

***M. TUBERCULOSIS* ETKENİNE KARŞI BİRİNCİ KUŞAK
ANTİBİYOTİK İZONİYAZİD (INH)'İN ANTİBAKTERİYEL
ETKİSİ ÜZERİNE NAD, H₂O₂ VE
ZAYIF MANYETİK ALAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Esra ERDOĞAN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Selami GÜNAL

Yüksek Lisans Tezi – 2015

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

M. TUBERCULOSIS ETKENİNE KARŞI BİRİNCİ KUŞAK ANTİBİYOTİK
İZONİYAZİD (INH)'İN ANTİBAKTERİYEL ETKİSİ ÜZERİNE
NAD, H₂O₂ VE ZAYIF MANYETİK ALAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Esra ERDOĞAN

Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Selami Günel

MALATYA
2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Esra ERDOĞAN**'ın "**M.Tuberculosis Etkenine Karşı Birinci Kuşak Antibiyotik İzonyazid (INH)'in Antibakteriyal Etkisi Üzerine NAD, H₂O₂ ve Zayıf Manyetik Alan Etkisinin İncelenmesi**" konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/07/2015



Prof. Dr. Kadir BATÇIOĞLU
İnönü Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU
Trakya Üniversitesi
Üye



Yrd. Doç. Dr. Selami GÜNAL
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2015 tarih ve 2015/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Tüberküloz.....	2
2.1.1. Tüberkülozun Tarihçesi.....	2
2.1.2. Sınıflandırma.....	3
2.1.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri.....	4
2.1.3.1. Mikobakteriyel Efluks Sistemi.....	6
2.1.3.2. Mikobakteriyel Solunum.....	7
2.1.4. Tüberküloz İmmünopatogenezi.....	8
2.1.5. Bulaşma.....	12
2.2. Tüberküloz Tanısı.....	14
2.2.1. Mikroskopi.....	14
2.2.2. Kültür.....	15
2.2.3. Tür Tayini.....	16
2.2.4. Moleküler Tanı.....	17
2.2.5. İlaç Duyarlılık Testleri (İDT).....	19
2.3. Tüberküloz Tedavisi ve Direnç Sorunu.....	20
2.3.1. İzonyazid.....	24
2.3.1.1. Etki Mekanizması.....	24
2.3.1.2. KatG.....	28
2.3.1.3. Direnç.....	30
2.3.1.4. Enoil Redüktaz.....	33
2.3.1.5. Yan Etkileri.....	34

2.3.1.6. Metabolizması.....	35
2.3.2. Rifampisin.....	35
2.3.3. Etambutol.....	35
2.3.4. Pirazinamid.....	36
2.3.5. Streptomisin.....	36
2.4. Tüberküloz Epidemiyolojisi.....	37
2.4.1. Dünya'da Tüberküloz.....	37
2.4.2. Türkiye’de Tüberküloz.....	39
2.5. Manyetik Alan ve Etkileri.....	40
3. MATERYAL VE METOT.....	43
3.1. Demirbaş Malzemeler.....	43
3.2. Sarf Malzemeler.....	43
3.3. Middlebrook 7H10 Katı Besiyerinin Hazırlanması.....	44
3.4. Middlebrook 7H9 Sıvı Besiyerinin Hazırlanması.....	44
3.5. TBE 10X'in Hazırlanması.....	44
3.6. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	44
3.7. PZR Ürünlerinin Elde Edilmesi.....	45
3.8. PZR Uygulaması.....	45
3.9. DNA'nın Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi.....	46
3.10. Agar Proporsiyon Yöntemi.....	47
3.11. Manyetik Alan Uygulaması.....	47
3.12. Deneyin Birinci Aşaması.....	47
3.13. Deneyin İkinci Aşaması.....	48
3.14. İstatiksel Yöntemler.....	48
4. BULGULAR.....	52
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR.....	64
EK 1. ÖZGEÇMİŞ.....	76

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bana verdikleri emek için en başta Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Kadir Batçioğlu'na ve tez çalışmamı yönlendiren, tecrübelerini, bilgisini ve desteğini benden esirgemeyen, sabırla hep yanımda olan sevgili hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Selami Günal'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamıza destek olan İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Barış Otlu'ya, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı değerli öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Metin Genç'e ve İnönü Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümü değerli öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Nevzat Bayrı'ye teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Yrd. Doç. Dr. Ayşe Burçin Uyumlu'ya, Arş. Grv. Basri Satılmış'a, Arş. Grv. Tuba Ünver'e ve Biyolog Savaş Çelik'e desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak bugünlere ulaşmamı sağlayan, hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim süresince de hep yanımda olan sevgili anneme, babama ve kardeşlerime; hayat arkadaşım eşime, canım yavrularıma sonsuz teşekkürlerimle...

ÖZET

***M. tuberculosis* Etkenine Karşı Birinci Kuşak Antibiyotik İzonyazid (INH)'in Antibakteriyel Etkisi Üzerine NAD, H₂O₂ ve Zayıf Manyetik Alan Etkisinin İncelenmesi**

Amaç: Dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* basili ile enfektedir. Her yıl yaklaşık 2 milyon insan hastalık sebebi ile hayatını kaybetmektedir. İzonyazid, tedavide en yaygın ve etkin kullanılan ilaç olmasına rağmen etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Öte yandan elektromanyetik alan kaynakları sağlık üzerine olumlu olumsuz pek çok etkiye sahiptir. DSÖ düşük frekanslı elektromanyetik alanları "2B sınıfı olası kanserojen etken" olarak kabul etmiştir. Çalışmamızda zayıf manyetik alan uygulaması ile NAD ve H₂O₂ ilavesinin izonyazidin etki mekanizması üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metod: Bu çalışmada farklı gruplara tek tek ve birlikte, değişen konsantrasyonlarda NAD ile H₂O₂ ilave edilerek ilacın etki mekanizması üzerinde yaptığı değişim değerlendirildi. Bir deney grubu günlük 4,5 saat (10 günde toplam 45 saat) 5 mT , 50 Hz manyetik alana maruz bırakıldı. Sonuçları değerlendirmek üzere agar proporsiyon yöntemi kullanıldı. PZR-RFLP metoduyla dirençli suşlar gösterildi.

