekrarlı ölçümlü varyans analizinin uygulanması için öncelikle verilerin normal dağılıma uyumu incelenmiş ve küresellik (sphericity) varsayımı da mauchly küresellik testi ile irdelenmiştir.

Asetilkolinin Etkisi

Tek doz asetilkolin ile fizostigminli ortamda 10^{-6} M konsantrasyondaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerinde hesaplanan ortalama gevşeme değerleri (standart sapma) Tablo 1'de verilmiştir. Bu serideki tüm deneylerde asetilkoline bağlı kasılmalar maksimuma ulaştıktan sonra 20 dakikalık izleme süresince zamanla orantılı bir azalma eğilimi gözlenmiştir. Asetilkolin uygulamasının 20. dakikasında preparatın normal kurbağa Ringer solüsyonu ile yıkanması tüm şeritlerde gevşemeye neden olmuştur (Tablo 1). Bunun sonucunda preparat tonusunun, başlangıçta fizostigminli ortamda intrensek tonusun altına indiği görülmüştür. Zaman dilimleri açısından ortalama gevşeme değerleri arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0.01$). Farklılığı yaratan ortalamaların hangi zaman dilimine ait olduğunun incelenmesinde, LSD testi kullanılmıştır. Test sonucunda, birinci dakikaya ait 4.28 mm olan ortalama gevşeme değerinin, diğer zaman dilimlerde elde edilen ortalama ölçümlerden farklı olduğu görülmüştür. Ayrıca, Tablo 1'in alt satırında yer alan ortalamalara göre, gevşeme miktarının 10. dakikadan itibaren arttığı, 40 dakikadan sonra ise, hafif bir düşüşe geçtiği söylenebilir. Çalışmada, dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada, kontrol grubu olarak ele alınan 10^{-6} M asetilkolin konsantrasyonuna göre, farklılığı yaratan dozun araştırılmasında, Dunnett testi uygulanmıştır. Elde edilen verilerden istatistiksel olarak tek anlamlı fark, 10^{-8} M fizostigmin

Tablo 1. Tek doz asetilkolin ile fizostigminli ortamda 10^{-6} M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki gevşemelerin zamana göre seyri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE GEVŞEME ÖLÇÜMLERİ (mm)							ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	10	20	30	40	50	60	
ACh- 10^{-6} (n=7)	7.17 (0.16)**	12.67 (0.17)	13.33 (0.17)	12.33 (0.23)	13.31 (0.12)	12.16 (0.24)	13.05 (0.12)	12.005
Fiz- 10^{-8} (n=7)	2.78 (0.56)	8.28 (0.89)	9.28 (0.55)	9.28 (0.60)	9.71 (0.63)	8.85 (0.41)	8.85 (0.43)	8.150*
Fiz- 5×10^{-8} (n=6)	2.98 (0.34)	10.66 (0.64)	14.66 (0.88)	14.80 (0.62)	14.52 (0.42)	12.66 (0.64)	12.06 (0.80)	11.763
Fiz- 10^{-7} (n=6)	5.33 (0.65)	12.16 (0.55)	13.83 (0.52)	13.66 (0.53)	13.16 (0.66)	12.33 (0.85)	11.33 (0.76)	11.690
Fiz- 5×10^{-7} (n=6)	3.16 (0.58)	16.16 (0.81)	13.83 (0.52)	14.83 (0.51)	13.53 (0.65)	13.83 (0.58)	13.66 (0.62)	12.719
ORTALAMA GEVŞEME (mm)	4.28	12.08	12.98	12.98	12.84	11.96	11.79	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

konsantrasyonu ile kontrol grubu arasında gözlenmiştir. Doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).

Diğer taraftan, tek doz asetilkolin ile fizostigminli ortamda 10^{-5} M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerinde hesaplanan ortalama gevşeme değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada 20. dakika ile 40. dakikadaki ölçümler dışında diğer tüm ikili zaman dilimlerine ait ölçümlerde ortalama farklar anlamlı çıkmıştır ($p < 0.01$). Dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Yapılan ileri karşılaştırmalar neticesinde, ortalama dozların tümünün kontrol grubundan farklı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). 10^{-5} M asetilkolin ile gözlenen bulgulara benzer şekilde en küçük kasılma en yüksek konsantrasyonda fizostigmin (5×10^{-7} M) içeren ortamda gözlenmiştir. Bu deneysel serilerde kullanılan tüm şeritlerde asetilkoline bağlı kasılmalar maksimuma ulaştıktan sonra azalma eğilimi göstermiştir. Yirminci dakikada Ringer solüsyonu ile ya-

pılan yıkama, şeritlerde gevşemeye neden olmuştur (Tablo 2).

Tek doz asetilkolin ile fizostigminli ortamda 10^{-4} M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının zaman dilimleri açısından ortalama gevşeme değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada, uygulanan ikili karşılaştırmalar sonucunda 10., 40. ve 50. dakikalara ait ölçümlerin benzer olduğu, bunun dışındaki zaman dilimlerine ait ortalama değerlerin farklı olduğu görülmüştür (Tablo 3). Dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada Dunnett testine göre, fizostigminli ortamda 10^{-4} M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasından elde edilen ortalama gevşemelerin tümünün kontrol grubuna ait ortalama değerden farklı olduğu söylenebilir. Doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Tüm deneylerde gelişen bu gevşeme sonucu şeritlerin tonusu fizostigminli ortamda başlangıçta oluşan intrensek tonüsün altına indiği görülmüştür.

Fizostigminli ortamda 10^{-3} M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerin-

Tablo 2. Tek doz asetilkolin ile Fizostigminli ortamda 10^5 M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerinde hesaplanan ortalama gevşeme değerleri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE GEVŞEME ÖLÇÜMLERİ (mm)							ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	10	20	30	40	50	60	
ACh- 10^5 (n=7)	5.07 (0.25)**	6.28 (0.22)	6.57 (0.18)	6.71 (0.22)	7.01 (0.24)	7.14 (0.19)	6.85 (0.19)	6.522
Fiz- 10^8 (n=7)	3.98 (0.64)	12.33 (0.69)	15.66 (0.75)	18.16 (1.07)	17.66 (0.75)	17.08 (0.92)	16.33 (1.15)	14.462*
Fiz- 5×10^8 (n=6)	5.04 (0.81)	12.57 (0.95)	15.71 (1.15)	15.42 (1.14)	15.01 (1.34)	14.42 (1.68)	14.42 (1.68)	13.233*
Fiz- 10^7 (n=6)	8.06 (0.89)	18.42 (1.32)	19.29 (1.03)	18.71 (1.27)	18.43 (0.85)	17.43 (1.26)	17.57 (1.19)	16.845*
Fiz- 5×10^7 (n=6)	10.14 (0.87)	19.29 (0.64)	20.01 (0.75)	19.57 (0.97)	19.09 (1.25)	18.43 (0.73)	17.57 (1.19)	17.729*
ORTALAMA GEVŞEME (mm)	6.46	13.781	15.450	15.719	15.442	14.902	14.552	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

de hesaplanan ortalama gevşeme değerleri Tablo 4'de verilmiştir.

Zaman dilimleri açısından ortalama gevşeme değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada, 10^4 M konsantrasyonundaki asetilkolin, zaman dilimlerinin her birinde hesaplanan ortalama gevşeme değerleri 10^3 M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamasından elde edilen ortalama gevşeme değerlerinden daha küçük olduğu görülmüştür (Tablo 3, 4). Uygulanan ikili karşılaştırmalar sonucunda 40. ve 50. dakikalara ait ölçümlerin istatistiksel olarak aynı olduğu, bunun dışındaki zaman dilimlerine ait ortalama değerlerin tümünün farklı olduğu görülmüştür. Dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Tablo 4'ün son kolonunda verilen ortalama değerlere bakıldığında, 10^4 M asetilkolin konsantrasyonu ile 10^7 ve 5×10^8 M fizostigmin uygulamasındaki ortalama dozların yakın değerler olarak çıkmasına rağmen, Dunnett testine göre, fizostigminli ortamda 10^3 M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasından elde edilen ortalama gevşemelerin tümünün kontrol grubuna ait ortalama değerden farklı olduğu istatistiksel

olarak saptanmıştır ($p < 0.01$). Doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).

Tek doz tekniğinin uygulandığı bütün asetilkolin konsantrasyonları intrensek tonus üzerinde ek bir kasılmaya sebep olmuş ve bu kasılma 20 dakikalık izleme süresince kararlılığını korumuştur (Tablo 5; Şekil 1, 2).

Farklı fizostigminli ortamlarda tek doz 10^6 M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerinde hesaplanan ortalama kasılma değerleri (s.sapma) Tablo 5'de verilmiştir. Zaman dilimleri açısından ortalama gevşeme değerleri arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0.01$). LSD test sonucunda, sadece 3. ve 7. dakikada ölçülen ortalama kasılma değerleri farksız çıkmış; diğer tüm ikili farklar anlamlı bulunmuştur. Ayrıca, Tablo 5'in alt satırında yer alan ortalamalardan kasılma miktarının 7. dakikaya dek artışta olduğu ve 9. dakikadan itibaren ise düşüşe geçtiği söylenebilir. Çalışmada, dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada, en düşük ortalama değer; 10^8 M fizostigminli ortamda elde

Tablo 3. Tek doz asetilkolin ile fizostigminli ortamda 10^{-4} M konsantrasyonundaki asetilkolin uygulamalarının farklı zaman dilimlerinde hesaplanan ortalama gevşeme değerleri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE GEVŞEME ÖLÇÜMLERİ (mm)							ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	10	20	30	40	50	60	
ACh- 10^{-4} (n=7)	16.01 (0.33)**	16.86 (0.13)	16.01 (0.17)	15.50 (0.46)	15.80 (0.12)	16.01 (0.11)	16.16 (0.01)	16.063
Fiz- 10^{-8} (n=7)	12.01 (0.71)	27.71 (0.92)	26.57 (1.14)	27.14 (0.79)	26.14 (1.10)	25.43 (0.93)	24.43 (0.75)	24.206*
Fiz- 5×10^{-8} (n=6)	14.32 (0.50)	29.85 (0.71)	35.52 (1.11)	35.97 (0.39)	35.58 (1.34)	35.88 (0.81)	35.97 (0.99)	31.855*
Fiz- 10^{-7} (n=6)	17.29 (0.76)	38.10 (0.76)	45.20 (0.73)	40.00 (0.79)	35.50 (0.77)	34.10 (0.74)	37.44 (0.76)	35.376*
Fiz- 5×10^{-7} (n=6)	16.50 (0.71)	25.50 (0.70)	25.60 (0.65)	25.30 (0.63)	25.30 (0.73)	26.60 (0.59)	25.10 (0.61)	24.271*
ORTALAMA GEVŞEME (mm)	15.243	27.604	29.780	28.782	27.665	27.605	27.799	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

Tablo 4. Fizostigminli ortamda 10^{-3} M konsantrasyonda tek doz asetilkolin uygulamasındaki gevşemelerin zamana göre seyri

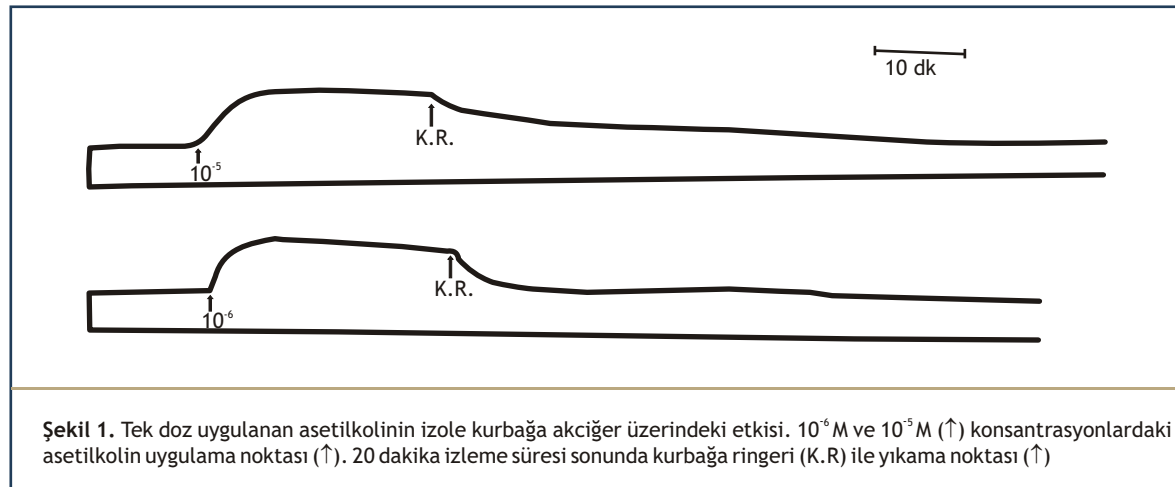
UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE GEVŞEME ÖLÇÜMLERİ (mm)							ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	10	20	30	40	50	60	
ACh- 10^{-3} (n=7)	12.11 (0.32)**	14.33 (0.14)	13.66 (0.21)	12.51 (0.31)	12.87 (0.28)	13.33 (0.20)	14.01 (0.19)	13.261
Fiz- 10^{-8} (n=7)	17.70 (0.65)	24.70 (0.64)	22.43 (0.69)	20.29 (0.59)	17.84 (0.53)	19.57 (0.56)	20.29 (0.60)	20.402*
Fiz- 5×10^{-8} (n=6)	14.85 (0.97)	25.57 (0.60)	25.29 (0.60)	23.00 (0.60)	21.71 (0.68)	20.43 (0.54)	20.29 (0.60)	21.592*
Fiz- 10^{-7} (n=6)	13.10 (0.60)	16.17 (0.55)	17.33 (0.53)	16.00 (0.47)	15.33 (0.54)	13.67 (0.59)	13.50 (0.49)	15.014*
Fiz- 5×10^{-7} (n=6)	11.17 (0.49)	16.50 (0.66)	17.00 (0.47)	16.50 (0.66)	15.50 (0.49)	16.17 (0.57)	16.50 (0.77)	15.619*
ORTALAMA GEVŞEME (mm)	13.788	19.453	19.141	17.660	16.652	16.632	16.917	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

Tablo 5. Fizostigminli ortamlarda tek doz 10^6 M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki kasılmaların zamana göre seyri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE KASILMA ÖLÇÜMLERİ (mm)									ORTALAMA KASILMA (mm)
	1	3	5	7	9	9	12	16	20	
ACh- 10^6 (n=7)	7.32 (0.08)**	12.82 (0.08)	13.22 (0.12)	13.33 (0.16)	13.32 (0.12)	13.32 (0.12)	11.82 (0.20)	10.03 (0.15)	10.17 (0.08)	11.370
Fiz- 10^8 (n=7)	5.14 (0.05)	9.71 (0.29)	10.34 (0.18)	10.41 (0.25)	10.14 (0.08)	10.14 (0.08)	8.71 (0.13)	7.57 (0.10)	6.14 (0.36)	8.338*
Fiz- 5×10^8 (n=6)	9.52 (0.08)	16.80 (0.32)	17.78 (0.32)	16.37 (0.23)	14.52 (0.26)	14.52 (0.26)	12.17 (0.12)	10.63 (0.26)	9.32 (0.17)	12.991*
Fiz- 10^7 (n=6)	8.83 (0.35)	16.08 (0.04)	16.65 (0.51)	15.57 (0.41)	14.08 (0.08)	14.08 (0.08)	11.17 (0.30)	9.77 (0.32)	6.52 (0.33)	11.856*
Fiz- 5×10^7 (n=6)	9.17 (0.25)	18.52 (0.44)	19.17 (0.39)	18.17 (0.49)	16.17 (0.62)	16.17 (0.62)	13.02 (0.15)	11.03 (0.31)	10.33 (0.22)	14.020*
ORTALAMA KASILMA (mm)	4.28	14.786	15.432	14.770	13.645	13.645	11.376	9.808	8.495	

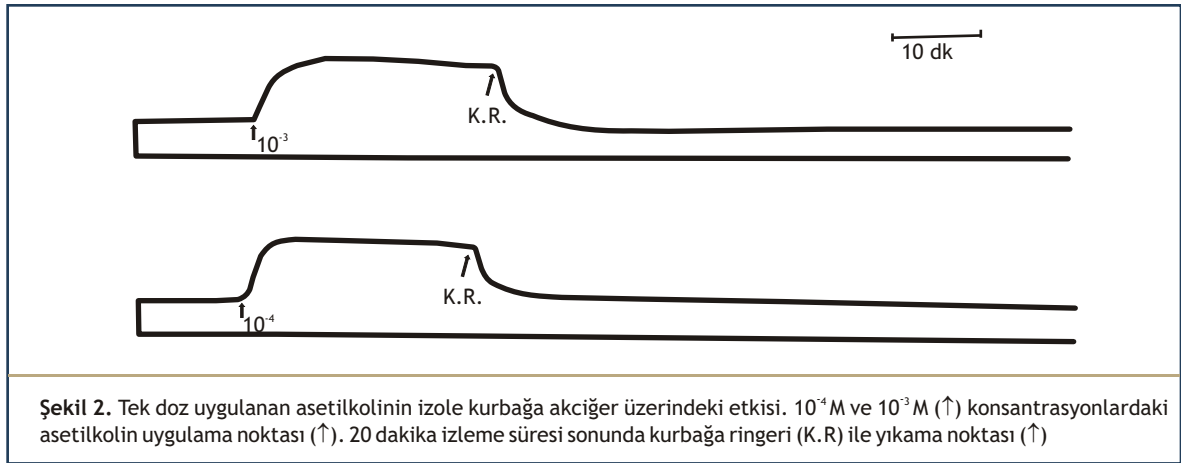
*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma



Şekil 1. Tek doz uygulanan asetilkolinin izole kurbağa akciğer üzerindeki etkisi. 10^6 M ve 10^5 M (↑) konsantrasyonlardaki asetilkolin uygulama noktası (↑). 20 dakika izleme süresi sonunda kurbağa ringeri (K.R) ile yıkama noktası (↑)

edilmiştir. 5×10^8 M ve 10^7 M fizostigminli ortamlarda elde edilen değerler 10^6 M konsantrasyondaki kasılma değerlerine yakın olsa da, Dunnett testine göre, fizostigminli ortamda 10^6 M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasından elde edilen ortalama kasılma değerlerinin tümünün kontrol grubuna ait ortalama değerden farklı olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır ($p < 0.01$). Ayrıca, doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$).