Bulgular: Manyetik alan uygulaması deney sonunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem duyarlı hem dirençli suşların koloni sayılarında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (p>0,05) . 10'ar µM NAD ve H₂O₂'nin tek tek ve birlikte izonyazid içeren besiyerlerine 10 gün boyunca ilavesi bu maddelerin birlikte ilave edildiği grupta ilacın etkinliğini artırarak koloni sayılarını azaltmıştır (p<0,05). Bundan hareketle değişen konsantrasyonlarda NAD ve H₂O₂ 'nin beraber ilave edildiği gruplarda en çok etki 100'er µM eklenen grupta ölçülmüştür.

Sonuç: Özellikle 100'er µM NAD ve H₂O₂ 'nin birlikte ilavesinin izonyazidin etkinliğini bir miktar artırdığı ancak zayıf manyetik alan uygulamasının ilacın etkinliğini değiştirmediği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Etki mekanizması, ilaç direnci, izonyazid, manyetik alan, *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

The Investigation of the Effect of NAD, H₂O₂ and Weak Magnetic Field on the Antibacterial Mechanism of Isoniazid (INH) That First Line Antibiotic Against *M. tuberculosis* Agent

Aim: Nearly one-third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. Each year around 2 million people in the world have died because of that disease. Although isoniazid is used as the most common and effective drug in therapy, mechanism of action of isoniazid is not fully elucidated. Moreover, electromagnetic field sources have a lot of positive and negative effects on health. WHO has accepted low frequency electromagnetic fields as a "Class 2B possible carcinogenic effects". In our study, we aimed to investigate the effects of isoniazid mechanisms with added NAD and H₂O₂ with a weak magnetic field application.

Material and Method: In this study, at varying concentrations of NAD and H₂O₂ were added to different groups individually and in combination, and changes made on the mechanism of drug evaluated. An experiment group were exposed to 5 mT, 50 Hz magnetic fields daily 4.5 hours (total 45 hours for 10 days). Agar proportion method was used to evaluate the results. Resistant strains was demonstrated by PCR-RFLP method.

Results: At the end of the experiment, magnetic field application did not cause any change on the number of colonies both sensitive and resistant strains in comparison to control group ($p > 0,05$). Combined addition of 10 μ M NAD and H₂O₂ to media containing isoniazid for 10 days dramatically reduced the number of colonies in the group ($p < 0,05$) and increase the effectiveness of the drug. From this point, the most effects were measured in the group of 100 μ M added by adding varying concentrations of NAD and H₂O₂.

Conclusion: Especially with the addition of 100 μ M NAD and 100 μ M H₂O₂ together was found to increase isoniazid activity as dramatically, also it was determined that weak magnetic field application does not change the efficacy of the drug.

Key Words: Drug resistance, isoniazid, magnetic field, mechanism of action, *Mycobacterium tuberculosis*.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AARB	: Aside Alkole Dirençli Bakteri
ACP	: Açıl Taşıyıcı Protein
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
ARB	: Aside Dirençli Bakteri
ATCC	: American Type Culture Collection
ATM	: Atipik Mikobakteriler
ATP	: Adenozin Trifosfat
BCG	: Bacillus Calmette-Guerin
bp	: Baz çifti (base pair)
CD-4/8	: Cluster of differentiation
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit (Tamamlayıcı DNA)
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institue
ÇDF-EMA	: Çok Düşük Frekanslı Elektromanyetik Alan
ÇİD-TB	: Çok İlaça Dirençli Tüberküloz
DGTS	: Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EMB	: Etambutol
ETZ	: Elektron Transport Zinciri
EZN	: Ehrlich-Ziehl-Neelsen
FAS	: Fatty Acid Synthase
FDA	: Food Drug Administration
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü)
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HSP	: Heat-Shock Protein
IARC	: International Agency for Research on Cancer
ICNIRP	: The International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection
IFN-γ	: Interferon Gamma
IL	: İnterlökin

INH	: İzonyazid
İDT	: İlaç Duyarlılık Testi
LAM	: Lipoarabinomannan
LM	: Lipomannan
LTBI	: Latent Tüberküloz Enfeksiyonu
MCP	: Monosit Kemoatraktan Protein
MDR-TB	: Multi Drug-Resistant Tuberculosis (Çok İlaça Dirençli Tüberküloz)
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MOTT	: (mycobacteria other than tubercle bacilli) <i>M. tuberculosis</i> Kompleks Dışı Mikobakteriler
MÖ	: Milattan Önce
MTBC	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex
MTK	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Kompleksi
NAAT	: Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NIEHS	: National Institute of Environmental Health Sciences
NTM	: Nontüberküloz Mikobakteriler
NK	: Naturel Killer
OADC	: Oleik Asit-Albumin Dekstroz Katalaz
PAS	: Para-amino salisilik asit
PCR	: Polymerase chain reaction
PMF	: Protein Motive Force
PPD	: Prufied Protein Derivative (Saflaştırılmış Protein Türevi)
PZA	: Pirazinamid
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RIF	: Rifampisin
RNA	: Ribonükleik Asit
SM	: Streptomisin
SOD	: Süperoksit dismutaz
STR	: Streptomisin
Tc	: T sitotoksik
Th	: T helper

TB	: Tüberküloz
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA
TDM	: Tüberküloz Dışı Mikobakteriler
TLR-2	: Toll Like Reseptor-2
TLR-4	: Toll Like Reseptor-4
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör Alfa
UV	: Ultraviyole
UTKP	: Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı
VSD	: Verem Savaş Dispanseri
YİD-TB	: Yaygın İlaç Dirençli Tüberküloz
WHO	: World Health Organization
XDR-TB	: Extensively Drug-Resistant Tuberculosis- Yaygın İlaç Dirençli Tüberküloz

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Mikobakteriyel hücre duvarı	4
Şekil 2.2. <i>M. tuberculosis</i> 'de dışa atım pompaları	6
Şekil 2.3. Mikobakteriyel solunum zinciri	8
Şekil 2.4. Tüberküloz granülomu	10
Şekil 2.5. Reaktif oksijen türleri (ROT)	25
Şekil 2.6. <i>M. tuberculosis</i> katG'sinin aktiviteleri	26
Şekil 2.7. İzonyazidin aktivasyonu	27
Şekil 2.8. <i>M. tuberculosis</i> genomu.....	28
Şekil 2.9. INH ve ETH'nin aktivasyonları ve etki mekanizmaları.....	31
Şekil 2.10. <i>M. tuberculosis</i> 'de yağ asiti sentez yolağı	34
Şekil 2.11. DSÖ 2013 yılı tahmini küresel tüberküloz insidansı oranları.....	38
Şekil 3.1. Duyarlı ve dirençli örneklerin RFLP profili.....	46
Şekil 3.2. Manyetik alan düzeneği.....	47
Şekil 4.1. Manyetik alan uygulamasının dirençli ve duyarlı suşların koloni sayılarına etkisi.....	52
Şekil 4.2. 10 µM H ₂ O ₂ ve NAD ilavesinin duyarlı suşlara etkileri.....	53
Şekil 4.3. 10 µM H ₂ O ₂ ve NAD ilavesinin dirençli suşlara etkileri.....	54
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ ve NAD'ın birlikte ilavesinin duyarlı suşların koloni sayılarına etkileri	55

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. MTBC kültürü için kullanılan besiyerleri.....	18
Tablo 2.2. TB olgu tanımlarına göre erişkin hastalar için önerilen tedavi şeması	23
Tablo 2.3. DSÖ bölgelerine göre tahmini TB hastalık yükü 2013.....	39
Tablo 3.1. İstatiksel sonuçlar.....	49
Tablo 3.2. Gruplar arası karşılaştırmaların istatiksel anlamlılık düzeyi (1-4. Gruplar).....	50
Tablo 3.3. Gruplar arası karşılaştırmaların istatiksel anlamlılık düzeyi (5-12. Gruplar).....	50
Tablo 3.4. Gruplar arası karşılaştırmaların istatiksel anlamlılık düzeyi (13-17. Gruplar).....	51
Tablo 4.1. 45 saat 5 mT manyetik alan uygulamasının duyarlı ve dirençli suşların koloni sayılarına etkileri.....	52
Tablo 4.2. 10'ar μM H_2O_2 ve NAD ilavesinin duyarlı ve dirençli suşlara etkileri.....	53
Tablo 4.3. H_2O_2 ve NAD'ın birlikte ilavesi ile elde edilen koloni sayıları.....	54

1. GİRİŞ

Tüberküloz hastalığı, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks olarak adlandırılan basillerle oluşan, çok değişik klinik görünümlere sahip kronik, nekrotizan bir enfeksiyon olup hastalığın oluşumundan % 97-99 oranında *M. tuberculosis* sorumludur. Tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen, halen tüm dünyada en öldürücü enfeksiyon hastalığı olma özelliğine sahiptir. Dünyanın her yerinde erkek kadın, genç yaşlı herkes bu öldürücü enfeksiyonun riskini taşımaktadır (1, 2).

Tüberkülozun taşınmasının tek yolu basil ile enfekte kişidir. Basilin vücuttaki hedefi öncelikle akciğerlerdir. Neredeyse tüm organ sistemlerini tutabildiği de görülmüştür. Bedenin tüberküloza karşı birincil savunma yolu olan makrofajlar, aynı zamanda basilin birincil yerleşim yerleridir (2).

Kür sağlayan çok ilaçlı tedavilerin uzun süre kullanılıyor olması hastaların toleransını ve tedavi maliyetlerini artırmaktadır. Düzenli kullanılmayan ilaçlar ve yetersiz tedavi programları dünyanın her yerinde antitüberküloz ilaçlara karşı direnç gelişimine yol açmıştır. HIV'in ortaya çıkmasının hastalığın seyrini kötüleştiren en zararlı ve yıkıcı unsur olduğu düşünülmektedir. HIV ile enfekte kişiler latent tüberküloz enfeksiyonunun endojen reaktivasyonu riskine sahip olmakla birlikte daha fazla yeni enfeksiyon olma tehlikesi de taşırlar (2, 3).

Tüberküloz kemoterapisinin üç hedefi; tipik olarak hastalanmış konakçının dokularında çoğalmakta olan (vejetatif) çok fazla sayıdaki basili hızla öldürmek, doğru ve etkin tedavi yöntemleri ile ilaca dirençli suşların ortaya çıkmalarını engellemek ve hastalık bölgelerini etkili bir şekilde sterilize etmektir (2).

Bir ön ilaç olan izoniyazid tüberküloz tedavisinde en yaygın kullanılan ve en etkili ilaçtır. Tüberküloz basiline pasif difüzyonla alınan ilaç basil katalaz-peroksidaz enzimi olan katG tarafından aktif hale getirilir. NAD ve H₂O₂ ilacın aktivasyonu için ortamda bulunmalıdır. İlaç, basil hücre duvarının önemli bir bileşiği olan mikolik asit sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterir (3).

Bu çalışmada amacımız izoniyazidin etki mekanizmasında değişen konsantrasyonlarda ortama ilave edilen NAD ve H₂O₂'nin rollerini göstermek ve aynı zamanda daha önce tüberküloz basili ile hiç çalışılmamış olan zayıf manyetik alan uygulamasının ilacın etkinliğini artırıp artırmadığını belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tüberküloz

2.1.1. Tüberkülozun Tarihçesi

Tüberküloz hastalığının tarihi neredeyse insanlık tarihi kadar eskiye dayanmaktadır. Zengin, fakir, köylü, kentli ayrımı yapmaksızın toplumun her kesimini etkileyen bir hastalıktır. Tarihsel süreçte değişik toplumlarda farklı isimlerle anılmıştır: Ölüm Kaptanı, Beyaz Veba, Beyaz Ölüm, İnce Hastalık, Verem, Teverrüm, Zaafiyet, Duman. Bu kelimelerin tamamı erime, zayıf düşme, tükenme anlamlarına gelir (3).

Verem hakkında ilk bilgiler milattan üç bin yıl önce Nil nehri kenarındaki Dra Abu-El Naga isimli kasabada yaşayan ve kanlı balgam çıkararak ölen genç bir kızıdan edinilmiştir. M.Ö. bin yılında yaşamış olan rahip Nesperehan'ın mumyasında Pott apsesi denilen vertebra tüberkülozu görüldüğü ortaya çıkmıştır (4).

İlk senatoryumun 1854 yılında Almanya'da açılmasıyla tüberküloz tedavisinde farklı bir yaklaşım başlamış, hastalar dağ yamaçlarına kurulan senatoryumlarda yatak istirahati, zengin diyet, hafif egzersiz, temiz dağ havası ile tedavi edilmeye çalışılmış ve özellikle enfeksiyon kaynağı olan hastaların toplumdan izole edilmesiyle toplumun hastalıktan korunması hedeflenmiştir (5).