Fizostigminli ortamlarda tek doz 10^5 M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki kasılmaların zaman dilimleri açısından ortalama kasılma değerleri arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0.01$). LSD test sonucunda, sadece 1. ve 9. dakikada ölçülen ortalama kasılma değerleri farksız çıkmış ($p = 0.017$); diğer tüm ikili farklar anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Çalışmada, dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Dunnett testine göre, fizostig-



Şekil 2. Tek doz uygulanan asetilkolinin izole kurbağa akciğer üzerindeki etkisi. 10^{-4} M ve 10^{-3} M (↑) konsantrasyonlardaki asetilkolin uygulama noktası (↑). 20 dakika izleme süresi sonunda kurbağa ringeri (K.R.) ile yıkama noktası (↑)

minli ortamda 10^{-5} M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasından elde edilen ortalama kasılma değerlerinin tümünün kontrol grubuna ait ortalama değerden farklı olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır ($p < 0.01$). Ayrıca, doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$), (Tablo 6).

Zaman dilimleri açısından ortalama kasılma değerleri arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0.01$). LSD testi sonucunda, 3. ve 9. dakika ile 5. ve 7. dakikalarda ölçülen ortalama kasılma değerlerinin birbirine yakın olduğu görülürken; diğer tüm ikili zaman dilimlerindeki ortalama farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Çalışmada, dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Dunnett testine göre, fizostigminli ortamda 10^{-4} M konsantrasyonunda asetilkolin uygulamasından elde edilen ortalama kasılma değerleri 10^{-7} M fizostigminli ortam dışında kontrol grubuna ait ortalama değerden farklı bulunmuştur ($p < 0.01$). Ayrıca, doz ve sürenin birlikte etkileşimi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$) (Tablo 7).

Zaman dilimleri açısından ortalama kasılma değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Burada, uygulanan ikili karşılaştırma testi sonucunda 5. ve 7. dakikalara ait ölçümlerin benzer olduğu ($p = 0.755$), bunun dışındaki zaman dilimlerine ait ortalama değerlerin tümünün istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür

($p < 0.01$). Dozlar açısından ortalama farklar da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Dunnett testine göre, fizostigminli ortamda, 10^{-3} M konsantrasyonunda asetilkolin uygulamasından elde edilen ortalama kasılma değerleri 10^{-8} M fizostigmin uygulaması dışında kontrol grubuna ait ortalama değerden farklı olarak saptanmıştır ($p < 0.01$). Fizostigmin içeren ortamda 10^{-3} M asetilkolin, tüm deney serilerinde uygulamanın beşinci veya yedinci dakikalarında maksimuma ulaşan bir kasılmaya neden olmuştur (Tablo 8).

Ancak, 10^{-6} M asetilkolin konsantrasyonu ile elde edilen sonuçların aksine, burada fizostigmin konsantrasyonu en yüksek (5×10^{-7} M) olan ortamda asetilkoline bağlı maksimum kasılma en az olmuş ve fizostigmin kullanılan diğer konsantrasyonlarını içeren ortamlarda elde edilen bulgulardan istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir ($p < 0.05$), (Tablo 5). Bu serideki tüm deneylerde asetilkoline bağlı kasılmalarda maksimuma ulaşıldıktan sonra 20 dakikalık izleme süresince zamanla orantılı bir azalma eğilimi gözlenmiştir. Asetilkolin uygulamasının 20. dakikasında preparatın normal Kurbağa Ringer solüsyonu ile yıkanması tüm şeritlerde gevşemeye neden olmuştur (Tablo 6). Bunun sonucunda preparatın tonusunun, başlangıçta fizostigminli ortamdaki intrensek tonüsün altına indiği görülmüştür. fizostigmin içeren ortama uygulanan 10^{-4} M asetilkolin, uygulamanın beşinci dakikasında maksimuma ulaşan kasılmalara neden olmuştur (Tablo 7). 10^{-5} M asetilkolin ile gözlenen bulgulara benzer şekilde en küçük kasılma en yüksek

Tablo 6. Fizostigminli ortamlarda tek doz 10^5 M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki kasılmaların zamana göre seyri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE KASILMA ÖLÇÜMLERİ (mm)									ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	3	5	7	9	12	16	18	20	
ACh- 10^5 (n=7)	4.57 (0.11)**	4.01 (0.11)	7.61 (0.12)	7.61 (0.12)	7.71 (0.18)	6.36 (2.81)	7.29 (0.13)	2.29 (0.13)	7.03 (0.13)	6.614
Fiz- 10^8 (n=7)	10.58 (0.42)	17.02 (0.53)	18.33 (1.14)	18.03 (0.92)	15.83 (0.83)	9.83 (0.65)	10.67 (0.66)	10.37 (0.88)	10.02 (0.77)	14.014*
Fiz- 5×10^8 (n=6)	9.54 (0.51)	16.81 (0.96)	17.83 (1.03)	16.36 (1.06)	14.59 (1.10)	12.16 (0.90)	10.60 (0.60)	9.84 (0.86)	9.36 (0.68)	13.569*
Fiz- 10^7 (n=6)	8.83 (0.65)	16.06 (0.44)	16.63 (0.94)	15.54 (0.69)	14.04 (1.14)	11.16 (1.01)	9.74 (0.90)	8.07 (0.58)	6.59 (0.51)	12.411*
Fiz- 5×10^7 (n=6)	9.16 (0.65)	18.54 (1.39)	19.16 (1.27)	18.16 (0.76)	16.16 (0.74)	13.07 (1.08)	11.09 (0.79)	10.59 (0.63)	10.30 (0.66)	14.584*
ORTALAMA KASILMA (mm)	8.537	14.489	15.912	15.141	13.667	10.515	9.876	8.230	8.658	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

fizostigmin (5×10^{-7} M) içeren ortamda gözlenmiştir. Bu deneysel serilerde kullanılan tüm şeritlerde asetilkoline bağlı kasılmalar maksimuma ulaştıktan sonra azalma eğilimi göstermiştir. Yirminci dakikada kurbağa Ringer solüsyonu ile yapılan yıkama, şeritlerde gevşemeye neden olmuştur (Tablo 8). Tüm deneylerde gelişen bu gevşeme sonucu şeritlerin tonusunun, fizostigminli ortamda başlangıçta oluşan intrensek tonüsün altına indiği görülmüştür. Fizostigmin içeren ortamda 10^3 M asetilkolin, tüm deney serilerinde uygulamanın beşinci veya yedinci dakikalarında maksimuma ulaşan bir kasılmaya neden olmuştur (Tablo 8). En yüksek fizostigmin konsantrasyonu (5×10^{-7} M) içeren ortamda 10^3 M asetilkoline bağlı kasılma boyu, daha düşük konsantrasyonlarda fizostigmin içeren ortamlarda gözlenenlere göre daha az olarak bulunmuştur. Fizostigminli ortamda kümülatif asetilkolin uygulamalarının yapıldığı deney serilerinde (Şekil 3) fizostigmin içermeyen ortamda yapılan asetilkolin uygulamalarına benzer sonuçlar elde edilmesine karşın, kasılma boyları küçük bulunmuştur. 10^8 M fizostigmin içeren ortamlara kümülatif asetilkolin uygulaması, konsantrasyona

bağımlı kasılmalara neden olmuştur. $10^6, 10^5, 10^4$ ve 10^3 M asetilkolinin sebep olduğu ortalama kasılma boyları sırası ile $7 \pm 0,61$; $12 \pm 1,9$; $16,57 \pm 2,68$; $17,8 \pm 2,78$ mm olarak belirlenmiştir.

Kasılma maksimuma ulaştıktan sonra hiçbir şekilde gevşeme tarzında cevap gelişmemiştir. X_1-X_2 , X_2-X_1 ve X_3-X_2 parametreleri için hiç bir asetilkolin konsantrasyonunda negatif değer gözlenmemiştir. 5×10^{-8} M fizostigmin içeren ortamda kümülatif asetilkolin uygulaması ile elde edilen sonuçlar daha düşük konsantrasyondaki fizostigmin içeren ortamdaki sonuçlara benzerlik göstermiştir. Kasılma boylarında, konsantrasyona bağımlı bir artışın olduğu izlenmiştir.

$10^6, 10^5, 10^4$ ve 10^3 M asetilkolin konsantrasyonlarının sebep olduğu kasılmalar sırasıyla; 3.71 ± 0.89 , 6.85 ± 0.98 , 1.28 ± 1.78 ve 12.42 ± 1.96 mm olarak kaydedilmiştir. Hiçbir şeritte kasılma boyu maksimuma ulaştıktan sonra gevşeme tarzında bir yanıt görülmemiştir, " X_1-X_2 , X_2-X_1 ve X_3-X_2 " parametreleri için hiçbir konsantrasyonlarda negatif değer görülmezken, 10^7 M fizostigmin içeren ortamda kümülatif asetilkolin uygulamasının, yine konsantrasyona bağımlı olarak artan kasılmalara yol

Tablo 7. Fizostigminli ortamlarda tek doz 10^{-4} M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki kasılmaların zamana göre seyri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE KASILMA ÖLÇÜMLERİ (mm)									ORTALAMA GEVŞEME (mm)
	1	3	5	7	9	12	16	18	20	
ACh- 10^{-4} (n=7)	8.71 (0.13)**	12.81 (0.09)	14.44 (0.21)	14.83 (0.16)	15.08 (0.18)	14.51 (0.11)	14.51 (0.11)	14.21 (0.09)	14.23 (0.08)	13.706
Fiz- 10^{-8} (n=7)	13.09 (0.64)	18.29 (0.64)	18.70 (0.46)	18.70 (0.46)	18.43 (0.53)	17.86 (0.54)	17.37 (0.64)	16.44 (0.37)	16.14 (0.50)	17.224*
Fiz- 5×10^{-8} (n=6)	13.32 (0.53)	20.33 (1.59)	21.83 (0.29)	21.82 (0.31)	19.25 (1.27)	16.38 (0.88)	14.57 (1.09)	13.50 (0.53)	12.17 (0.74)	17.019*
Fiz- 10^{-7} (n=6)	11.39 (0.80)	15.77 (0.74)	16.04 (0.75)	15.67 (0.63)	14.86 (0.82)	13.39 (0.55)	12.30 (0.56)	11.76 (0.89)	10.99 (0.67)	13.573
Fiz- 5×10^{-7} (n=6)	5.22± 0.75	7.82 (2.72)	9.55 (0.52)	9.80 (0.60)	9.30 (1.11)	8.32 (1.11)	7.98 (0.60)	7.35 (0.73)	6.67 (0.58)	8.00*
ORTALAMA KASILMA (mm)	10.344	15.004	16.114	16.163	15.384	14.091	13.347	12.653	120.38	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

Tablo 8. Fizostigminli ortamlarda tek doz 10^{-3} M konsantrasyonda asetilkolin uygulamasındaki kasılmaların zamana göre seyri

UYGULAMA (M)	ZAMANA (Dk) GÖRE KASILMA ÖLÇÜMLERİ (mm)									ORTALAMA KASILMA (mm)
	1	3	5	7	9	12	16	18	20	
ACh- 10^{-3} (n=7)	9.03 (0.13)**	13.31 (0.30)	14.09 (0.18)	14.01 (0.15)	14 (0.13)	14.03 (0.01)	13.81 (0.10)	13.51 (0.09)	13.31 (0.18)	13.235
Fiz- 10^{-8} (n=7)	9.11 (0.60)	13.31 (0.86)	13.86 (0.71)	13.99 (1.21)	12.70 (0.51)	13.03 (1.14)	12.43 (0.85)	12.17 (0.91)	11.43 (0.57)	12.448
Fiz- 5×10^{-8} (n=6)	12.43 (0.89)	17.71 (1.54)	19.14 (1.29)	18.81 (0.74)	17.86 (0.75)	16.49 (0.73)	16.46 (0.78)	14.41 (0.73)	14.59 (0.63)	13.569*
Fiz- 10^{-7} (n=6)	8.30 (0.63)	11.83 (0.92)	12.31 (0.85)	12.53 (0.73)	12.23 (0.69)	10.82 (0.66)	9.82 (0.68)	9.32 (0.79)	8.82 (0.88)	16.433*
Fiz- 5×10^{-7} (n=6)	5.35 0.81	9.00 (0.61)	9.50 (1.00)	9.67 (0.73)	9.67 (0.80)	8.30 (0.61)	8.00 (0.83)	7.50 (0.76)	7.00 (0.66)	8.220*
ORTALAMA KASILMA (mm)	8.844	13.035	13.780	13.803	13.291	12.532	12.103	11.383	11.029	

*Kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı; **: Standart sapma

neylerde (8), preparat Ringer solüsyonu ile yıkandıktan sonra bir saatlik izleme süresince tonusun, başlangıçta gelişen intrensek tonüsün altına inmediği bildirilmiştir (8). Bu gözlem, en azından deney süresince, intrensek tonusta bir azalma olmadığını göstermiştir. Diğer yandan organ şeritlerinin fizostigmin içeren ortamdan normal Ringer solüsyonu içerisine alınması, tonusun başlangıçta gelişen intrensek tonusun altına inmesine neden olmuştur.

Bu farklı durum başlangıçtan itibaren ortamda bulunan fizostigminin intrensek tonusu daha belirgin hale getirdiğini düşündürmektedir. Fizostigminli ortamda, tek doz olarak uygulanan 10^{-5} M ve daha yüksek asetilkolin konsantrasyonlarına verilen kasılma tarzındaki cevaplar fizostigmin konsantrasyonlarına bağımlı olarak azalmıştır. Bu gözlem gevşetici mekanizmaların daha güçlü aktive edildiğini, dolayısı ile kontraktıl cevabın boyutlarında bir azalmaya sebep olduğunu düşündürmüştür. Fizostigminli ortamda, asetilkolinin kümülatif uygulandığı deneylerde de, tek doz tekniğinin uygulandığı deneylerdekilere benzer sonuçlar alınmıştır. Diğer taraftan karbakol uygulamalarından (8) farklı olarak X_2 - X_1 , X_3 - X_2 değerlerinde belirgin bir negatiflik saptanamamıştır. Bu durum karbakol ile asetilkolin arasındaki tek fark gibi gözükmektedir. Bu nedenle, her iki ilacın efektör hücre ve/veya gangliyon hücreleri üzerindeki etki güçlerinin farklı olabileceğini ve bu farklılığın ortaya çıkabileceği söylenebilir. Ancak farkın gerçek nedeninin ortaya konulabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Mycek M.J., Harvey R.A., Champe P.C., Otonomik Sinir Sistemine etkili İlaçlar. Lippincott's Illustrated Reviews Pharmacology. In Eds: Mycek M.J., Harvey R.A., Champe P.C. 1998; Chapter 2: 27-55.
2. Bertram G. Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, 9. Baskı, Mc Graw Hill Education, Asia, International Edition 2004.
3. O'Rourke S.T., Flavahan N.A., Vanhout P.M., Characterization of muscarinic receptors in canine bronchial smooth muscle. *Eur J Pharmacol.*, 1987; 140: 117-20.
4. Campbell G., Halles C.J., Rogers D.C., Fine structural and cytochemical study of innervation of smooth muscle in an amphibian (*Bufo marinus*) lung before and after denervation. *Cell Tissue Res.* 1978; 194(3): 419-32.
5. Clague R.U., Eglen R.M., Strachan A.C., Whiting R.L., Action. of agonists and antagonists at muscarinic receptors present on. ileum and atria *in vitro*. *Br.J. Pharmacol.* 1985; 86(1):163-70.
6. Kayaalp S.O., Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 3. cilt, 5. Baskı, Feryal Matbaası, Ankara, 1990.
7. Öğülener N., Önder S., Atçı S., Göçmen C., Şirindirik E., Dikmen A., Baysal F., İzole kurbağa akciğer şeritleri ve izoprenalin. *Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi.* 1992.
8. Adıgüzel S., Karbakolün izole kurbağa akciğer şeritleri üzerindeki etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* 2007; 64 (2) : 41-6.
9. Sheng, H., Ishii, K., Murad, F., Generation of an endothelium-derived relaxing factor-like substance in bovine tracheal smooth-muscle. *American Journal of Physiology.* 1991; 260 L 489 L493.
10. Tucker JF, Brave SR, Charalambous L, Hobbs AJ, Gibson A., L-N-nitro arginine. inhibits non-adrenergic non-cholinergic relaxations of guinea-pig isolated tracheal smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* 1990; 100: 663-4.
11. Taylor P., Anticholinesterase Agents. Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, A.F. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, and P. Taylor, Eds., New York, NY: Pergamon Pres. 1990; 100-19.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK UYGULAMA ve ARAŞTIRMA HASTANESİ ÜROLOJİ POLİKLİNİĞİNE BAŞVURAN ÜRETRİTLİ ERKEK OLGULARDA *Trichomonas vaginalis* SIKLIĞI

The Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in Male Patients with Urethritis
who Referred to Mustafa Kemal University Hospital Urology Clinic

Gülnaz ÇULHA¹, Sadık GÖRÜR², Ali HELLİ², Soner AKÇİN², Ahmet Namık KİPER²

¹Mustafa Kemal Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Parazitoloji AD,
HATAY

²Mustafa Kemal Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Üroloji AD,
HATAY

İletişim:
Gülnaz ÇULHA
Mustafa Kemal Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Parazitoloji AD,
HATAY
Tel: 0 326 214 86 61/117
e-posta: gulnazculha@yahoo.com

ÖZET

Amaç: *Trichomonas vaginalis* ürogenital sistem enfeksiyonlarına yol açan bir protozoondur. *Trikomoniazis* çoğunlukla asemptomatik olmakla birlikte, semptomatik olgularda kadınlarda vulvit, bartonelit ve servisit, erkeklerde ise üretrit, sistit, prostatit ve epididimite neden olmaktadır. Bu çalışmada, Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi üroloji polikliniğine üretrit şikâyeti ile başvuran 20- 45 yaş arası erkek olgulardaki *T. vaginalis*'in sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Tanı, santrifüj edilmiş idrarın direkt mikroskopik incelenmesi ile konulmuştur.