Tüberküloz basili Alman mikrobiyolog Robert Koch tarafından bulunmuştur. Bu buluş tüberküloz hastalığı ve hastaları için bir devrim niteliğindedir. *Bacterium tuberculosis* adı ile anılan bakteri, koloni morfolojisi ve yavaş üreme özelliği sebebi ile mantara benzetildiğinden Lehman ve Neuman tarafından 1886 yılında *Mycobacterium tuberculosis* olarak isimlendirilmiştir. Koch araştırma sonuçlarını 24 Mart 1882 günü Berlin Fizyoloji Derneği'ne sunarak tüm dünyaya ilan etmiş ve bu buluşu kendisine 1905 yılında Nobel Ödülü kazandırmıştır (2).

Koch'un tüberküloz basilini bulması birçok araştırmacıyı hastalığa karşı aşı geliştirmek için çalışmaya yönlendirmiştir. Bakteriyolog Leon Charles Albert Calmette ve veteriner hekim Jean Marie Camille Guerin isimli iki Fransız bilim adamı 20 yıl boyunca tam 230 kültür yaparak yaşamını sürdüren ancak hastalık yapma özelliğini yitiren bir bakteri elde ettiler. Bilim çevreleri, bağışıklık yapma özelliği olan bu bakteriye “Bacille Calmette-Guerin” (BCG) adını verdiler. BCG 1921 yılında oral olarak kullanıma sunulmuştur. 1925'de Heinbeck aşının deri altı uygulamasını geliştirmiştir (3).

1939 yılında Florence Seibert ve Glenn, old tüberkülünü saflaştırmış ve elde edilen saflaştırılmış protein türevi (PPD) ile tüberküloz enfeksiyonunun varlığı saptanmaya başlanmıştır (6).

Tedavide yarar gösteren ilk ilaç olan streptomisinin 20 Kasım 1944 tarihinde Selman Abraham Waksman tarafından keşfi tüberkülozda antibiyoterapi dönemini başlatmıştır. Tek antibiyotik uygulaması nedeniyle kısa sürede direnç gelişmiştir. 1946'da İsveç'te para-aminosalisilik asit (PAS)'in basile etkisi gösterilmiş, 1952 yılında Gerhard Domagk tarafından izoniyazid bulunarak, 18-24 ay süreyle üçlü tedavi uygulanmıştır. Kombine tedavinin uygulanmasıyla tüberküloz başarı ile tedavi edilebilir bir hastalık haline gelmiştir (2, 7).

1954 yılında pirazinamid (PZA), 1962 yılında ethambutol (EMB) ve 1966 yılında rifampisin (RIF) bulunmuştur. Böylece kısa süreli tedaviye geçilmiş toplam tedavi süresi 18-24 aydan 6 aya kadar inmiş, tedavinin etkinliği artmış bu da hastalığın kontrolünü kolaylaştırmıştır (8).

2.1.2. Sınıflandırma

Mycobacterium cinsi, *Prokaryot* aleminin, *Firmicutes* bölümünün, *Actinobacteria* sınıfının, *Actinomycetales* takımının, *Mycobacteriaceae* ailesine dahil olup bu ailedeki tek cinstir. *Actinomycetales* takımının diğer üyeleri *Rhodococcus*, *Corynebacteria* ve *Nocardia*'dır (3).

Mycobacterium, Yunanca fungus (myces) ve küçük çubuk (bakterion) kelimelerinden türetilmiştir. İsmi fungus kısmı, bu mikroorganizmanın sıvı besiyerinde üreme özelliklerinin küflere benzemesinden kaynaklanmaktadır (2).

İnsanda en sık hastalık oluşturan mikobakteri türü, tüberküloz hastalığının etkeni olan *M. tuberculosis*'tir. Bu kompleks içinde (MTBC) *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. ulcerans* ve *M. bovis BCG* bulunmaktadır. İnsan *M. tuberculosis* için tek kaynaktır ve bu mikroorganizma insanlar arasında hastalık yapar (9).

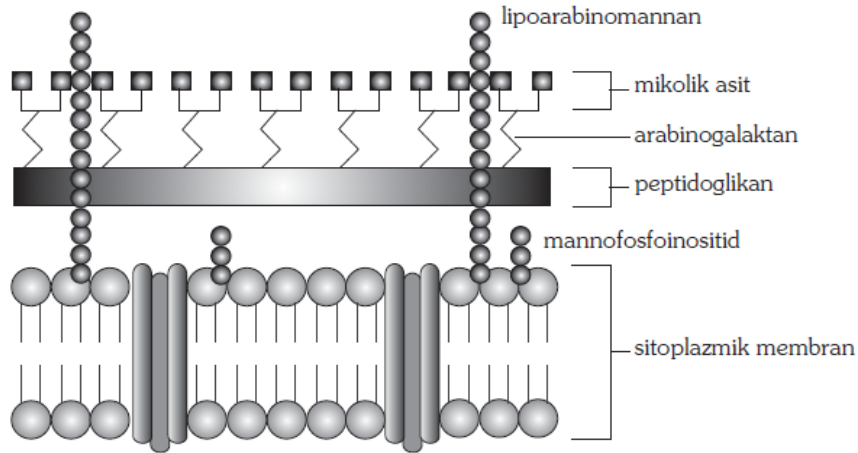
M. tuberculosis kompleks dışında kalan mikobakteriler (TDM) ise, pseudotüberküloz basili, atipik mikobakteriler (ATM), nontüberküloz mikobakteriler (NTM), tüberküloz basili dışındaki mikobakteriler (mycobacteria other than tubercle bacilli: MOTT) gibi isimler alırlar (10).

2.1.3. Mikobakterilerin Genel Özellikleri

M. tuberculosis aerobik, hareketsiz, spor oluşturmeyen, in vitro kültürde üretildiğinde ise birçok bakteriyel patojenden daha küçük olup, 0,2-0,6 µm çapında 1-10 µm uzunlukta hafif eğri veya düz çubuk şeklinde bir basildir (2).

Genomik yapısındaki yüksek guanin ve sitozin (G+C) oranı (% 61-71) ve tüm bakteriler arasında hücre duvarında en yüksek lipit içeriğine sahip oluşları ile eşsizdirler. Konak bağımlıdır ve çevrede çoğalamazlar (5).

Hücre duvarlarının lipit içeriği bakımından zengin oluşları nedeniyle alkol, asit, alkali ve kuru ortama karşı direnç gösterirler. Böylece geleneksel bakteri boyaları ile boyanmazlar. Ancak Ziehl ve Neelsen tarafından geliştirilen, ve Ehrlich tarafından modifiye edilen karbolfuksin (fenollü bazik fuksin), asit-alkol ve metilen mavisinden oluşan Ehrlich-Ziehl-Neelsen boyama (EZN) yöntemiyle etkili bir şekilde boyanırlar. Boyandıklarında aldıkları boya asitle ve alkolle dekolorize edilemez. Bundan dolayı aside ve alkole dirençli bakteriler (AARB) olarak isimlendirilirler. Mikobakterilerin lipit kompleksleri açısından zengin hücre duvarına bağlanarak, görünür hale gelmesini sağlayan floresan boyalar da kullanılmaktadır (6, 11).