Bulgular: İncelenen 110 idrar örneğinin 3 (%2.8)'ünde *T. vaginalis* trofozoitleri saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışmada üretrit şikâyetleri olan hastalarda tanıya yönelik testler istenirken *T. vaginalis*'in de değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Üretrit, *T. vaginalis*

ABSTRACT

Objective: *Trichomonas vaginalis* is a protozoon, which is sexually transmitted and causes infections of the urogenital system. *Trichomoniasis* is usually asymptomatic, however, in symptomatic cases, it generally causes vulvitis, barthoneleitis and cervicitis in women and urethritis, cystitis, prostatitis and epididymitis in men. The aim of this study was to determine the rate of *T. vaginalis* infections in urine samples of 110 patients with urethritis who presented at the urology clinic of the Mustafa Kemal University Hospital.

Method: The diagnosis was made by direct microscopic examination of the centrifuged urine.

Results: Of the 110 urine samples, *T. vaginalis* was found in 2.8% of the patients.

Conclusion: Patients with urethritis should be examined for *T. vaginalis* infections.

Key Words: Urethritis, *Trichomonas vaginalis*

GİRİŞ

Trichomonas vaginalis (*T. vaginalis*) kadın ve erkeğin ürogenital sistem organlarına yerleşerek trikomonyaza neden olmaktadır. Bu protozoon, yerleştiği bölgelerde dokulara girmez, ancak hücre ve dokularda toksik etkiler oluşturur. Trikomonyazın kuluçka süresi 4-28 (ortalama 6-10) gündür (1). *T. vaginalis*'de enfeksiyon oranı toplumdan topluma değişiklikler göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde parazit in prevalansının kadınlarda %5-10 erkeklerde ise %2-10 arasında değiştiği bildirilmiştir (1,2). Ayrıca parazit in görülme yüzdesinin 20-40 yaş arası kadın ve erkeklerde daha yüksek olduğu belirtilmiştir (3, 4).

T. vaginalis enfeksiyonlarında parazit kaynağı enfeksiyonlu kadın ve erkekler olup ürogenital salgılarıyla protozoonu etrafa yayarlar. Parazit direkt ve indirekt yolla bulaşabilir (1, 5, 6). Araştırmacılar klozet kapağında 4-6 saat; şehir şebeke suyu ve kuyu suyunda 16 saat; idrar, semen sıvısı, gazlı bez, tuvalet kağıdı, sünger ve bezde en uzun 25 °C'de, 6-52 saat arası değişen sürelerde *T. vaginalis*'in yaşadığını bildirmişlerdir (7, 8). Kadınlarda en çok vaginada yerleşerek vulvit, bartonelit ve servisit, erkeklerde ise sıklıkla üretrit, sistit, prostatit ve epididimite neden olur. Enfekte erkeklerin çoğunun hiçbir yakınması yoktur. Bu nedenle erkekte *T. vaginalis* enfeksiyonunun klinik olarak tanısı zordur (1, 6). Parazit in tanısında ürogenital akıntı ve idrar örnekleri kullanılabilir. Ayrıca araştırmacılar hastaların ilaç kullanmadan muayene için geldiklerinde direkt bakının hızlı, basit ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir. Direkt bakının kültür yöntemiyle de desteklenmesinin uygun olduğu belirtilmiştir (1, 3, 4, 9).

Bu çalışmada, üretral akıntı şikâyeti ile hastaya başvurmuş ve üretrit tanısı almış erkek olguların idrar örneklerinde *T. vaginalis* varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Ocak-Aralık 2006 tarihleri arasında Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi üroloji polikliniğine üretral akıntı

şikâyeti ile başvuran ve üretrit tanısı alan seksüel olarak aktif 20-45 yaş arası 110 erkek olgu alınmıştır. Yine aynı dönem içerisinde, üroloji polikliniğine üretrit dışında herhangi bir şikâyet ile gelen aynı yaş grubu içinde seksüel olarak aktif olan 110 erkek olgu kontrol grubu olarak alınmıştır. Daha önce üretrit veya sistit nedeniyle antibiyotik tedavisi görmüş, ürogenital anomalisi olan ve çalışmaya katılmayı kabul etmeyen olgular çalışma dışı bırakılmıştır.

Çalışma grubu olgularına üretrit ve muhtemel etkenleri ile ilgili bilgiler verildikten sonra, bu şikâyetlerinin nedeninin *T. vaginalis* olabileceği anlatılmıştır. Çalışma ve kontrol grubu olgularına idrar örneklerini koymaları için steril idrar kültürü kabı verilmiş ve sabah ilk idrarını verilen kabın içerisine yapması söylenerek bu idrarları bekletmeden parazitoloji laboratuvarına iletmeleri istenmiştir. Numune laboratuvara geldikten sonra bekletilmeden ilk kısmı 400xg de santrifüj edilmiş ve sedimentten alınan örnek direkt olarak mikroskopta incelenerek *T. vaginalis* trofozoitleri aranmıştır. İnceleme sonuçları hastaya bildirilip pozitif çıkan hastaların aileleri ile birlikte tedavi olmaları sağlanmıştır.

Hasta ve kontrol gruplarının tanımlayıcı istatistikleri yapıldıktan sonra, *T. vaginalis* prevalansı ve diğer veriler ile ilgili her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı "Fischer²Ki kare" ile test edilmiştir. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışma gruplarının ortalama yaşı 31.6 ± 6.7 (20-45 yaş arası), üretritli olguların yaş ortalaması 31.5 ± 6.4 iken kontrol grubu olguların yaş ortalaması ise 31.6 ± 7.0 ($p = 0.896$) olarak bulunmuştur. Çalışma gruplarının demografik verileri ve diğer özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Üretritli olgulardan alınan idrar örnekleri incelendiğinde 3 olguda (% 2.7) *T. vaginalis* trofozoitleri saptanmıştır. Buna karşın, kontrol grubunda ise sadece bir olguda (% 0.9) *T. vaginalis* trofozoitlerine rastlanmıştır ($p = 0.048$).

Çalışma grupları arasında mesleki açıdan bir

Tablo 1. Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Üroloji Polikliniğine başvuran üretritli erkek olgu ve kontrol gruplarının demografik ve diğer verilerinin özeti ve istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Üretrit (n=110)	Kontrol (n=110)	P
Yaş	31.5 ± 6.4	31.6 ± 7.0	0.896
Trichomonas varlığı	3 (% 2.7)	1 (% 0.9)	0.048
Medeni Hali			
Evli	28 (% 25.5)	48 (% 43.6)	0.005
Bekar	82 (% 74.5)	62 (% 56.4)	
Eğitim Durumu			
İlköğretim	31 (% 28.2)	17 (% 15.5)	0.002
Lise	60 (% 54.5)	85 (% 77.3)	
Üniversite	19 (% 17.3)	8 (% 7.2)	
Meslek			
İşçi	24 (% 21.8)	30 (% 27.3)	
Memur	2 (% 1.8)	4 (% 3.6)	0.285
Serbest	53 (% 48.2)	56 (% 50.9)	
Çalışmıyor	31 (% 28.2)	20 (% 18.2)	
Çok eşlilik			
Çok eşli	71 (% 64.5)	8 (% 7.3)	<0.001
Çok eşli değil	39 (% 35.5)	102 (% 92.7)	

fark tespit edilemezken iki grubun medeni hali, eğitim durumu ve çok eşlilik hali istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı (Tablo 1) bulunmuştur.

Kontrol grubunda *T. vaginalis* saptanan olgunun üroloji polikliniğine ana başvuru şikayetinin sistizim olduğu belirlenmiştir. *T. vaginalis* tedavisi sonrası üretritli üç olgunun ve kontrol gurundaki bir olgunun semptomları ek bir tedaviye gerek kalmadan tamamen düzelmiştir.

TARTIŞMA

Trikomonoz, cinsel yolla bulaşan enfeksiyon olup genellikle erkekler de asemptomatik seyrettiğinden parazitin yayılmasında erkekler önemli rol oynamaktadırlar (10). Son yıllarda cinsel ilişki ile bulaşan hastalıklar arasında *T. vaginalis*'in görülme sıklığının toplumların sosyo-ekonomik durumları köyden şehre ve başka ülkelere artan göçler, değişen yaşam koşulları, iç ve dış turizmin artması, seksüel aktivitenin erken yaşta başlaması gibi faktörler etkili olmaktadır. Trikomonyaz en sık olarak 20-40 yaş arasında görülmektedir. Çok eşliliğin ya da cinsel yaşa-

mın sınırsız olduğu toplumlarda daha çok yaygındır (11).

Çalışmada üretrit şikayeti ile gelen hastalardan alınan 110 idrar örneği incelenmiş ve üç hastada (%2.8) oranında *T. vaginalis* saptanmıştır. Parazitin görülme yüzdesi ile ilgili yapılan çalışmalarda Serlin ve ark. (9) pelvik ağrısı olan 155 hastadan *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Trichomonas vaginalis* tanısı için idrar, vaginal sıvı ve pelvik muayeneden sonra klinisyen tarafından alınan endoservikal materyal örneklerini toplamışlardır. Yapılan değerlendirme sonucu üç hastalığın ön taraması için ilk tercih edilmesi gereken incelemelerin sırasıyla idrar örneklerinin mikroskopik incelemesi, vaginal sıvının incelenmesi ve pelvik inceleme olduğu kanısına varmışlardır. Benzer olarak Tanzanya'da Watson ve ark. (12) yaptıkları çalışmada yaşları 15-54 arasında değişen 1004 üretrit şikayeti olan erkekten topladıkları idrar örneğinden direkt mikroskopik inceleme ve kültür yöntemi ile 109 (%11) erkekte *T. vaginalis* saptamışlardır. Jane ve ark'nın (13) yaptığı diğer bir çalışmada ise, üretrit yakınması olan 300 er-

kek hastanın idrar örneklerinin direkt mikroskopik inceleme ve kültür değerlendirmeleri sonucu 15 hastada (%5) *T. vaginalis* saptanmıştır. Aynı örnekler PCR yöntemi ile çalışılmış ve 300 örneğin 52'sinde (%17) *T. vaginalis* bulunmuştur. Araştırmacılar parazitin erkeklerde asemptomatik olduğunu, üretrit şikayeti olan erkek hastalarda *T. vaginalis*'in araştırılması gerektiğini vurgulamışlardır. Yine Jackson ve ark. (14) Kenya'da yapılan bir çalışmada yurtdışına seyahat eden semptomatiklerde %15 ve asemptomatik erkeklerde ise %5, Acholonu (15) Nijerya'da erkek ve kadınların idrarlarında %1.3, Gall ve ark. (16) üretrit şikayeti olan erkeklerde %0.7 Hobbs ve ark. (17) üretritlerde %20.8 oranında *T. vaginalis*'e rastladıklarını bildirmişlerdir. Farklı bir çalışmada Shin-Ichi ve ark. (18) üretrit şikâyeti olan ve olmayanlarda gram boyama ile parazite rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda da Üstün ve İlter (19) gastroenteroloji polikliniğine gastrointestinal yakınması ile başvuran 1492 hastanın idrar örneklerini incelemiş ve %3'ünde *T. vaginalis* saptadıklarını bildirmişlerdir. Yine Tanyüksel ve ark. (20) 85 erkek hastanın üretra akıntısıyla yaptıkları çalışmada direkt mikroskopik inceleme ile %5.8, Tripticase-Yeast Extrac-Maltose kültürü ile %1.4 ve lateks aglütinasyon deneyi ile %15.2 oranlarında pozitiflik bulmuşlardır. Nongonokoksik üretritlerde de Ay ve ark. (21) %0.8 ve Özbilgin ve ark. (22) %12 oranında parazite rastlanılmıştır. Çalışmada da %2.8 oranında pozitiflik bulunmuş olup araştırmalar arasındaki farklılığın seçilen örneklemden, bölgeden, araştırmacılar ve seçilen yöntemden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Araştırmada elde edilen bulgulara göre diğer çalışmalarla benzer olarak üretrit şikâyeti ile başvuran hastalarda etken aranırken *T. vaginalis*'inde değerlendirilmesinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Ertabaklar H, Ertuğ S, Kafkas S Odabaşı A, Karataş E. vajinal akıntılı olgularda *Trichomonas vaginalis* araştırılması. Türkiye Parazit Derg, 2004; 28 (4): 181-184.
2. Young F. Dealing with trichomoniasis. *J Fam Health Care*, 16 (5):133-5, 2006.
3. Mahdi NK, Gany ZH, Sharief M. Risk factors for vaginal trichomoniasis among women in Basra, Iraq. *East Mediterr Health J*. 2001 ;7(6):918-24.
4. Yaşarol Ş, Unat EK, Budak S, Sermet İ, Kuman A, Daldal N. Trikomonyaz. Türkiye Parazitoloji Dern Yay. 1987: No:7.
5. Budak S. 1987. Trikomonyazın epidemiyolojisi. Trikomonyaz, (ed. Yaşarol Ş). Türkiye Parazit Derg, 1987; (7): 19-20.
6. Alary M, Lowndes MC, Mukenge-Tshibaka L et al. Sexually transmitted infections in male clients of female sex workers in Benin: Risk factors and reassessment of the leucocyte esterase dipstick for screening of urethral infections. *Sex Transm Inf*, 2003; 79: 388-92.
7. Karaman Ü, Atambay M, Aycan ÖM, Daldal N. *Trichomonas vaginalis*'in çeşitli ortamlarda ve farklı ısılarda yaşam süresi. Türkiye Parazit Derg, 2004; 28(1): 18-20.
8. Girginkardeşler N, Limoncu E, Ok ÜZ, Özbilgin A. *Trichomonas vaginalis*'in semen sıvısı ve idrarda yaşama süresi. Türkiye Parazit Derg, 1996;20(3-4): 345-348.
9. Serlin M, Shafer MA, Tebb K, Gyamfi AA, Moncada J, Schachter J, Wibbelsman C. What sexually transmitted disease screening method does the adolescent prefer? Adolescent attitudes toward first-void urine, self-collected vaginal swab, and pelvic examination. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2000;156(6): 588-91.
10. Cates WRJ, Goldman M. Atypical pelvic inflammatory disease: Can we identify clinical predictors? *Am J Obstet Gynecol*, 1993;169: 341-46.
11. Karaman Ü, Atambay M, Yazar S, Daldal N. Kadınlarda *Trichomonas vaginalis*'in çeşitli sosyal değişkenler açısından yaygınlığının incelenmesi (Malatya ili Örneği). Türkiye Parazit Derg, 2006; 30 (1):11-15.
12. Watson D, Kokungo M, Mayaud F, et al. High prevalence of trichomoniasis in rural men in Mwanza, Tanzania: results from a population based study. *Sex Transm Inf*, 2000; 76: 355-62.
13. Jane R, Schwebke S, Lisa F. Improvement detection by DNA amplification of *Trichomonas vaginalis* in males. *J*

- Clinic Microbiol, 2002; 40(10); 3681-83.
14. Jackson DJ, Rakwar JP, Chaoan B, *et al.* Urethral infection in a workplace population of East African men: Evaluation of strategies for screening and management. J Infect Dis, 1997; 175: 833-38,
 15. Acholonu AD. Trichomoniasis in Imo State, Nigeria: a first report. Afr J Sex Trans Dis, 1984; 1(1): 27-28.
 16. Gall H, Beckert H, Meier-Evert H, Tummers U, Pust RA, Peter RU. Pathogen spectrum of urethritis in the man. Hautarzt, 1999; 50(3):186-193.
 17. Hoobs MM, Kazembe P, Reed AW, *et al.* *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawia men . Sex Transm Dis, 1999; 26(7): 388-9.
 18. Shin-ichi M, Kubota Y, Senda Y, Tamaki M, Yasuda M, Deguchi T. 2006. Failure to detect urethral *Trichomonas vaginalis* in Japanese men with or without urethritis Int Journal of Urol, 2006; (13): 1418-20.
 19. Üstün Ş, İltter T. Gastroenteroloji kliniği idrar laboratuvarına başvuran hastalarda *T. vaginalis* sıklığının araştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 2004;28(2): 83-85.
 20. Tanyüksel M, Başustaoğlu AC, Batsallar M, Haznedaroğlu T, Özyurt M, Gün H. Erkeklerde üretral örneklerde *Trichomonas vaginalis*'in mikroskopi, kültür (TYM) ve lateks aglütinasyon yöntemiyle çalışılması. Türkiye Parazitol Derg, 1995; 19(3):340-344.
 21. Ay S, Yalçın O, İlhan F, Tahmaz L, Yılmaz M. Nongonokoksik üretrit (NGU) olgularında *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* ve *Trichomonas vaginalis*. İnfek Derg, 1999;13(1): 55-57.
 22. Özbilgin A, Nazlı O, Tuzcuoğlu Y, Özcel MA, Mülazımoğlu N. Erkeklerde nongonokoksik üretrit'te trichomoniasis. Türkiye Parazitol Derg 1992;16(1): 43-48.