Şekil 2.1. Mikobakteriyel hücre duvarı (6)

Mikobakterilerin zarfı; sitoplazmik membran, hücre duvarı ve dış kapsül benzeri tabakadan oluşmaktadır. Membran da ise peptidoglikan, arabinogalaktan ve mikolik asit makromolekülleri bulunmaktadır. Hücre duvarı içeriğindeki bakterinin yapısal bütünlüğünden sorumlu olan peptidoglikan (mürein) tabaka % 70-80 oranında çapraz bağ bulunmasıyla benzersizdir. Arabinogalaktan, peptidoglikan tabakaya kovalent bağla

bağlanmış bir polisakkarittir. Uçlarında 60-90 karbon atomu içeren yüksek molekül ağırlıklı yağ asiti olan mikolik asit bulunur. Mikolik asit türe özgü olup hidrofobik bir tabaka oluşturarak hidrofilik maddeler ve antibiyotiklerin hücreye girişininin engellenmesinden ve bakterinin boyanma özelliğinden sorumludur (2, 5, 12).

Mikobakteriler hücre duvarlarının düşük permeabilite ve hidrofobisite özellikte olmasından dolayı bazı yararlı metabolitleri kullanmada zorlanırlar. Ayrıca RNA zincirinin uzama hızının oldukça düşük olması sonucu yavaş üreme hızına sahip olan mikobakteriler, 18-24 saatte ikiye bölünürler. Hücre duvarı kimyasal toksik ajanlar ve hücrel toksinlere, asit ve alkali ortama ve alanin boyalara karşı intrinsik (doğal) dirence sahiptir. Bu özellikleri mikobakterileri hücre içi ve hücre dışı zararlılara karşı korurken, hücre duvarlarında taşıdıkları bazı yapı elemanları ile konağın immün cevabını da etkileyerek tedaviye cevap vermeyen yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlara neden olabilirler (3).

Basilin özel çevre koşullarına adaptasyon yeteneği fazladır. Bakteri aerobik şartlarda ağırlıklı olarak karbonhidrat, mikroaerofilik şartlarda ise lipid kullanmaktadır. Aerobik solunumda son elektron alıcısı olarak oksijeni kullandıkları için akciğerler, özellikle de üst loplar, tüberküloz basilinin üreyebilmesi için elverişlidir. Büyüme hızı büyük ölçüde oksijen basıncına bağlıdır. Oksijen basıncının yüksek olduğu kavitelere hızlı üremesine rağmen oksijenin az olduğu kazeöz ortamda çok az ürer ya da hiç üremez (13).

Üreme için karbondioksit gerekli olup özellikle kültür ortamında % 5-10 oranında bulunduğunda daha iyi üreme sağlanır. Optimal üreme ısıları 35-37 °C'dir. Katı besiyerinde 15-20 günde gözle görünür koloni oluşturular (5, 9).

Magnezyum ve demir yaşam için zorunludur. Demiri toplamak için çevreye salınan hidrofilik peptidlere eksoşelin denir. Mikobaktinler ise demiri sitoplazmaya sunan, hücre duvarında bulunan hidrofobik yapılardır. Konakçının demiri depolayan ve taşıyan proteinleri olan ferritin ve transferrin ile yarışa girerek demiri bağlar, böylece konağın antimikrobiyal aktivitesini de kısıtlamış olurlar (5, 6).

Mikolik asit, trehaloz 6,6'-dimikolata bağlanarak önemli bir virülans faktörü olan ve fagositlerin göçünü engelleyerek granülom oluşumunu sağlayan kord faktör oluşturabilir. Bakteri tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak da kullanılabilir. Ayrıca hücre membranları ve membranöz organellerin yapı ve işlevlerinde de rol oynar. Basilin endotoksini ve ekzotoksini yoktur. Lipomannan (LM) ve lipoarabinomannan (LAM)

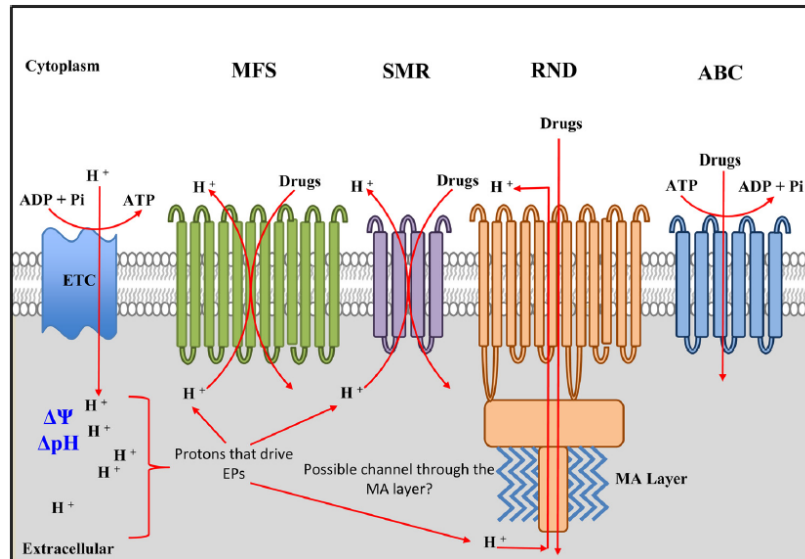
..gibi glikolipitler plazma membranına tutunup hücre duvarının dışına uzanarak zarfı geçerler. LAM türe özgüdür (5).

Genel olarak taze virülan basil katı besiyerinde R tipi, sıvı besiyerinde yılan kavi bir görünüm; virülan olmayan basil ise katı besiyerinde S tipi, sıvı besiyerinde ise ayrılmış parçalar halinde koloniler oluşturur ve yaymada dağınık gevşek kümeler halinde dağılırlar (5).

M. tuberculosis 90'dan fazla antijene ve değişik virülans faktörüne sahiptir. Isı şok proteinleri (HSP), pürifiye protein deriverleri (PPD), kord faktör (trehalose-6,6'-dimikolat), süperoksit dismutaz (SOD), katG (katalaz peroksidaz), ESAT-6 (erken salınan antijen), wax D, antijen 60 (A60), antijen 85, sülfolipidler, LAM bunlardan bazılarıdır (3, 6, 12, 13).

2.1.3.1. Mikobakteriyel Efluks Sistemi

Bakteriler, detoksifikasyon enzimleri üreterek, enzimatik modifikasyonlar ve mutasyonlarla hücresel hedefte değişiklik oluşturarak, zararlı bileşik ve ilaçların giriş yollarını kapatarak ya da dışa atım pompalarını (efluks) kullanarak toksik bileşikler ve ilaçlara karşı kendilerini korurlar (14).



Şekil 2.2. *M. tuberculosis* 'de dışa atım pompaları (17)

Mikobakterilerde doğal direnç, pek çok bileşiğe karşı bariyer olan mikolik asitten oluşan hücre duvarı ile aktif efluks pompaları arasındaki sinerji ile gerçekleşmektedir. Proton itici güç (PMF) ve hücre içi ATP konsantrasyonları efluks mekanizmasını etkiler (15-17).

MFS (the major facilitator superfamily), SMR (small multidrug resistance family), RND (resistance/nodulation/cell division family), ATP bağımlı ABC (ABC-type superfamily of transporters) ve MATE (the multidrug and toxic compound extrusion family) *M.tuberculosis*'deki dışa atım pompalarındandır. Bu pompalardan bazıları mikobakterilerin izoniyazid, tetrasiklin, florokinolonlar ve aminoglikozitler gibi antibiyotiklere karşı duyarlılığını azaltmaktadır. ATP bağlayıcı kaset (ABC) tipi çoklu ilaç taşıyıcılar, ilaçları hücre dışına pompalamak için ATP kullanırlar. ABC tipi dışa atım pompalarını kodlayan genler, *M. tuberculosis* genomunun % 2,5'ini oluştururlar (17, 18) .

Efluks pompaları izoniyazid kullanımı sonrası ilaca karşı direnç oluşturan mutasyonlar gerçekleşinceye kadar basilin hayatta kalmasına katkı sağlar. Efluks pompalarını sentezleyen genlerde gerçekleşen mutasyonların efluks aktivitesini ve antibiyotik dirençliliğini artırdığı bilinmektedir. Efluks pompası ile antibiyotiklerin hücre içi seviyeleri ilaçlar dışa atılarak düşürülür böylece letal dozun altında kalan antibiyotik seviyelerine karşı mikobakteri yaşam mücadelesi verebilir (17-19). Artan efluks sistem aktivitesinin izoniyazide karşı düşük seviyede direnç oluşumundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Yüksek seviyede direnç oluşumu ise bu antibiyotiklerin birincil hedeflerini kodlayan gen mutasyonları sebebiyledir (19).

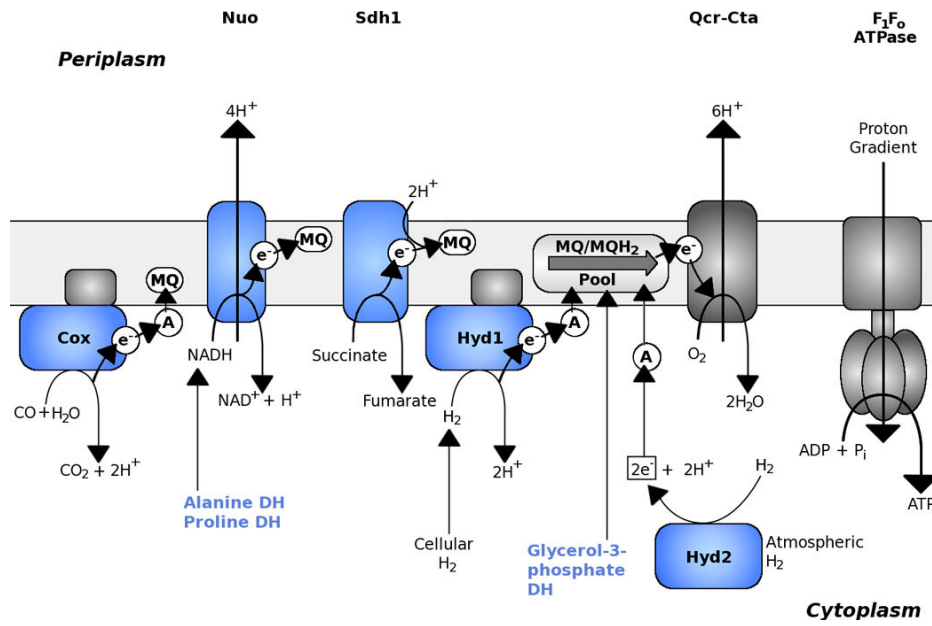
2.1.3.2. Mikobakteriyel Solunum

Mikobakteriler enerjilerini oksidatif fosforilasyon ve substrat düzeyinde fosforilasyon yoluyla elde ederler. Zorunlu aerob olmalarına rağmen oksijen yokluğunda solunum komplekslerinin down regülasyonu yolu ile metabolizmalarını sürdürürler (20).

Redüktazlar, hidrogenazlar ve ferrodoksinler oksijen yokluğunda bakteriye anaerobik tip metabolizmaya adaptasyon kabiliyeti sağlar. Membrana bağlı F_1F_0 -ATP sentaz enzimi çoğalan ya da çoğalmayan mikobakterilerde ATP sentezini gerçekleştirmektedir ve hipoksik koşullardan aerobik koşullara kadar çok çeşitli proton itici güç (PMF) düzeylerinde fonksiyon görebilmektedir (17-19).

Hipoksik durumlarda bakteri çoğalamazken endojen ve eksojen enerji kaynaklarını metabolize ederek fonksiyonlarını sürdürmektedir. Katabolik ve anabolik reaksiyonları düzenleyerek ve metabolizmasını ayarlayarak enerji kullanır. Mikobakteriyel elektron transportu çeşitli dehidrogenazların aktivitesi üzerinden başlatılır. Elektronlar oksijen varlığına bağlı olarak çeşitli sitokrom oksidazlara geçer. ETZ ortamdaki oksijen miktarına adapte olur. Aerobik koşullarda en son elektron transfer basamağında oksijen, anaerobik ortamda ise nitrat ya da fumarat kullanılabilir (17, 19).