LİKENLER VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ UYGULAMALARI

Lichens and Molecular Biological Applications

Demet CANSARAN DUMAN¹

¹Refik Saydam Hıfzıssıhha
Merkezi Başkanlığı,
İlaç ve Kozmetikler Araştırma
Müdürlüğü,
ANKARA

İletişim:

Demet Cansaran DUMAN

Refik Saydam Hıfzıssıhha

Merkezi Başkanlığı

İlaç Kozmetik ve Araştırma

Müdürlüğü

Sıhhiye/ANKARA

Tel: 0 312 458 2129

Faks: 0 312 458 24 08

e-mail: dcansaran@yahoo.com

ÖZET

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), liken filogenisi ve populasyon genetiğinin moleküler incelemelerinin yapılabilmesi için oldukça basit ve güçlü bir tekniktir. Likenler alg ve mantardan oluşan simbiyotik bir birlikteliktir bu nedenle moleküler çalışmalarda özel dikkat edilmesi gerekir. Bu derlemede, likenlerden DNA ekstraksiyonu, RAPD metodu ve rRNA'nın ITS bölgesi çalışmaları üzerine yoğunlaşmıştır. Önümüzdeki yıllarda, moleküler biyolojik teknikler daha güvenli tanımlamalar için kullanılabilir ve yeni moleküler teknikler liken filogenisini daha iyi anlayabilmemize katkıda bulunacaktır.

Anahtar Sözcükler: Liken, PCR, Moleküler Sistematik.

ABSTRACT

The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a fairly simple but powerful technique for molecular investigations of lichen phylogeny and population genetics. Lichens are a symbiotic association of a fungus and alga, thus they require special considerations for molecular studies. The present review focuses on nucleic acid extraction from lichens studies on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method and the internal transcribed spacer regions of rRNA. In the coming years, molecular biological techniques will be used for more accurate identification of lichen and the newly available molecular methods will significantly contribute to our understanding of lichen phylogeny.

Key Words: Lichens, PCR, Molecular systematic.

GİRİŞ

Likenler; alg ve mantarların bir araya gelerek meydana getirdikleri morfolojik ve fizyolojik birliklerdir. Diğer bir deyişle likenler; alg ile mantarların kurdukları simbiyoz (ortak yaşayış) bir yaşam şeklidir. Fungus bileşeni (mikobiyont), yeşil algler veya mavi yeşil algler (fotobiyont) ile simbiyotik işbirliği kurmayı başaran bir Ascomycetes veya Basidiomycetes üyesidir. Bu ayrı bileşenler bir araya geldiklerinde liken oluşturmeyen fungus ve algler ile hiçbir benzerlik göstermeyen uzun ömürlü bir tallus meydana getirirler. Yapıya katılan fungus ve algler sadece tallustan kesit alındığında ve mikroskop altında incelendiğinde tanımlanabilirler (1). Bu birliktelikteki; mantar hücreleri, liken tallusunun ihtiyacı olan su, CO₂ ve mineral maddeleri temin eder. Alg hücreleri ise klorofili vasıtasıyla sentezlediği organik maddeleri ve çıkardığı oksijeni verirler. Çeşitli kaynaklara göre dünyadaki liken türü sayısı yaklaşık olarak 25.000 civarındadır (2).

Likenler ekolojik açıdan son derece önemli bir gruptur. Salgıladıkları liken asitleri ile kalkertli ve granitik kayaları kademeli olarak parçalarlar. Daha sonra oluşan bu ufak taşlar üzerinde yapraklı karayosunları gelişir. Bunun sonunda oluşan ince toprak tabakası ve humus üzerinde yüksek bitkiler gelişir. Bu nedenle likenler, bitki örtüsünün süksesyonal gelişim sürecinde öncül birlikteliklerdir. Ekonomik açıdan ise tıpta, besin ve parfümeri sanayisinde eski çağlardan bu yana kullanıla gelmişlerdir. Son yıllarda likenlerin oluşturdukları özel bileşiklerin antimikrobal (3), antiproliferatif, antinosiseptif, antiinflamatuvar, analjezik, antiprotozoal etkileri bulunmuş olup çok farklı bilim dallarına yönelik çalışmalara konu olmaya başlamışlardır. Ayrıca hava kirliliğinin belirlenmesi ve izlenmesinde likenlerin kullanımı güncel araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır.

LİKENLERİN SINIFLANDIRILMASINDA MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNTEMLERİN ÖNEMİ

Geleneksel taksonomi, çoğunlukla organizmaların morfolojik ve anatomik özelliklerine dayanır. Ancak,

günümüzde moleküler biyoloji tekniklerinin çok hızlı gelişmesi, taksonomi dahil olmak üzere tüm biyolojik disiplinleri etkilemiştir. Geleneksel teşhis anahtarları, organizmaların morfolojik, anatomik ve nadiren kimyasal özelliklerine göre çalışırlar. Ancak, bazen incelenen organizmaların özelliklerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle sınıflandırılması oldukça zordur. Organizmaların kesin teşhis edilebilmesi için değişik türler arasında morfolojik ve anatomik özelliklerin farklılıkları yeterli olmaz. Bir diğer durumda da farklı habitatlarda yaşayan organizmalarda oldukça fazla değişiklikler meydana gelir, böylece aynı türlere ait organizmalar farklı morfolojik ve anatomik özellikler gösterirler. Doğal habitatlar içinde genomun yapısı üzerine çevre şartlarının etkisi olmaktadır. Bu nedenle, genotip; fenotipten daha stabildir ve genetik özellikler, taksonomide; morfolojik veya anatomik özellikleri kesinleştirmeye yardımcı olur (4).

Likenlerdeki sistematik çalışmalar; diğer organizmalarda olduğu gibi klasik olarak daha çok morfolojik karakterlere dayalı tanımlamaya dayanmaktadır. Likenlerin talluslarında içerdikleri liken asitlerinin belli kimyasal maddelerle reaksiyona girerek verdiği renk reaksiyonları tanımlanmalarına yardımcı faktördür. Fakat bu tanımlama çalışmaları da likenlerin sistematik kategorilerini tam olarak belirlemeye yetmemektedir (4).

Liken sistematığıne kesinlik kazandıran moleküler biyolojik tekniklere dayalı olan PCR tekniğinin gelişiminden önce çok azdı. Moleküler çalışmaların başlamasından önce, Blum ve Keshevarov, *Lasallia* ve *Umbilicaria* genuslarının türlerinde akrabalık derecesini belirlemek için DNA hibridizasyonu yöntemi kullanmıştır (5,6). Çeşitli mantar kültürlerinden DNA'nın izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi 1987'de Ahmadjian ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. PCR uygulamalarının başlaması ile nükleik asitler yeni karakterlerin belirlenmesinde kullanılmıştır (7). Bugün populasyon genetiği ve mantar filogenisinin moleküler biyolojik incelemesi çalışmalarında PCR önemli bir yöntemdir.

Bu çalışmalar sonucunda elde edilecek bilgiler doğrultusunda, moleküler filogeniye dayalı olarak çalışılacak cinslerin taksonomik problemlerinin çözümlenmesi, liken oluşturan mantarların sınıflandırılmasındaki yerlerini moleküler boyutta ortaya koyması açısından oldukça büyük önem taşımaktadır.

LİKENLERDEN DNA İZOLASYONU

Likenlerden DNA izolasyonuna başlamadan önce; liken materyalini mikroskop altında ayrıntılı bir şekilde incelemek gerekir. Likenler, diğer liken türleri veya bitki grupları ile birlikte parazit veya ortak gelişebilirler (8). Bunlar; mantar, karayosunu, likenin üzerinde gelişen bir diğer liken olabilir. Bu nedenle incelenecek liken türü diğer organizmaların kontaminasyonundan dikkatlice ayrılmalıdır (9).

Standart DNA izolasyon protokolleri likenler ve mantarlar için de geniş ölçüde kullanılmakla birlikte, likenlerden ve mantarlardan DNA'nın izolasyonu ve çoğaltılabilmesi için birçok yöntem geliştirilmiştir (10-19). Geliştirilmiş bu yöntemlerle, izolasyon protokolu bir günde gerçekleştirilebilir ve elde edilen DNA eğer -20°C'de saklanabilirse en az üç sene moleküler uygulamalar için kullanılabilir (20). Lee ve Taylor (1990) tarafından yapılan bir çalışmada bazı yöntemlerin bazı likenler için çok uygun olmayabileceği ileri sürmüşlerdir (12). Bir diğer yöntemde ise polisakkaritlerin ayrılması için enzimatik muamele yöntemi kullanılmıştır (21).

Likenlerden DNA izole ederken dikkat edilmesi gereken bir konu ise, likenlerin çok fazla miktarda polisakkarit içermeleri nedeniyle yüksek konsantrasyonlarda enzimatik aktivitenin etkilenmesidir. Likenleri oluşturan mantar genellikle protein katalizini engelleyip fenolik bileşikler üretir; bu da polimeraz ve restriksiyon enzimlerin aktivitesini engeller. Likenlerden DNA ekstraksiyonu yapılırken, birçok türde bulunan yüksek konsantrasyonlu polisakkaritler dikkatlice ayrılmalıdır. Bu amaçla, likenlerden DNA izole ederken CTAB (etil-trimetil amonyum bromür) (14, 17), SiO₂ (15), rezin gibi maddeler veya kromotografik kolonlar kullanılarak ilave saflaştırma yapılması ge-

rekmetedir (20).

Başarılı bir DNA izolasyonu yapabilmek için genellikle taze liken materyali kullanılmalıdır. Ancak, her zaman taze materyale ulaşılamayacağından herbaryum koleksiyonlarının kullanımına yönelik çalışmalar da yapılmıştır (18). Son yıllarda, herbaryumda bulunan mantarlardan ve likenlerden bozulmamış DNA izole edildiği belirlenmiştir (11,21,22). Ancak herbaryum materyallerinde farklı likenler ve mantarlar arasında DNA'nın elde edilmesinde saflık oranı değişiktir. Liken örneğinin yaşı 10'dan fazla ise bazı liken türlerinden (örneğin *Usnea*) yeterli miktarda DNA elde etmenin zor olduğu belirtilmiştir (23). Buna karşın 30 yıllık herbaryum örneği olan *Multiclavula mucida*'dan izole edilen DNA'da çok miktarda PCR ürünü elde etmek mümkün olmuştur (23). Aras ve Cansaran (2006) herbaryumda bulunan farklı liken örneklerinden dizi analizi yöntemi uygulanabilmesi için DNA izolasyonu protokolü gerçekleştirmişlerdir. Her biri en az 8 yıllık olan liken örneklerinden optimum koşullarda DNA izolasyonu sağlamışlardır. Böylelikle likenlerden DNA izolasyonunu sağlayan bu protokol ile herbaryum örneklerinden daha hızlı ve güvenilir DNA ürünü elde etmişlerdir (24).

Gargas ve arkadaşlarının 1994'de buzul kaplı alanlarda gelişen likenlerin DNA'sını izole etmek için çalışmışlardır. Buzullar eridikten sonra ortaya çıkan *Umbilicaria cylindrica* liken türünden DNA izole etmişlerdir. Bu türün, Radiokarbon döneminde 1300 yıl buz altında kaldığı ileri sürülmektedir. Başarılı bir şekilde DNA'nın PCR ile çoğaltılabilmesi, materyalin iyi bir şekilde korunması ile mümkündür. Bu nedenle özenle korunmuş liken ve mantar örnekleri uzun zaman periyodu içerisinde genetik farklılıklarını incelemek için kullanılabilir (25).

LİKENLERDE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNA (PCR) DAYANAN UYGULAMALAR

Likenlerde sınıflandırma, liken oluşturan mantarın tanımlanması ile olur. Bu nedenle, likenler ile yapılan moleküler çalışmaların çoğu, birliktelikteki

mantarın (mycobiont) çekirdek ribozomal genleri ile yapılmıştır. Likenin yapısında ortak olan fotosentetik organizmaların (alg ve siyanobakteri) genetik materyalinin çoğaltılması iki şekilde engellenebilir. İlki, likenin tallusundan mantar materyali çeşitli yöntemlerle izole edilebilir, ikincisi ise oligonükleotid primerler ile mantarın DNA'sı seçilip çoğaltılabilir. Ancak birliktelikteki ortaklardan alg veya siyanobakteriler DNA izolasyonunda veya PCR tekniğinin uygulanmasında genellikle problem yaratmazlar. Mantarın ribozomal DNA (rDNA)'sı ile çalışıldığı zaman ise PCR'da bazı anormallikler meydana gelebilir. Yapılan bazı çalışmalarda primer çifti, taze materyal kullanılsa bile hedef bölgeyi her zaman çoğaltmayabilir. Diğer taraftan, liken örneğine diğer mantar türleri tarafından kontaminasyon olmadığı durumlarda bile birçok PCR ürünü meydana gelebilir. Bunun nedeni seçilen primer bölgelerinde insersiyon (ekleme)'ların olması olarak açıklanabilir. Çünkü bu insersiyonlar mantarların rDNA'sında oldukça çok bulunur ve bu durum daha da dikkatli çalışmayı gerektirir (21).

A- Likenlerde Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) Uygulamaları

Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniği ile taksonomik olarak birbirine çok yakın türlerin farklılık dereceleri belirlenmekte ve tür içi varyasyonlar tanımlanabilmektedir. Özellikle farklı habitat ve populasyonlarda varyasyon gösteren örneklerin moleküler filogenisi belirlenerek taksonomik değerleri kesin olarak ortaya konulabilmektedir. Kısa primerler, genetik işaretleyici olarak kabul edilen fragmanların rasgele çoğaltılması için kullanılmaktadır. Bu teknik tüm genomun üzerindeki farklılıkları değerlendirmek için kullanılabilir.