F_1F_0 -ATP sentaz protonların elektrokimyasal gradiyentini kullanarak düşük hücre içi ATP ve yüksek PMF varlığında ADP ve inorganik fosfattan ATP üretmektedir. Ayrıca enzim düşük PMF ve hücre içi yüksek ATP düzeylerine ulaşıldığında ATPaz gibi çalışma yeteneğine de sahiptir (20).



Şekil 2.3. Mikobakteriyel solunum zinciri (20)

2.1.4. Tüberküloz İmmünopatogenezi

Enfeksiyondan sonra hastalık esas olarak üç olası mekanizmadan biri ile gelişmektedir. Bunlardan birincisi primer enfeksiyonun ilerlemesi, diğeri endojen reaktivasyon, son mekanizma ise eksojen olarak yeniden enfekte olmaya (reenfeksiyon) bağlı hastalık gelişmesidir. Bunlardan reenfeksiyon yoluyla hastalanma önemli oranda gerçekleşmektedir (21).

Tüberküloz basiline karşı organizmada hücrel immün yanıt ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık olmak üzere iki önemli immün yanıt oluşur. Bu immün yanıtlar oluşuncaya kadar tüberküloz basilinin kendisi konakçı dokularında hiçbir hasar oluşturamaz. Basil çoğalması ile konağın oluşturduğu immünolojik yanıtlar arasındaki etkileşim hastalığın hem ilerlemesini veya gerilemesini hem de gelişecek olan hastalığın tipini belirler (6).

Tüberküloz immünopatogenezini 4 evrede inceleyebiliriz.

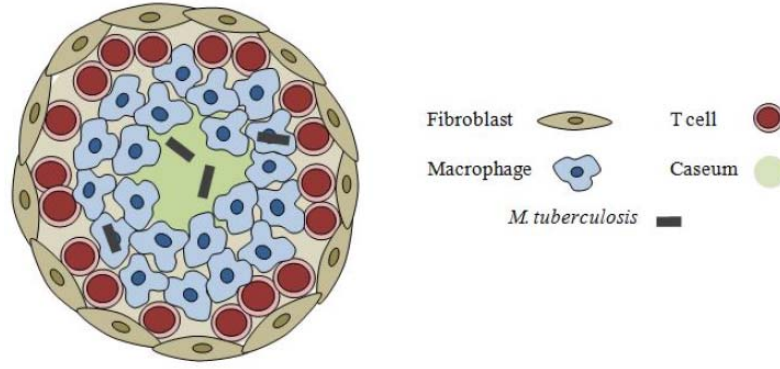
Evre 1: Bulaşma- Başlangıç Evresi (1. hafta)

Tüberküloz basilinin inhalasyonu ile başlamaktadır. Nonimmün savunma mekanizmaları (mukosilyer aktivite gibi) devreye girer. Ancak yeterli olmayabilir. Alveollere ulaşan basil yüklü damlacıklar burada alveoler makrofajlarca fagosite edilir ve basillerin % 90'ı tahrip olur. Zaten zorunlu hücre içi parazit durumunda olan basilin yaşamını sürdürmek ve çoğalmak için makrofaj sitoplazmasına ihtiyacı vardır. Basilin virülans özelliklerine ve alveoler makrofajların mikrobisidal gücüne bağlı olarak basil ya canlı kalır ya da makrofaj içinde kısmen antijenik parçalara ayrılır (2, 6, 22, 23).

Evre 2: Enfeksiyon, çoğalma ve yayılma (2-3 hafta)

Makrofaj tarafından fagosite edilen ve sindirilemeyen basiller çoğalarak makrofaj bütünlüğünü bozar ve alveoler boşluğu geçerler. Basilin alveoler makrofajlarla karşılaşmasıyla mikobakteriyel komponentler makrofaj yüzeyindeki bazı reseptörler (mannoz reseptörü, çöpçü reseptörler, kompleman reseptörleri, TLR'ler gibi) ile etkileşerek bu hücrelerden enflamatuar sitokinler (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 ve IFN- γ) ve kemokinlerin (IL-8, MCP-1 vb.) salgılanmasına yol açarlar. Böylece diğer makrofajlar, monositler, T lenfositler ve NK (natural killer) hücreler lezyon bölgesine toplanır. Alveoler boşluğa geçen basilleri yeni makrofajlar ve monositler yutsalar da henüz aktive edilmedikleri ve hücrel immün yanıt gelişmediği için basillerin çoğalmalarına engel olamazlar. Bölgeye göç eden monosit ve lenfositler zamanla epitelooid histiyositlere dönüşerek Langerhans dev hücrelerini oluştururlar. Bunların oluşturduğu odağın lenfositler tarafından çevrelenmesiyle "tüberkül" veya "granülom" olarak tanımlanan ilk tüberküloz lezyonu oluşur.

Granülomlar makrofajların ve T lenfositlerin yanı sıra B lenfositleri, dendritik hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastları ve muhtemelen stromal hücreleri de içerir. Granülomlar eliminasyon mekanizmalarından kaçabilen bazı basiller için eşsizdir. Enfeksiyonu kontrol altında tutan granülomlar içerisinde sınırlı sayıdaki basil yaşamını sürdürerek latent tüberküloz enfeksiyonuna (LTBI) sebep olur (24).



Şekil 2.4. Tüberküloz granülomu (18)

Bu evrede konak ve basil tam bir ortak yaşam sergiler, her ikisi de birbirine zarar vermezler. Primer odakta çoğalan basiller bölgesel lenf bezlerinde lenfadenit oluşturur. Böylece lenf bezlerinde granümatöz doku gelişir. Primer odak ve bölgesel lenfadenit "Gohn Kompleksi" (Primer Kompleks) olarak tanımlanır. Basil taşıyan inaktif makrofajlar lenfo-hematojen yolla tüm vücuda yayılarak yeni yerleştikleri odaklarda granülomlar oluştururlar. Bu yayılımla en çok akciğerlerin apeksine (Simon Odağı), böbrek parankimine, uzun kemiklerin epifizine ve vertebralara yerleşirler. Sağlıklı bireylerde vücuda dağılan basillerin oluşturduğu küçük kazeöz odaklar makrofajlar tarafından temizlenmektedir. Büyük kazeöz odaklar ise fibröz bir kapsüle hapsedilerek (tüberküloz) izole edilir (6).