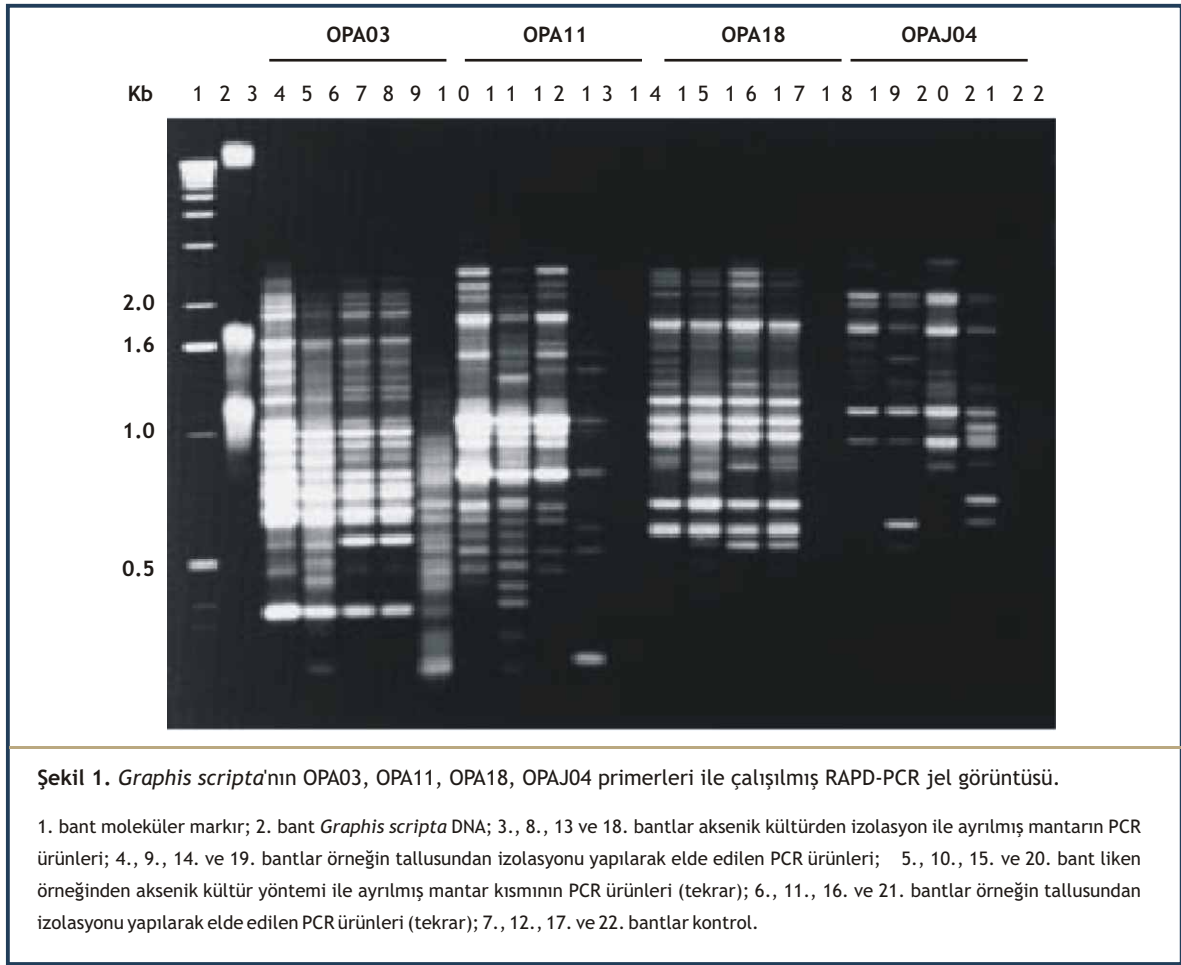
Likenlerin yapısında bulunan mantarlara RAPD-PCR tekniği uygulanırken karşılaşılan en büyük sorun, RAPD primerlerinin mantara özgü olmamasıdır. DNA izolasyonun tüm liken tallusuyla veya alg içeren apotesyumla yapılmış çalışmaları çok güvenilir sonuçlar vermemiştir; çünkü bu yöntemle her iki simbiyontun DNA'sı da çoğaltılmış olmaktadır. Son yıllarda RAPD

tekniği uygulaması ile yapılan çalışmalarda, apotesyumun (askusdan spor taşıyarak) veya tallusun alg içermeyen kısımlarını (örneğin; biatorine apotesyum, liken örneğinin merkezi ipliği, kabuksu likenlerin medulla kısmı) veya aksenik kültüre alınan liken örneğinin mantar kısmının DNA'sını izole ederek bu soruna çözüm getirilmiştir (20). Yapılan birçok çalışmada, podesyum (26), basid (27), askus (15) ve rizinlerden (17) başarılı DNA izolasyonları ve bunun sonucunda RAPD-PCR tekniği uygulanabildiği belirlenmiştir.

Değişik bölgelerdeki liken populasyonları arasındaki farklılıkların belirlenmesi ile karışık bant desenlerinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (28). Murtagh vd. 1999'da *Graphis scripta*'nın RAPD tekniği ile filogenetik analizini yapmışlardır. DNA izolasyonu hem tallusun tümünden hemde tallustan aksenik kültürle izole edilen mantar kısmı ile izolasyonunu yapıp değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, aksenik kültür ile mantar kısmı izole edilerek çalışılan liken materyalinden DNA izolasyonundan ve PCR uygulamalarından daha sağlıklı sonuçlar alındığını göstermişlerdir (29) (Şekil 1). Honegger ve Zippler (2007)'de Parmeliaceae, Ramalinaceae ve Physciaceae familyalarına ait türlerde tek spor izolasyonu yöntemi ile genomik DNA'yı RAPD-PCR yöntemi kullanarak analiz etmişlerdir (30).

B- Likenlerde Transkripsiyonu Yapılan İç Ara Bölgeler (ITS) ile İlgili Uygulamalar

Çekirdek rRNA'daki tekrar birimleri [örneğin; Transkripsiyonu Yapılan İç Ara Bölgeler (ITS)] hızlı evrimleşir ve cins veya populasyonlar içinde türler arasındaki farklılıkları gösterir (31). Likenlerde PCR yöntemiyle ITS bölgesinin dizi analizi yöntemi ile çalışılabilmesi için, likenin mantar kısmının DNA'sı çoğaltılırken en önemli ve uygun metot PCR primerleri olarak spesifik-mantar oligonükleotidlerinin kullanılmasıdır. Mantara özgü spesifik primerlerin olması bu yöntemi kullanırken, likenin mantar, alg ve siyanobakteri içeren tallusunun tümünden DNA izole etmeyi mümkün hale getirmiştir. Likenler için



yaklaşık 9 adet spesifik mantar primeri bulunmaktadır ve bunlar ribozomal DNA (rDNA)'nın küçük alt ünitesinde (SSU) dizi analizi yöntemi için uygun primerler olarak belirlenmiştir (32-34). Optimize edilmiş PCR şartlarında kullanılması gereken primer çiftleri içinden spesifik mantar primerlerinden yalnızca biri yeterlidir (Örneğin ITS1, ITS1F, ITS4 primerleri gibi). Bu primerler likenin mantar kısmında rDNA'ya ait ara bölgeleri (ITS) kopyalayarak çoğaltmasını sağlar (27, 34). PCR uygulaması için farklı primer çiftleri ile hedef bölgenin çoğaltılması tavsiye edilir. PCR ürünlerin çoğaltılması ve dizi analizi yöntemi uygulamaları için kolaylık ve çabukluk sağlar. Likenin yapısında bulunan mantarın PCR ürünlerinden dizi analizi yöntemi en çok uygulanan tekniktir ve günümüzde otomatik dizi analizi sistemi kısa zamanda

genomdaki dizi hakkında bilgi edinmeye izin vermektedir.

Dyen ve Murtagh (2001) Doğu Antartika'da Vestfold Tepelerinde bulunan *Buellia frigida* ve *Xantharia elegans* liken türü ile yaptıkları çalışmadaki genetik varyasyonları oldukça düşük olduğunu kaydetmelerine karşın, değişik bölgelerden toplanan *X. elegans*'ın tür içinde dahi oldukça yüksek genetik varyasyon gösterdiği ITS bölgelerinin incelenmesi ile ortaya çıkarılmıştır (35).

Murtagh ve arkadaşları (2002) değişik coğrafik lokalitelerden ve iklim şartlarından toplanan *X. elegans* örnekleri ile yaptıkları çalışmada ITS bölgelerinin incelenmesi yanı sıra RAPD tekniği de uygulamışlardır. Her iki teknik de oldukça yüksek genetik varyasyonun varlığını ortaya koymuştur (36).

Krzeminska ve arkadaşları *Cetraria* cinsinde moleküler tayin anahtarları oluşturmak üzere Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizi gerçekleştirmişlerdir. Bu analizde yine ITS bölgeleri PCR'la çoğaltılmış ve restriksiyon kesim enzimleri (RE) ile kesilmiştir. Sonuçta elde edilen polimorfizmi ifade eden değişik bant desenleri ile moleküler tanımlama anahtarları oluşturulmuştur (37).

Literatürde, rDNA, ITS bölgeleri incelenerek genetik farklılık ve benzerlikleri tanımlanan daha birçok liken türü bulunmaktadır. Högberg ve arkadaşları (2002) *Letharia vulpina* türünün kıtalararası popülasyonlarının genetik farklılaşmasını çalışmışlardır (38). Grube ve Arup (2001), *Physciaceae* familyasına ait değişik cinsleri yine ITS verilerine göre değerlendirilmiştir (39). Rios ve arkadaşları (2002) *Rimularia insularis*'e ait ITS verilerini çalışmalarında kullanmışlardır (40). Martin ve arkadaşları (2003) ise *Diploschistes* genusunun moleküler filogenisini (41), Cansaran ve ark.'ları 2006'da *Rhizoplaca* genusunun (42), Aras ve ark.'ları ise 2007'de *Aspicilia* genusunun ITS bölgesinin dizi analizini yaparak incelemişlerdir (43).

Ayrıca son yıllarda rRNA'daki ITS bölgesinin çoğaltılması ile yapılan çalışmalara ilave olarak, genomda daha detaylı incelemeler yapılmaya başlanmıştır. Hofstetter ve ark. 2007'de Lecanoromycetes sınıfına ait türlerde protein kodlayan RPB1 ve RPB2 geni ve ribozomal RNA'yı kodlayan çekirdek küçük alt ünitesi (nucSSU), çekirdek büyük alt ünitesi (nucLSU) ve mitokondri küçük alt ünitesinin tümünü kapsayan incelemelerde bulunmuştur. Bu çalışma maksimum olasılıklı bootstrap istatistiksel analizi ile yorumlanmıştır. Yapılan filogenetik analizler sonucunda Lecanoromycetes'in alt grupları olan Acarosporomycetidae, Ostropomycetidae ve Lecanoromycetidae'e ait türlerin ayrımın net bir şekilde yapılmıştır (44). Yine, Gueidan ve ark.'ları 2007'de Verrucariaceae familyasına ait 83 liken türünde çoklu lokus filogenisini inceleyerek (çekirdek büyük alt ünitesi, çekirdek küçük alt ünitesi ve RPB1) sistematik dizilimini tekrar yapılandırmışlar. Böylelikle morfolojiye dayalı olan sınıflandırmayı moleküler filogeni a-

nalizleri ile sağlamlaştırmışlardır (45).

SONUÇ

PCR tekniği, liken yapısındaki mantarın çekirdek rDNA'sındaki genetik farklılığın araştırılması için mükemmel bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Dizi analizi yöntemi ile yapılacak yeni çalışmalarla birlikte liken filogenisini daha iyi anlayabilmemize çok fazla katkıda bulunacaktır. Örneğin, *Ascomycetes* sınıfının farklı ordolarının birçok türüne moleküler biyoloji teknikleri uygulanarak, liken birliğindeki üyelerin evrimsel yorumu üzerine görüşlerimizin artması sağlanacaktır.

Yapılacak yeni çalışmalarla liken popülasyonları, familya, genus ve türleri arasında ve kendi içindeki evrim süreci hakkında bilgimizi artıracaktır. Böylece likenin yapısındaki mantarın farklı gruplar içindeki filogenetik ayrımı ile kimyasal ve morfolojik karakterler ile genetik bilgi arasında bağlantı kurmak mümkün olacaktır.

ITS bölgeleri, rDNA'daki büyük alt ünite (LSU) ve protein kodlayan genler filogenetik çalışmalar için kullanılacak karakterlerin önemli kaynakları olarak moleküler sistematik bilgilerine eklenecektir. Moleküler teknikler kullanılarak yapılacak çalışmalar önümüzdeki yıllarda liken sistematğinde daha net ayrımlar yapılabilmesini olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Hale ME. The Biology of Lichens. London: Cambridge, 1974; 1-200.
2. Ahmadjian V. The Lichen Symbiosis. New York: Wiley, 1993; 1-264.
3. Duman-Cansaran D. Farklı Liken Örneklerindeki Usnik Asit Miktarlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi İle Belirlenmesi ve Antimikrobiyal Aktiviteleri. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 2007; 64(3): 17-21.
4. Guzow B, Garniak MK, Wegrzyn G. Molecular determination keys: construction of keys for species identification based on restriction fragment length polymorphism. Int Arch Biosci, 2001; 1057-67.

5. Blum OB, Kashevarov GP. The DNA homologies as a proof of the legitimacy of the establishment of the lichen genus *Lasallia* Merat (*Umbilicariaceae*). Doklady Akademii nauk Ukrainskoi SSR, Ser. B, 1986; 61-4.
6. Blum OB, Kashevarov GP. The DNA homologies as a proof of the legitimacy of the establishment of the lichen genera *Lasallia* merat, *Cladina* (Nyl.) harm. and *Pseudevernia* Zopf. IAL2 Abstracts, 1992; 1.
7. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. Methods in Enzymology, 1987; 155: 355-350.
8. Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, England: Wallingford, 1995:350-5.
9. Petrini O, Hale U, Dreyfuss MM. An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. Mycologia, 1990; 82: 444-51.
10. Lee SB, Milgroom MG, Taylor JW. A rapid, high-yield miniprep method for isolation of total genomic DNA from fungi. Fungal Genet Biol, 1988; 35: 23-4.
11. Bruns TD, Fogel R, Taylor JW. Amplification and sequencing of DNA from fungal herbarium specimens. Mycologia, 1990; 82(2): 175-84.
12. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications In: Lee SB, Taylor JW, eds. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. San Diego: Academic Press, 1990: 282-87.
13. Armeleo D, Clerc P. Lichen chimeras: DNA analyses suggest that one fungus forms two morphotypes. Exp Mycol, 1991; 15: 1-10.
14. Armeleo D, Clerc P. A rapid and inexpensive method for the purification of DNA from lichens and their Symbionts. Lichenologist, 1995; 27: 207-13.
15. Grube M, DePriest PT, Gargas A, Hafellner J. DNA isolation from lichen ascomata. Mycological Research, 1995; 99: 1321-24.
16. Landvik S, Shailer NFJ, Eriksson O. SSU rDNA sequence support for a close relationship between the Elaphomycetales and the Eurotiales and Onygenales. Mycoscience, 1996; 37: 83-92.
17. Crespo A, Bridge PD, Hawksworth DL. Amplification of fungal rDNA-ITS regions from non-fertile specimens of the lichen-forming genus *Parmelia*. Lichen, 1997; 29: 275-82.
18. Cubero FO, Crespo A, Fatehi J, Bridge PD. DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. Pl. Syst. Evol., 1999; 216: 243-49.
19. Grube M. Nucleic acid isolation from ecological samples-fungal associations, lichens. Method Enzymol, 2005; 395: 48-57.
20. Bridge PD, Arora DK, Reddy CA, Elander RP. Applications of PCR in Mycology. In: Crespo A, Cubero OF, Grube M, eds. PCR Applications in Studies of Lichen-Forming Fungi. Cab International, 1998: 231-69.
21. Kranner I, Beckett RP, Varma AK. Protocols in Lichenology. New York: Springer, 2002: 1-580.
22. Herrman B, Hummel S. Ancient DNA. In: Taylor JW, Swann EC, eds. DNA from herbarium specimens. Berlin. Springer-Verlag, 1994.
23. Gargas A, DePriest PT, Grube M, Tehler A. Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. Science, 1995; 268:1492-95.
24. Aras S, Cansaran D. Isolation of DNA for sequence analysis from herbarium material of some lichen specimens. Turk J Bot, 2006; 30: 449-53.
25. Gargas A, DePriest PT, Ivanova N. Glacier-covered lichens: sources of ancient DNA. IMC5 Abstracts, 1994: 69.
26. DePriest PT, Been MD. Numerous group I introns with variable distribution in the ribosomal DNA of a lichen fungus. Journal of Molecular Biology, 1992; 228: 315-21.
27. Lutzoni F, Vilgalys R. *Omphalina* (Basidiomycota, Agaricales) as a model system for the study of coevolution in lichens. Cryptogamic Botany, 1995; 5: 71-81.
28. Cubero FO, Crespo A, Ochando MD. Aplicacion de latecnica de RAPD a estudios en liquenes. Resumenes de IXI Simposium Nacional de Botanicacriptogamica, Santiago de Compostela, 1995: 231.
29. Murtagh GJ, Dyer PS, McClure PC, Crittenden PD. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers as a tool to study variation in lichen-forming fungi. Lichenologist, 1999; 31: 257-67.
30. Honegger R, Zippler U. Mating systems in representatives of Parmeliaceae, Ramalinaceae and Physciaceae (Lecanoromycetes, lichen forming ascomycetes). Mycological Research, 2007; 424-32.
31. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications In: White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, eds. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. San Diego: Academic Press, 1990: 315-22.
32. Gargas A, Taylor JW. Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi. Mycologia, 1992; 84: 589-92.

33. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes. Application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology*, 1993; 2: 113-8.
34. Gargas A, DePriest PT. A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. *Mycologia*, 1996; 88: 745-8.
35. Dyen PS, Murtagh GJ. Variation in ribosomal ITS sequence of lichens *Buellia frigida* and *Xanthoria elegans* from vestfold Hills, eastern Antarctica. *Lichenologist*, 2001; 33(2): 151-9.
36. Murtagh GJ, Dyer PS, Furneaux PA, Crittenden PD. Molecular and physiological diversity in bipolar lichen-forming fungus *Xanthoria elegans*. *Mycol. Res.*, 2002; 106(11): 1277-86.
37. Krzeminska BG, Gorniak M, Wegrzyn G. Molecular determination keys: construction of keys for species identification based on restriction fragment length Polymorphism. *Int Arch Biosci*, 2001; 1057-67.
38. Högberg N, Kroken S, Thor G, Taylor JW. Reproductive mode and genetic variation suggest a North American origin of European *Letharia vulpina*. *Molecular Ecology*, 2002; 11: 1191-96.
39. Grube M, Arup U. Molekuler and morphological evolution in the Physciaceae (*Lecanorales*, lichenized Ascomycota), with special emphasis on the genus *Rinodina*. *Lichenologist*, 2001; 33(1): 63-72.
40. Rios A, Ascaso C, Grube M. An ultrastructural Anatomical and molecular study of the lichenicolous lichen *Rimularia insularis*. *Mycol. Res.*, 2002; 106 (8): 946-53.
41. Martin MP, LaGreca S, Lumbsch T. Molecular phylogeny of *Diploschistes* inferred from ITS sequence data. *Lichenologist*, 2003; 35(1): 27-32.
42. Cansaran D, Aras S, Kandemir I, Halıcı M.G. Phylogenetic relations of *Rhizoplaca* Zopf from Anatolia inferred from ITS sequence data. *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 2006; 5/6: 405-12.
43. Aras S, Cansaran D, Özdemir-Türk A, Kandemir I, Candan M. Resolving genetic relationships in manna group of lichens from genus *Aspicilia*. *African Journal of Biotechnology*, 2007; 6: 1154-1160.
44. Hofstetter V, Miadlikowska J, Kauff F, Lutzoni F. Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: A case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 2007; 44: 412-426.
45. Gueidan C, Roux C, Lutzoni F. Using a multigene phylogenetic analysis to assess generic delineation and character evolution in Verrucariaceae (Verrucariales, Ascomycota). *Mycological Research*, 2007; 110: 1147-1170.

DENİZ ÜRÜNLERİNE BAĞLI ZEHİRLENMELER VE ETKİLERİ

Seafood Poisonings and their Effects

Göknur TERZİ¹

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Besin Hijyeni ve Teknolojisi
Anabilim Dalı,
SAMSUN

İletişim:

Göknur TERZİ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Besin Hijyeni ve Teknolojisi
Anabilim Dalı,
55139, Kurupelit/SAMSUN
Tel : 0 362 312 19 19/28 12
Faks: 0 312 457 69 22
e-posta: goknurt@omu.edu.tr

ÖZET

Deniz ürünlerine bağlı meydana gelen zehirlenmeler toksin içeren kabuklu su ürünleri ya da balıkların tüketimi sonucu gelişir. Kabuklu su ürünleri zehirlenmelerine; deniz tarağı, midye ve istiridye gibi deniz kabuklularının beslendiği planktonik algler (sıklıkla dinoflagellatlar) tarafından salınan bir grup toksin neden olur. Zararlı alglerin neden olduğu kabuklu su ürünü zehirlenmelerinin en önemli klinik belirtileri; paralizi, diyare, nörotoksisite ve amnezidir. Toksin içeren balıkların tüketimine bağlı şekillenen zehirlenmeler çoğunlukla toksinlerin isimleri ile anılan Ciguatera zehirlenmesi, Skombroid zehirlenmesi, Puffer balık zehirlenmesi, *Pfiesteria piscicida* zehirlenmesi şeklinde adlandırılır. Toksin direkt olarak deniz kabukluları ve balıklara zarar vermezken bu ürünleri yiyen insan veya bazı etçil hayvanlarda zehirlenmelere sebep olur. Bu derlemede insan sağlığı açısından önemli olan bazı toksinlerin özellikleri, neden oldukları zehirlenme çeşitleri, insanlarda meydana getirdikleri patolojik bozukluklar ve korunma yöntemleri ele alınmıştır.

Anahtar Sözcükler: Kabuklu su ürünleri zehirlenmesi, deniz toksinleri, planktonik su yosunları

ABSTRACT

Seafood poisoning arises as a result of consuming fish or shellfish containing toxins. Shellfish poisoning is caused by a group of toxins elaborated by planktonic algae (mainly dinoflagellates) which are consumed by shellfish like scallops, mussels and oysters. The most significant clinical symptoms of shellfish poisonings are paralysis, diarrhea, neurotoxicity and amnesia. The poisonings are usually named after the toxins causing them, e.g., Ciguatera, Scombroid, Puffer fish and *Pfiesteria piscicida*. Although the toxins do apparently not harm the shellfish and fishes, humans or animals eating toxic seafood may become poisoned. In this review, the characteristics of selected toxins and poisonings relevant to public health, the pathological complications they cause in humans and their prevention are discussed.

Key Words: Shellfish poisoning, marine toxins, planktonic algae.

GİRİŞ

Deniz ürünleri tüketimine bağlı zehirlenmeler; virüslerden (Hepatitis A, Norwalk virus, Poliovirus), bakterilerden (*Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio hollisae*), parazitlerden (*Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens*, *Eustrongylides excisus*, *Diphyllobothrium latum*) ve toksinlerden kaynaklanmaktadır (1). Dinoflagellata adı verilen tek hücreli, mikroskopik alglerin ürettiği başlıca toksinler; saksitoksin, yessotoksin, brevetoksin, domoik asit ve pektenotoksinlerdir. Bu toksinler suyun rengini kırmızı ve kahverengiye çevirirler. Bu olaya “red tide-kırmızı akıntı” adı verilir. Bu sulara yaşayan ve filtrasyonla beslenen midye, deniz tarağı ve istiridye gibi canlılar alglerdeki toksini bünyelerine alırlar, bu deniz ürünlerinin insanlar tarafından tüketilmesi sonucu da zehirlenme tablosu gelişir (2). Dinoflagellat ve diatomların ürettiği toksinlerdeki farklılığa bağlı olarak meydana gelen zehirlenmeler; paralitik kabuklu su ürünü zehirlenmesi, diyaretik kabuklu su ürünü zehirlenmesi, nörotoksik kabuklu su ürünü zehirlenmesi, amnezik kabuklu su ürünü zehirlenmesi ve *Pfiesteria piscicida* zehirlenmesi olarak adlandırılmaktadır (2-4). Balıklar tarafından üretilen toksinler ise cigua-

toksin, maitotoksin, skaritoksin ve tetradotoksinlerdir (Tablo 1,2).

Deniz ürünlerinin içerdiği toksinlerin çoğunluğu ısıya karşı dirençli olduğundan pişirme ve diğer işlemlerle inaktive olmazlar. Ayrıca bu toksinler görünüm ve lezzet olarak da tespit edilemediklerinden önemli halk sağlığı risklerine neden olmaktadır (5). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl gıda kaynaklı hastalıklardan tahminen 76 milyon kişinin hastalandığı ve bunların 5.000'inin ise öldüğü bildirilmektedir. ABD Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) tarafından 1998-2002 yılları arasında 221 adet kimyasal kaynaklı gıda zehirlenmesi meydana geldiği, bu zehirlenmeler içinde en çok 84 vaka ile Ciguatera balık zehirlenmesinin yer aldığı bildirilmiştir. Yine aynı merkez tarafından 2005 yılında yapılan araştırmada ise 40 adet kimyasal kaynaklı gıda zehirlenmesi meydana geldiği bunun 11'inde Ciguatera, 24'ünde ise skombrotoksin izole edildiği bildirilmiştir (6).

1. KABUKLU SU ÜRÜNLERİNİN NEDEN OLDUĞU ZEHİRLENMELER

A. Paralitik Kabuklu Su Ürünü Zehirlenmesi

Paralitik kabuklu su ürünü zehirlenmesi

Tablo 1. Kabuklu su ürünlerinin neden olduğu zehirlenmeler (1).

İntoksikasyon	Toksijenik mikroorganizma	Toksin	Sorumlu deniz ürünü
PSP	<i>Alexandrium catenalla</i>	Saksitoksin	Midye
	<i>Alexandrium tamarensis</i>	Neosaksitoksin	Midye
	<i>Alexandrium minutum</i>	Gonyatoksin (1-6)	D. Tarağı
	<i>Pyrodinium bahamense</i>	Diğer saksitoksin deriveleri (12-16)	İstiridye
DSP	<i>Gymnodinium catenatum</i>		
	<i>Dinophysis fortii</i>	Okadaik asit	Midye
	<i>Dinophysis acuminata</i>	Dinofisis toksin (1-3)	D. Tarağı
	<i>Dinophysis acuta</i>	Pektenotoksin (1-6)	Midye
	<i>Dinophysis mitra</i>	Yessotoksin	
NSP	<i>Prorocentrum lima</i>		
	<i>Karenia brevis</i>	Brevetoksin	İstiridye
ASP			Midye
	<i>Nitzschia pungens</i>	Domoik asit	D. Tarağı
	<i>Nitzschia australis</i>		Midye

PSP: Paralitik kabuklu su ürünü zehirlenmesi

DSP: Diyaretik kabuklu su ürünü zehirlenmesi

NSP: Nörotoksik kabuklu su ürünü zehirlenmesi

ASP: Amnezik kabuklu su ürünü zehirlenmesi

Tablo 2. Balıkların neden olduğu zehirlenmeler (1).

İntoksikasyon	Toksijenik mikroorganizma	Toksin	Sorumlu deniz ürünü
Ciguatera	<i>Gambierdiscus toxicus</i> <i>Ostreopsis lenticularis</i>	Ciguatoksin Maitotoksin Skaritoksin	Kaya balığı
Skombroid	<i>Morganella morgani</i> ve diğer hisitidin bakteriler	Histamin ve diğer biyojen aminler	Skombroid balık türleri Mahi mahi Lüfer
Puffer balık zehirlenmesi	Vibrionacea <i>Pseudomonas spp</i> <i>Photobacterium phosphoreum</i>	Tetradotoksin	Pufferfish Globefish Toadfish
<i>Pfiesteria piscicida</i> zehirlenmesi	<i>P. piscicida</i> <i>P. shumwayae</i>		

(Paralytic Shellfish Poisoning-PSP), toksik dinoflagellatlarla beslenen deniz kabuklularının tüketilmesi sonucu insanlarda gastrointestinal ve nörolojik semptomlara neden olan ciddi bir hastalıktır. PSP'nin ana nedeni *Alexandrium catenella*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium tamarense*, *Pyrodinium bahamense* ve *Gymnodinium catenatum* adı verilen dinoflagellatların toksinleridir (7).

PSP toksinini bünyesinde içeren alglerin çift kabuklu yumuşakçalar (midye, deniz tarağı ve istiridye) tarafından alınması sonucu toksin bu yumuşakçaların sindirim organları ve yumuşak dokularında depo edilir. Toksinle kontamine deniz kabuklularının insanlar tarafından tüketilmesi sonucu insana bulaşan toksin zehirlenmelere neden olur (8).

Toksinin özellikleri: PSP'den sorumlu dinoflagellatlar sıcağa ve aside dayanıklı en az 12 toksin üretirler. PSP toksinleri suda çözünebilir en güçlü toksinler olarak bilinirler. *Alexandrium catenella* isimli dinoflagellatın ürettiği toksininin 1mg'ı bir yetişkini öldürmeye yeterlidir (9). PSP toksinleri 20 farklı moleküler form içerirler ve karbamat toksinleri, sulfokarbamil toksinleri ve dekarbamil toksinleri olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar. En toksik grup; karbamat toksinleridir (saksitoksin, neosaksitoksin ve gonyatoksin). Bunu dekarbamil toksin grubu

izler, daha sonra da N-sulfokarbamil toksinleri (C-toksin) gelir (Tablo 3). PSP toksinlerinden saksitoksin ilk karakterize edilen ve en iyi anlaşılan toksin olup normal pişirme, dondurma ve buhar gibi işlemlerden etkilenmez (7, 10). Saksitoksinin maksimum kabul edilebilir düzeyi 80 µg toksin/100g 'dır (11).

Semptomlar: Paralitik kabuklu su ürünü zehirlenmesinde, kontamine kabuklu su ürünlerinin tüketiminden 5-30 dakika sonra ağızda yanma, karıncalanma, yüz ve boyuna ilerleyen uyuşukluk, ciddi olgularda; kol, bacak, parmaklarda uyuşukluk, koordinasyon bozukluğu ve solunum güçlüğü gelişir. Yüksek miktarda toksin alındığı zaman yutkunma güçlüğü, boğazda daralma hissi, konuşmada tutukluk, göğüs ve karın kaslarında paralizisi görülür. Ciddi olgularda 2-12 saat içinde solunum felci sonucu ölüm olur. 12 saati atlatan kişiler birkaç gün içinde düzülürler. PSP' deki diğer semptomlar ise baş ağrısı, baş dönmesi, bulantı, kusma, idrara çıkamama, geçici görüş kaybı ve bilinç kaybı şeklindedir (12). PSP ile ilgili en dramatik örnek Alaska'da görülmüştür. 1990 yılında Alaska Peninsula kumsalından topladığı midyeleri tüketen bir kişinin bir saat içinde ağız, yüz ve parmaklarda uyuşukluk görülmüş, iki saat sonra da kardiyopulmoner arrest sonucu öldüğü bildirilmiştir.

Tablo 3. PSP toksinleri

Karbamat toksinleri	Sulfokarbamil toksinleri	Dekarbamil toksinleri
Saksitoksin, Neosaksitoksin Gonyatoksin 1,2,3,4	Gonyatoksin 5, 6	Adlandırılmamış

Yapılan incelemelerde hastanın mide içeriğinde 370 µg/100g, midye örneklerinde ise 2650µg/100g düzeyinde PSP toksininin saptandığı belirtilmiştir (11).

Mortalite: Toksinin oral yolla 1-4 mg alınması bir insanı öldürmeye yeterlidir (13). PSP bağlı gelişen zehirlenmelerin %15-19' unun ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (11).

Patogenez: Saksitoksinler sodyum iyonlarının sinir hücre membranından geçişine geçici olarak engel olurlar. Bu blokmanın mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Sodyum geçişinin engellenmesi sonucu solunum gücünü ve yüz felci meydana gelir. Oluşan bu semptomlar toksin vücuttan atıldıktan sonra birkaç saat içinde kaybolur (14).

B. Diyaretik Kabuklu Su Ürünü Zehirlenmesi

Diyaretik kabuklu su ürünü zehirlenmesi (Diarrhetic Shellfish Poisoning- DSP), *Dinophysis acuminata*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. mitra*, *D. rotundata*, *Prorocentrum lima*, *P. elegans*, *P. hoffmannianum* ve *P. concavum* adı verilen dinoflagellatların ürettiği toksinler (okadaik asit, dinofisis toksin, yessotoksin ve pektenotoksin) tarafından meydana getirilir (15). Buna bağlı ilk zehirlenme olgusu 1960 yılında Hollanda'da bildirilmiştir. Bunu takiben 1976 ve 1982 yılları arasında Japonya'da toksinle kontamine kabuklu su ürünlerinin tüketilmesi sonucu 1300 kişinin hastalandığı bildirilmiş ve yapılan incelemeler sonucu zehirlenmeye *Dinophysis fortii* ve *D. acuminata* adı verilen dinoflagellatların neden olduğu belirlenmiştir (16).

Toksinin özellikleri: Diyaretik kabuklu su ürünü zehirlenmesine neden olan toksinler okadaik asit, dinofisis toksini, pektenotoksin ve yessotoksindir. Bu toksinler yağda çözünebilir polimer bileşiklerdir. Bu grup içinde kimyasal olarak karakterize edilen ilk toksin *Prorocentrum sp.*' den elde edilen okadaik asittir (17).

Semptomlar: Kabuklu su ürününün alınmasından

yaklaşık 30 dakika ile 12 saat (ortalama 4 saat) sonra semptomlar şekillenmekte ve yaklaşık 3 gün içinde hiçbir belirti kalmadan kaybolmaktadır. Hastalarda tipik olarak ishal (% 92), bulantı (% 80), kusma (% 79), karın ağrısı (% 53) ve soğuk algınlığı belirtileri (% 53) görülmektedir (12). Kronik olarak etkene maruz kalınması sonucu nadir olarak hastalarda mide tümörü olduğu bildirilmiştir (18).

Mortalite: Diyaretik kabuklu su ürünü zehirlenmesi ile ilgili olarak ölüm olayı bildirilmemiştir (19).

Patogenez: Okadaik asit ve dinofisis toksinleri tümör aktivitesini uyarıcı etkiye sahiptirler. Dinofisis toksininin bağırsak mukozasına zarar verici etkisinin de olduğu bildirilmiştir. Akut karaciğer hasarına neden olan Pektenotoksin ve yessotoksin ise hepatotoksik toksinler olarak kabul edilmektedir (20).

C. Nörotoksik Kabuklu Su Ürünü Zehirlenmesi

Nörotoksik (sinir sistemini etkileyen) kabuklu su ürünü zehirlenmesine (Neurotoxic Shellfish Poisoning-NSP) eski adlandırmada *Gymnodinium breve*, yeni adlandırmayla *Karenim brevis* adı verilen bir dinoflagellat neden olmaktadır. *K. brevis* fotosentetik bir canlıdır ve biyolojik ışıltama (biyoluminesans) özelliği ile de kendi ışığını üretir (21, 22). *K. brevis* ilk olarak Meksika körfezi ile Florida kıyılarında izole edilmiştir. Bu organizma dış etkenlere oldukça duyarlı olduklarından dalgalar, rüzgar ve diğer mekanik etkilerden kolaylıkla etkilenirler. *K. brevis* ile kontamine deniz kabuklularının tüketilmesi sonucu insanlarda nörolojik, gastrointestinal ve solunum gücünü gibi semptomlar gelişir (23).

Toksinin özellikleri: *K. brevis* tarafından üretilen brevetoksin (PbTx-1'den PbTx-10'a kadar) non-protein yapıda, yağda eriyebilen, ısıya, aside dayanıklı polimer bir nörotoksindir (24).

Semptomlar: Nörotoksik kabuklu su ürünü

semptomlar iki şekilde ortaya çıkar. Bunlardan ilkinde; akut gastorenterit ve nörolojik semptomlar, diğerinde ise solunum sistemi semptomları görülür (25, 26). Brevetoksine içeren kabuklu su ürününün sindirilmesinden 15 dakika ile 18 saat içinde (ortalama 3 saat) karın ağrısı, bulantı, kusma ve ishal gelişir. Toksinden ilk etkilenen organ ağızdır. Ağızda uyuşukluk ve karıncalanma hissi meydana gelir. Bunu takiben farens, dudak ve vücutta pareteziler ortaya çıkar, daha sonra ise hareket güçlüğü, felç ve son olarak da koma gelişir.

Brevetoksine solunum yolu ile maruz kalınması sonucu ise solunum sistemini etkileyen semptomlar gelişir. *K. brevis* adı verilen dinoflagellatlar oldukça hassas canlılardır. Bu dinoflagellatların dış kabukları dalga hareketleri ile kolaylıkla kırılır ve içerdikleri toksin su yüzeyine salınır. Brevetoksin havada su zerrecikleri içinde asılı halde kalır. Denizde yüzen insanların bu toksini solunum yoluyla alması sonucu üst solunum yollarında ve boğazda yanma, göz ve burunda iritasyon, bronşlarda daralma ve solunum güçlüğü görülür (24).

Mortalite: Nörotoksik kabuklu su ürünü zehirlenmesi ile ilgili olarak ölüm olayı bildirilmemiştir (19).

Patogenez: Sinir hücre membranının iç yüzü negatif, dış yüzü pozitif yük taşır. Membranın iç ve dış yüzü arasındaki farklılık elektriksel gerilim farkına neden olur. Bu farklılığın nedeni Na ve K iyonlarının hücre içi ve hücre dışında farklı konsantrasyonda bulunmasıdır. Sinir hücresine bir uyarı geldiği zaman membranın geçirgenliği artar ve Na iyonları hücre dışına, K iyonları hücre içine doğru hareket eder ve denge bozulur. Bu dengesizliği gidermek için hücre membranında bir aktif transport mekanizması bulunur. Buna Na-K pompası denir. Na-K pompası enerji gerektiren bir olaydır ve bunun için gerekli olan enerji ATP nin hidrolizinden elde edilir. ATP'nin hidrolizi ise membranda yer alan ve Mg^{2+} un varlığında aktive olan Na-K ATP'az enzimi ile gerçekleşir. Normalde sinir iletimi sağlandıktan sonra Na kanalları kapanır ve dinlenme potansiyeline gelir (27). Fakat vücuda toksin girdiği zaman toksin Na pompasını etkileyerek hücrenin sürekli depolarize kalmasına neden olur. Brevetoksin yüksek oranda sodyum kanallarına bağlanır. Normalde kapalı olan sodyum kanalları açılır, iskelet

kaslarına nöromuskular iletim geçişi engellenir. Bunun sonucu olarak da insanlarda nörotoksik etkiler meydana gelir (28).

D. Amnezik Kabuklu Su Ürünü Zehirlenmesi

İnsanlarda hafıza kaybına yol açan amnezik kabuklu su ürünü zehirlenmesine (Amnesic Shellfish Poisoning - ASP) tek hücreli su yosunu olan diatomlar (*Pseudo-nitzshia*) tarafından üretilen "domoik asit" neden olmaktadır. İlk domoik asit zehirlenmesi 1987 yılında Kanada'da görülmüş, bu olguda toksinle kontamine midyelerin tüketilmesi sonucu 150'nin üzerinde kişinin etkilendiği ve 4 kişinin de öldüğü bildirilmiştir (29). Daha sonra 1991 yılında Kaliforniya'nın Monterey körfezinde 100'ün üzerinde ölü kuş bulunmuş ve yapılan çalışmalarda yüksek düzeyde domoik asit tespit edildiği bildirilmiştir (30).

Toksinin özellikleri: Amnezik kabuklu su ürünü zehirlenmesinden sorumlu asıl toksin domoik asittir (DA). Domoik asit *Pseudo-nitzshia* türüne ait çok sayıda mikroalg tarafından üretilen bir kainoid aminoasittir (31). Domoik asit etkisini glutamat reseptörlerine bağlanarak gösterir (32) ve deniz canlılarından izole edilen 10 izomeri vardır (isodomoik asit A dan H'a kadar ve domoik asit 5' diastereomer) (24). Domoik asit ve izomerleri suda çözünürler, ısıya, pişirme ve dondurma işlemlerine dayanıklı, aside ise duyarlıdır (31). Domoik asidin Avrupa Birliği direktifi 97/61/EEC'ye göre insanlar tarafından kabul edilir düzeyi 20 µg DA/g dır (33).

Semptomlar: Domoik asitle kontamine deniz ürünlerinin tüketilmesinden 24 saat sonra kişide bulantı, kusma, baş ağrısı, ishal ve karın krampları şeklinde gastrointestinal semptomlar gelişir. Bunu takip eden 48 saat içinde ise hafıza kaybı, yönünü şaşırma gibi sinirsel semptomlar şekillenir. Ciddi olgularda ise felç, koma ve ölüm görülür (34).

Mortalite: Domoik asit (DA) zehirlenmesinde mortalite oranı %3'dür. Maymunlar üzerinde yapılan çalışmalarda oral yolla 20-29 µg domoik asidin alınması sonucu 2 ile 6 saat içinde gastrointestinal semptomların meydana geldiği belirtilmiştir. Domoik asidin farelerdeki LD₅₀ düzeyi ise 3,6 mg DA/kg olarak bildirilmiştir (35).

Patogenez: İnsanlar tarafından 200 µg/g domoik asit içeren midyenin tüketilmesi sonucu hafıza kay-

bı meydana geldiği ve yapılan otopsi sonucunda ise beynin hipokampus bölgesinde nekroz geliştiği bildirilmiştir. Sıçanlara deneysel olarak (2 mg/kg) domoik asit verilmesi sonucu ise limbik sistemde felç, hafıza kaybı, yürüyüş bozuklukları ve hipokampusda dejenerasyon oluştuğu bildirilmiştir (31).

2. BALIKLARIN NEDEN OLDUĞU ZEHİRLENMELER

A. Ciguatera Balık Zehirlenmesi

Ciguatera balık zehirlenmesi tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşayan mercan kaya balıklarının tüketilmesi sonucu görülen gastrointestinal ve nörolojik semptomlarla karakterize bir zehirlenmedir (36). Zehirlenmeden sorumlu olan ciguatoksin ve maitotoksin *Gambierdiscus toxicus* adı verilen dinoflagellatlar tarafından üretilmektedir. *G. toxicus* ilk olarak herbivor balıklar tarafından alınmakta daha sonra besin zinciri ile karnivor balıklara geçmektedir. İnsanlar ya herbivor balıkları ya da bu herbivorları yiyen karnivor balıkları tüketerek toksini alırlar. Dünyada her yıl 20.000'in üzerinde insan bu zehirlenmeden etkilenmektedir (37). Ciguatera zehirlenmesine balıklar arasında en sık İspanyol uskumrusu (*Scomberomorus commerson*) neden olmakla beraber en tehlikeli tür barakudadır (*Sphyræna barracuda*). Bunların yanı sıra kırmızı levrek (*Lutjanus campechanus*), çotira (*Balistes capriscus*), lipsoz (*Lachnolaimus maximus*), iskorpit (*Scorpaena plumieri*), murana (*Gymnothorax javanicus*), hani balığı (*Epinephelus marginatus*), akya balığı (*Seriola dumerili*), papağan balığı (*Scarus sp.*) ve doktor balığı (*Acanthurus dussumieri*) gibi türler de ciguatera zehirlenmesine neden olmaktadır (38).

Toksinin özellikleri: Ciguatera toksinleri arasında ciguatoksin, maitotoksin ve skaritoksin yer almaktadır. Ciguatoksin, *Gambierdiscus toxicus*'dan izole edilen yağda eriyen, renksiz, kokusuz ve tatsız bir toksindir. Pişirme, dondurma ve aside karşı dirençlidir (39). Toksin sıklıkla baş, iç organlar ve yumurtada birikir. Toksin balıkta herhangi bir değişikliğe neden olmadığından toksinli balık fark edilmeden tüketilir. Ciguatoksin balığın organlarının çıkarılması sırasında direk olarak deriden emilerek elde karıncalanmaya neden olmaktadır (40). Ciguatoksin en güçlü nörotoksin olarak bilinmektedir. Faredeki letal doz değeri

(LD₅₀) 0.35 µg/kg dır (32). Ciguatoksinin 0.1µg/kg düzeyinde alınması ise insanda önemli sağlık sorunları gelişmesi için yeterlidir (41).

Semptomlar: Ciguatera zehirlenmesinde semptomlar toksin içeren balığın tüketilmesinden 15 dakika sonra ağızda uyuşukluk ve yanma hissi şeklinde başlar ve daha sonra kol ve bacaklara yayılır. 4 ile 6 saat içinde ciddileşir. Semptomlar gastrointestinal, nörolojik ve kardiyovasküler sistemler olmak üzere üç ana sistemi etkiler.

Gastrointestinal semptomlar, karın ağrısı, bulantı, kusma, ishal, sindirim gücünün ve karın kramp- ları şeklinde seyrederek ve yaklaşık 1-2 gün sürer. Nörolojik semptomlar, toksin içeren balığın alımından birkaç saat ile 3 gün arasında değişen sürede başlar ve birkaç hafta sürer. Dil ve ağız çevresinde uyuşma, karıncalanma, dişte ağrı, eklem, kas, kol ve bacaklarda ağrı, güçsüzlük, ataksi, baş dönmesi, gözde bulanıklık, soğuk ve sıcak ters basması, titreme, idrar yaparken ağrı, solunum paralizi ve koma şeklinde seyrederek.

Kardiyovasküler semptomlar ise hastada aritmi, bradikardi, taşikardi, hipotansiyon ve kalp bloğu gelişmesi şeklinde görülür. Oluşan bu semptomlar genellikle 2-5 gün içinde düzelir (41).

Mortalite: Ciguatera zehirlenmesinde mortalite genellikle % 0,1'den azdır. Olguların çoğu hafiftir. Semptomlar birkaç gün ya da bir hafta içinde ortadan kalkar. Ciddi olgularda iyileşme yavaştır, aylar ve yıllar sürer. Ölüm, genellikle kalp-damar sisteminin baskılanması ve solunum kaslarının felci ve hipovolemik şok sonucu görülür. Ciddi olgularda nörolojik semptomlar haftalarca ve aylarca kalıcı olur. İyileşme görülmesinden birkaç ay ya da yıl sonra semptomlar yeniden tekrarlar (39, 42).

Patogenez: Ciguatoksin organizmada kalp ve kas hücre sinirlerinde sodyum kanallarını etkiler. Hücreler arasında sodyum iyonu artışına, Schwann hücreleri ve aksonlara doğru ozmatik yolla sıvı geçişine neden olur (43).

B. Skombroid Zehirlenmesi

Skombroid zehirlenmesi, yüksek düzeyde histamin ve diğer vazoaaktif aminleri içeren gıdaların tüketilmesi sonucu görülen bir gıda zehirlenmesidir. Çoğunlukla Scombroidea familyasına ait tuna (*Thun-*

nus albacares), uskumru (*Scomber scombrus*), orkinos (*Katsuwonus pelamis*) ve palamut (*Sarda sarda*) gibi balıklar ile az olarak da Scombroidea familyasına ait olmayan lüfer (*Pomatomus saltatrix*), ringa balığı (*Clupea harengus*), hamsi (*Engraulis encrasicolus*), sardalya (*Sardinella longiceps*), ve mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) gibi balıklarda ve yunuslarda bakterilerin üremesi sonucunda histamin ve diğer vazoaaktif maddelerin üremesine bağlı olarak gelişir. Bu nedenle skombroid zehirlenmesine “histamin zehirlenmesi” de denmektedir. Amerika Birleşik Devletleri’nde son on yıl içinde skombroid balık zehirlenmesi olgularının arttığı bildirilmiştir. 1973-1986 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol Merkezi (CDC) tarafından Columbia, Havai, California, New York, Washington ve Connecticut’ta mahi-mahi, tuna ve lüfer balıklarının tüketilmesi sonucu 1096 kişinin etkilendiği ve 178 skombroid balık zehirlenmesi olgusunun tespit edildiği bildirilmiştir (44).

Toksinin özellikleri: Skombrotoksinin kimyasal yapısı bilinmemektedir. Bu toksin ısıya, dondurma, pişirme, dumanlama, kürlleme ve konserve etme gibi işlemlere dirençlidir. Tatsız ve kokusuz olduğundan do layı da duyu ile tespit edilmesi mümkün değildir (45).

Semptomlar: Skombroid balık zehirlenmesinde semptomlar diğer birçok gıda zehirlenmesinden daha kısa sürede ortaya çıkar. İlk semptomlar histamin içeren balığın tüketilmesinden sonra birkaç dakika ile 2 saatlik süre içinde gelişir ve histamin reaksiyonuna benzer olaylar meydana gelir. Yüzde kızarıklık, şişme, ağızda karıncalanma, yanma, acı biber tadı, baş dönmesi, baş ağrısı ve bulantı şikayetleri görülür. Semptomların ilerlemesi sonucu yüzde isilik, ödem, kısa süreli ishal ve karın ağrısı meydana gelir. Ciddi olgularda görüşte bulanıklık, dilde şişme, astım benzeri semptomlar, solunum güçlüğü ve taşikardi gelişir. Hastalık ılımlı ve yumuşaktır. Semptomlar genellikle 4-6 saat içinde düzelir. İyileşme nadiren 1-2 günü aşar. İmmun sistemi baskılanmış kişilerde oral antihistaminikler faydalı olur (46, 47). Skombroid balık zehirlenmesi ile ilişkili olarak 1987 yılında Albuquerque’de grillenmiş mahi-mahi balığı, salata ve pasta yiyen 2 kişinin zehirlendiği bildirilmiştir. Bu kişilerde yemeği yedikten 45 dakika sonra semptomların ortaya çıktığı, 36 saat içinde ise kendiliğinden düzeldiği bildirilmiştir. Bu durum üzerine ABD Tarım Bakanlığı

Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafında mahi-mahi balıklarında yapılan analizlerde histamin düzeyinin 20mg/100g olduğu bildirilmiştir (45).

Patogenez: Scombroidea familyasına ait balıklar uygun koşullarda muhafaza edilmedikleri takdirde bakteriler üremekte ve balığın kas dokusunda bulunan histidin, histidin dekarboksilaz enziminin etkisiyle yaklaşık 6-12 saat içinde histamine çevrilmektedir (45). Normal taze balıkta histamin düzeyinin 1mg/100g iken bu düzeyin 20mg/100g’ın üzerine çıkması zehirlenme belirtilerine sebep olmaktadır (48, 49).

C. Puffer Balık Zehirlenmesi

Pasifik okyanusunda yaşayan *Puffer* balığı ya da diğer tetrodotoksin (TTX) üreten Tetraodontidae familyasına ait balıkların (kirpi balığı, balon balığı ve güneş balığı) tüketilmesi sonucu ortaya çıkan bir zehirlenme türüdür. Bu zehirlenmeye “tetradon balık zehirlenmesi” adı da verilmektedir. Zehirlenmeden sorumlu olan tetrodotoksin diğer toksinlerde olduğu gibi algler tarafından üretilmez. Son yıllarda yapılan çalışmalarda tetradotoksinin *Vibrio* familyası, *Pseudomonas sp.* ve *Photobacterium phosphoreum*’u kapsayan çeşitli bakteri türleri tarafından sentezlendiği bildirilmiştir. *Puffer* balığı tüketilmesi sonucu tetrodotoksinle ilgili gelişen zehirlenme vakaları 1951-1974 yılları arasında Florida’da, 1977 yılında İtalya’da, 1996 yılında Kaliforniya’da görülmüş ve bu vakalardan İtalya ve Florida’da üç kişinin öldüğü bildirilmiştir (50).

Toksinin özellikleri: Tetrodotoksin (TTX), non-protein yapıda, düşük molekül ağırlıklı, suda eriyen, ısıya dayanıklı, beyaz kristal formunda, kokusuz bir nörotoksindir. Tetrodotoksinin farelerde LD₅₀ değeri 10 ng, insanlardaki LD₅₀ değeri ise 5.0 - 8.0 µg/kg dır. Toksinin 1 mg’ı ise bir insanı öldürmeye yeterlidir (51).

Semptomlar: *Puffer* balığının yenmesinden sonra yaklaşık 20 dakika içinde dil ve dudaklarda uyuşukluk olur. Daha sonra yüz, kol ve bacakta felç, baş ağrısı, bulantı, kusma, karın ağrısı görülür. Nadir olarak da yürümede güçlük gelişir. Toksikasyonun ikinci aşamasında paraliziler ve solunum güçlüğü artar, kişi hareket edemez, konuşma güçlüğü, kalp aritmileri, sinirsel bozukluklar görülür ve son aşamada ise 4-6 saat içinde ölüm gerçekleşir (52).

Mortalite: Japonya'da 1974 den 1983'e kadar 646 *Puffer* balık zehirlenmesi olgusunun meydana geldiği ve bunların 179'unun ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir. Yine aynı ülkede tetrodotoksinle bağlı her yıl yaklaşık 200 vakanın belirlendiği ve mortalitenin de %50 olduğu bildirilmiştir (50).

Patogenez: Tetrodotoksin (TTX) seçici Na⁺ kanallarını bloke ederek etki gösterir. Toksin kanal boyunca Na iyon difüzyonunu önler, K⁺ iyon akışında belirgin bir etki meydana getirmez. Böylece toksin sinir hücreleri ve aksonları boyunca sinir impulslarının iletimini bloke ederken, sinir hücrelerinde aksiyon potansiyelini artırır ve depolarizasyonu da önler (51).

D. *Pfiesteria piscicida* Zehirlenmesi

Yüzbinlerce balığın ölümüne neden olan bir dinoflagellat türü olan *Pfiesteria piscicida* ilk olarak 1988 yılında Kuzey Karolina Devlet Üniversitesi'nde görevli Dr. Joann Burkholder tarafından izole edilmiştir. Daha sonra 1992 yılında Kuzey Karolina'nın Pamlico ve Neuse körfezlerinde *Pfiesteria piscicida* ile ilişkili olarak balıklarda deride ülserler görüldüğü ve yaklaşık bir milyon Atlantik Ringa balığının öldüğü bildirilmiştir (53).

Pfiesteria dinoflagellat cinsinin *P. piscicida* ve *P. shumwayae* olmak üzere iki türü bulunmaktadır. *Pfiesteria* türleri fitoplanktonlarla beslenen renksiz, tek hücreli organizmalardır. Bu dinoflagellatlar oldukça kısa sürede şekil değiştirirler ve yaşam sıklusları boyunca 24 farklı forma dönüşebilirler.

Hem bitki hem de hayvan olarak karakterize edilmişlerdir. Bu canlı av bulamadığı zaman bitkiler gibi fotosentez yaparak kendi yiyeceğini elde eder. Enerjileri için gerekli kloroplastı "kleptokloroplastidi fenomeni" adı verilen yöntemle algleri yiyerek alır.

Av bulduğu zaman ise hem toksin salgılar hem de balığa saldırır. Balığın derisini soyar, sinir sistemi ve hayati organlarına zarar verir, yaradan sızan kan ve dokular ile beslenir (53).

Pfiesteria piscicida'nın yaşam siklusu amoboid aşaması, kist hali ve toksik olmayan zoosporları içerir. Amip formunda *P. piscicida* dip çamurundaki algler ve çöplerle beslenir. Elverişsiz şartlarda bu amip formu kist formuna dönüşerek uzun süre canlı kalır. Ortamda bir balık sürüsü bulunduğu ise toksik saldırgan hale dönüşüp balığın derisine yapışır (54).

Toksinin özellikleri: Kuzey Karolina Üniversitesi'nden Dr. Joann Burkholder tarafından *Pfiesteria* türlerinin bilinen iki tane toksininin olduğunu bildirmiştir. Bu toksinlerden yağda çözünenlerinin deri lezyonlarına, suda çözünenlerinin ise nörotoksik etkilere neden olduğu bildirilmiştir (53).

Semptomlar: *Pfiesteria* toksinlerine asıl balıkçılar ve laboratuvar çalışanları maruz kalmaktadır. Bu toksinin solunum ya da deri yoluyla alınması sonucu 1-2 saat içinde semptomlar gelişmektedir. Başlıca semptomlar; bulantı, kusma, ishal, karın krampları, göz irritasyonu, deride yanma ve kaşıntı, üst solunum yollarında irritasyon, baş ağrısı, şaşkınlık hali, hafıza kaybı ve kas kramplarıdır (55).

Patogenez: *Pfiesteria* toksinlerinin etki mekanizması henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır. Oldukça güçlü ekzotoksinlerinin olduğu ve bu toksine maruz kalan balıkların birkaç dakika içinde etkilendiği bildirilmektedir. Toksinin lipofilik özelliğinden dolayı kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebildiği ve merkezi sinir sistemini etkileyebileceği bildirilmiştir (56).

SONUÇ

Kontamine kabuklu su ürünlerinin tüketilmesi ile ortaya çıkan semptomlar toksinin varlığı ve konsantrasyonuna bağlı olarak tüketicilerde ciddi bazen de ölümcül zehirlenmelere neden olmaktadır. Kabuklu su ürünlerinden kaynaklanan gıda zehirlenmelerini önlemek için zehirlenmeye neden olan planktonların türleri, gelişme şartları ve dağılımları hakkında bilgi sağlanmalıdır. Kabuklu su ürünleri temiz sularla temin edilmeli ve düzenli olarak toksin yönünden incelenmelidir. *Ciguatera* zehirlenmesine neden olan tropikal kaya balıkları özellikle barakuda, tuna, lipsos, iskorpit, yılan balığı, köpek balığı, mercan alabalığı ve papağan balığı gibi balıkların tüketilmesinden kaçınılmalıdır. Paralitık kabuklu su ürünü zehirlenmesine neden olan alglerin bulunduğu kahverenginden kırmızı renge değişen sulardaki deniz kabuklularının tüketilmesinden kaçınılmalıdır. Histamin üretimi sıcaklıkla artma eğiliminde olduğundan balıklar yakalandıktan sonra soğuk zincirde taşınmalıdır. Toksinlerin büyük çoğunluğu pişirme gibi ısı işleminden etkilenmediğinden ham materyalin hijyenik yerlerden temin

edilmesine dikkat edilmelidir.

Ülkemizde bu konudaki çalışmalar son derece kısıtlıdır ve herhangi bir istatistiksel veri bulunmamaktadır. Hem insan sağlığı hem de gıda, tarım ve hayvancılık sektöründe çalışan uzmanların konu hakkında bilgi düzeyinin artırılması ve bu konu üzerine yapılan araştırmaların yoğunlaşması için ulusal politikalar belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Anonim. Seafood safety, <http://seafood.ucdavis.edu/Pubs/safety1.htm>, 15.01.2008.
2. Camacho FG, Rodríguez JG, Mirón AS, García MC, Belarbi EH, Chisti Y, Grima EM. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnol Adv*, 2007; 25:176- 194.
3. Lewitus AJ, Glasgow HB, Burkholder JM. Kleptoplastidy in the toxic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae), *J Phycol*, 1999; 35: 30312.
4. Graneli MW, Sundstrom B, Edler L, Anderson DM. Proceedings, 4th International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Amsterdam. New York: Elsevier Pres, 1990; 11- 6.
5. CDC. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks United States, 1998-2002. *MMWR*, 2006; 55(10):1-34.
6. Mak, KCY, Ashley MYL, Dennis, PHH, Patsy, SW, Michael, HWL, Rudolf, SSW, Bruce, JR, Paoul, KSL. Paralytic shellfish toxins in green-lipped mussels, *Perna viridis*, in Hong Kong. *Mar Pollut Bull*, 2003; 46(2):258- 63.
7. Oikawa H, Fujita T, Satomi M, Suzuki T, Kotani Y, Yano Y. Accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in the edible shore crab *Telmessus acutidens*. *Toxicon*, 2002; 40(11):1593- 9.
8. Anonim. Ciguatera and other marine biotoxins, [http://www.itg.be/itg/DistanceLearning/Lecture NotesVandenEndenE/46 Marine biotoxins p3.htm](http://www.itg.be/itg/DistanceLearning/Lecture%20NotesVandenEndenE/46%20Marine%20biotoxins%20p3.htm), 15.01.2008.
9. Yen, I.C., Astudillo, L.R., Soler, J.F., Barbera-Sanchez, A. Paralytic shellfish poisoning toxin profiles in green mussels from Trinidad and Venezuela. *J Food Comp Anal*, 2006; 19: 8894.
10. CDC. Epidemiological notes and reports paralytic shellfish poisoning- Massachusetts and Alaska, 1990. *MMWR*, 1991; 40(10):157- 61.
11. Halstead BW, Schantz EJ. Paralytic shellfish poisoning. World Health Organization, Geneva: WHO Offset Publication, 1984; 79:1- 60.
12. Shimizu Y. Paralytic shellfish poisoning. *Forthscritte Der Chemie Organischer Naturstoffe*, 1984; 45: 235- 64.
13. Hile B. Ionic Channels of Excitable Membranes. 2th ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1997; 224.
14. Morton SL, Tindall DR. Morphological and biochemical variability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* isolated from three locations at Heron Island, Australia *J Phycol*, 1995; 31: 914- 21.
15. Aune T, Yndstad M. Diarrhetic shellfish poisoning. In: IR Falconer (Ed), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. London: Academic Pres, 1993; 87- 104.
16. Svensson S, Förlin L. Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquatic Toxicol*, 2004; 66: 40518.
17. Suganuma M, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Nakayasu M, Ojika M, Wakamatsu K, Yamada K, Sugimura T. Okadaic acid: an additional nonphorbol- 12-tetradecanoate 13-acetate-type tumor promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 1768- 71.
18. Anonim. Toxicity, Seafood, <http://www.emedicine.com>, 10.03.2007.
19. Fujiki, H., Suganuma, M. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatase 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv Canc Res*, 1993; 61: 143- 94.
20. Nishitani L, Kenneth KC, Teri LK. Gathering Safe Shellfish in Washington: Avoiding Paralytic Shellfish Poisoning, <https://www.tpchd.org>, 10.03.2007.
21. Sato J, Oda T, Muramatsu T, Matsuyama Y, Honjo T. Photosensitizing hemolytic toxin in *Heterocapsa circularisquama*, a newly identified harmful red tide dinoflagellate. *Aquatic Toxicol*, 2002; 56(3): 191- 6.
22. Pierce RH, Henry MS, Proffitt LS, Hasbrouck PA. Red tide toxin (brevetoxin) enrichment in marine aerosol. *Toxic Marine Phytoplankton*, 1990; 397- 402.
23. LaPage KT, Baden DG, Murray TF. Brevetoxin derivatives act as partial agonists at neurotoxin site 5 on the Voltage-gated Na⁺ channel. *Brain Res*, 2003; 1:120- 7.
24. Baden DG, Fleming LE, Bean JA. Marine Toxin. In: *Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the Nervous System Part II. Natural Toxins and Drugs*. Amsterdam: Elsevier Pres, 1995; 141- 75.
25. Fleming LE, Stinn J. Shellfish Poisonings. *Travel Medicine*, 1999; 3:1- 6.
26. Uzbay IT. Psikofarmakolojinin temelleri ve deneysel araştırma teknikleri. 1. baskı. Çizgi Ankara; Tıp Yayınevi, 2004.
27. Rein KS, Lynn B, Gawley RE, Baden DG. Brevetoxin B: Chemical modification, synaptosome binding, toxicity, and unexpected confirmational effect. *J Org Chem*, 1994; 59: 2107- 13.

28. Jeffery B, Barlow T, Moizer K, Paul S, Boyle C. Amnesic shellfish poison. Food and Chem. Toxicol, 2004; 42: 545-57.
29. Buck KR, Uttal-Cooke L, PilskaIn CH, Roelke DL, Villac MC, Fryxell GA, Cifuentes L, Chavez FP. Autecology of the diatom *Pseudo-nitzschia australis*, a domoic acid producer, from Monterey Bay, California. Mar Ecol Prog Ser, 1992; 84: 293-302.
30. Wright JLC, Falk M, McInnes AG, and Walter JA. Identification of isodomoic acid D and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels. Can J Chem, 1990; 68: 22- 5.
31. Kaniou-Grigoriadou I, Mouratidou T, Katikou P. Investigation on the presence of domoic acid in Greek shellfish. Harmful Algae, 2005; 4: 717- 23.
32. Council of the European Communities. Council Directive 97/61/EEC of 20 October 1997 that modifies the Annex of Directive 91/492/EEC that lays down the health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve molluscs. Off J Eur Communities, 1997; L295: 35- 6.
33. Todd ECD. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning - A review, J Food Protec, 1993; 56(1): 69- 83.
34. Grimmelt B, Nijjar MS, Brown J MacNair N, Wagner S, Johnson GR, and Ahmend JF. Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and toxicity in mice. Toxicol, 1990; 28: 501- 8.
35. Wong CK, Hung P, Lee KLH, Kam KM. Study of an outbreak of ciguatera fish poisoning in Hong Kong. Toxicol, 2005; 46: 563- 71.
36. Baba T, Huang G, Isobe M. Synthesis of the JKLM-ring fragment of ciguatoxin. Tetrahedron, 2003; 59: 6851-72.
37. Morris JG, Lewin P, Smith CW, Blake PA, Schneider R. Ciguatera fish poisoning: epidemiology of disease on St. Thomas, U.S. Virgin Island. Am J Trop Med Hyg, 1982; 31: 574- 8.
38. CDC. Ciguatera fish poisoning-Texas, 1997. MMWR 1998;47(33): 692- 94.
39. Colman JR, Dechraoui MY, Dickey RW, Ramsdell JS. Characterization of the developmental toxicity of Caribbean ciguatoxins in finfish embryos. Toxicol, 2004; 44: 59-66.
40. Arnold T. Toxicity, Ciguatera, <http://www.emedicine.com/emerg/topic00.htm>, 02.02.2007.
41. FDA. Ciguatera, <http://www.cfsan.fda.gov>, 2.02.2007.
42. Bibard JN, Vijverberg HP, Frelin C, Chungue E, Legrand AM, Bagnis R and Lazdunski M. Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin. J Biol Chem, 1984; 259: 8353- 7.
43. CDC. Epidemiologic notes and reports scombroid fish poisoning-Illinois, South Carolina. MMWR, 1989; 38(9): 140- 142.
44. CDC. Scombroid fish poisoning-New Mexico. MMWR, 1988; 37(29):451.
45. FDA. Defect action levels for histamine in tuna; Availability of guide. Federal Register U.S. Food and Drug Administration, 1982; 47: 40487.
46. FDA. Scombrotoxin, <http://www.cfsan.fda.gov>, 02.02.2007.
47. Bartholomew BA, Berry PR, Rodhouse JC, Gilbert RJ, Murray CK. Scombrotoxic fish poisoning in Britain. Epidemiol Infect, 1987; 99: 775- 82.
48. FDA. Scombroid poisoning, <http://www.cfsan.fda.gov>, 02.02.2007.
49. FDA. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, <http://www.cfsan.fda.gov>, 10.03.2007.
50. Anonim. Tetrodotoxin, <http://www.chm.bris.ac.uk>, 10.03.2007.
51. Anonim. Tetrodotoxin, <http://www.ch.ic.ac.uk>, 10.03.2007.
52. Miller TR, Belas R. *Pfiesteria piscicida*, *P. shumwayae*, and other *Pfiesteria*-like Dinoflagellates. Res Microbiol, 2003; 154: 85- 90.
53. Lewitus AJ, Glasgow HB, Burkholder JM. Kleptoplastidy in the toxic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae), J Phycol, 1999; 35: 303- 12.
54. Anonim. CRS report, <http://www.ncseonline.org/nle/crsreports/marine/mar-23.cfm>, 10.03.2007.
54. Samet J, Bignami GS, Feldman R, Hawking W, Neff J, Smayda T. *Pfiesteria*: Review of the science and identification of research gaps. Report for the national center for environmental health, centers for disease control and prevention. Environ Health Persp, 2001;109(5): 639- 59.

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE

REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

REFİK SAYDAM HYGIENE CENTER

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology Publishing Agreement Form

.../.../20..

Makale Türü/Article Type: (...)Araştırma/Research (...)Derleme/Review (...)Olgü/Case

Makale Başlığı/Article Entitled:.....

Sayın Editör,

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

Bu çalışmanın:

1. Bilimsel, etik ve hukuki sorumluluğunun bize ait olduğunu,
2. Daha önce yurt içinde veya yurt dışında Türkçe veya yabancı bir dilde yayınlanmadığını,
3. Başka bir yayın organına yayınlanmak üzere gönderilmediğini,
4. Yayın için kabulü halinde tüm 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 legally,
2. The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under evaluation by this bulletin,
3. The article contains no libellous or other 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: 1.İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz.

2.Formu aşağıdaki adrese faks/posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz.

Note: 1.Please indicate the corresponding Author with (X).

2.Please send this form to the address below by faks or mail, or deliver personally.

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 06100 Sıhhiye-ANKARA

Tel/Phone: 0312 458 23 64 Faks/Fax: 0312 458 24 08 e-posta/e-mail: turkhijyen@rshm.gov.tr