Primer enfeksiyonun ilerlemesi sonucu oluşan hastalık çocuklarda görülen tüberkülozun en sık şekli olup sıklıkla enfeksiyonu takip eden ilk iki yıl içinde gerçekleşmektedir. Yeni doğan ve erken çocukluk çağında (özellikle 1-4 yaş) geçirilen enfeksiyonları takip eden aylar içinde immünitinin zayıf düşmesiyle miliyer tüberküloz ve menenjit tüberküloz gibi ağır tüberküloz şekilleri ortaya çıkabilir. Hastalık bu durumda % 50 kadar öldürücü olabilmektedir. Özellikle menenjit tüberküloza yakalanan olgularda sekel olasılığı % 75'lere kadar çıkabilmektedir (25).

Evre 3: Konakta immün yanıt gelişimi

Basillerin inhalasyonu sonrasında 2-8 hafta içinde artık hem hücresel immünite, hem de gecikmiş tip aşırı duyarlılık gelişir. *M. tuberculosis*'e karşı oluşturulan immün yanıtta T hücreleri (CD4 ve CD8), sitokinler (IFN- γ , IL-12, TNF- α ve IL-6) ve makrofajlar gibi birçok faktör rol oynamaktadır.

Basil yüklü makrofaj TNF- α ve sitokinler (IL-1,6,8,12,15) salar. TNF- α makrofaja otokrin aktivasyon kazandırır. Makrofajların otoindüksiyonu ile nitrik oksit sentetaz enzimi aktive edilir. Antimikobakteriyel etkinlik gösteren nitrik oksit ve diğer

reaktif nitrojen metabolitleri açığa çıkar. Basil içeren makrofajlar basilleri öldürmede çoğunlukla yetersiz kalırlar. Virülan basiller makrofajların bakterisidal etkisinden korunup canlılıklarını sürdürebilmek için fagozom olgunlaşması veya asidifikasyonunu engelleme ve fagolizozomal füzyonu bozma; katalaz peroksidaz, fenolik glikolipidler ve LAM ile serbest radikalleri etkisiz hale getirmek gibi mekanizmalara başvururlar (24).

Ortama salınan IL-1 ve IL-12 ise CD4, CD8 ve γ/δ T-lenfositleri olay yerine çeker. Makrofaj içinde peptit antijenlerine parçalanan mikobakteri proteinleri hücre zarına taşınarak MHC-I (majör histokompatibilite kompleksi) ile CD8 (cluster of differentiation), MHC-II ile CD4 T-lenfositlere sunulur. Mikobakteri peptitlerini tanıyan CD4 T-lenfositlerinin oluşumu yaklaşık iki hafta sürer. Antijen sunumdan sonra, T-lenfositlerden IL-2 serbestleşmesiyle T-lenfosit hem kendisini otokrin uyarır hem de diğer T lenfositlerin olay yerine birikmesi, çoğalması ve aktivasyonunu sağlar. CD4 hücreler T helper tip-1'e (Th1), CD8 ise sitotoksik T-lenfositlere (Tc) farklılaşır. Th1, IL-2 salarak hem kendini hem Tc'yi; IFN- γ salarak da makrofajı aktive eder. Aktive olan Tc hem basil yüklü aktive olmamış makrofajların yıkımından (perforin, granzimB ve FasL) hem de kazeöz nekroz oluşumundan sorumludur.

IFN- γ makrofajların TNF- α salınımını sağlar, fagositoz kapasitelerini ve bakterisidal aktivitelerini artırır, basilin hücre içinde daha etkin bir şekilde yok edilmesini sağlar ve NK hücreleri uyarır. Ayrıca makrofajlardaki 1- α hidroksilaz enzimini uyararak aktif D3 vitaminin yapımını artırır. D3 vitamini basillerin makrofaj içi çoğalmasını önlemeye yardımcıdır ve bu hücrelerden TNF- α gibi sitokinlerin salınımını artırır. TNF- α ise granülom oluşumu ve enfeksiyonun yayılmasının kontrol altına alınması sağlar.

Gecikmiş tip aşırı duyarlılık, aktif makrofajlardan salınan IL-12 ile Tc hücrelerinin stimülasyonu ile gerçekleşir. Tc hücrelerinin basil yüklü makrofajları öldürmesi ile ortama dökülen basiller, solid kazeöz dokuya geçerler ve burada nekroz oluştururlar. Oluşan kazeöz nekroz ortamında, basiller canlılıklarını sürdürmekle beraber anoksik koşullar, düşük pH, toksik yağ asitlerinin varlığı nedeniyle çoğalamazlar. Basillerin bir kısmı ölür, bir kısmı ise yıllarca dormant halde kalırlar. Dormant basiller çok düşük düzeyde metabolik aktiviteye sahiptirler (6).

İmmün sistemi yeterli kişilerde basillerin yok edilmesi ile süreç durdurulursa primer enfeksiyon evresi tamamlanmış olur. LTBI evresi diye de adlandırılan 6-8 haftada gelişen bu evrede konakçının deri testi de pozitifleşir, balgam yayma/kültür negatiftir, semptomsuz gelişir, birey bulaştırıcı değildir. İmmün sistemi baskılanmış

kişilerde ise genişleyen kazeöz nekrozlar akciğerde doku hasarına neden olur ve klinik olarak primer tüberküloz gelişir (1, 3, 6, 22).

Evre 4: Likefaksiyon ve Hızlı Basil Çoğalması, Yeniden Bulaşma

Enfekte kişilerin % 90'ında tüberküloz asemptomatik primer enfeksiyon olarak latent halde kalırken, % 10'unda yaşamlarının herhangi bir döneminde ilk lezyon yerinde ya da basillerin lenfo-hematojen yolla yayıldıkları herhangi bir odakta oluşan erime ve onu takip eden aktivasyonla oluşan hastalık ise postprimer tüberküloz ya da reaktivasyon tüberkülozu olarak tanımlanmaktadır (6). Hastalığın aktif olduğu bu dönemde balgam yayma/kültür ve akciğer grafisi pozitif olup birey bulaştırıcıdır (1, 6).

Primer tüberkülozun ilerlemesi, makrofajlardan salınan hidrolitik enzimlerin protein ve lipitleri hidrolize etmesi ile granülom ortasındaki kazeumun erimesi, likefaksiyon ve kavite oluşumu ile sonuçlanır. Bu materyal basillerin hücre dışında hızlı çoğalması için uygun besiyeri oluşturur. Hücresel immünite yetersizliği durumlarında basillerin kontrolsüz çoğalmasıyla lezyon alanı büyür ve komşu bronşa açılır. Böylece kavite oluşur ve basiller bronşiyal yolla hem diğer akciğer alanlarına hem de akciğer dışı alanlara yayılır. Kavite oluşumu hastalığın akciğere yayılmasına ve bulaştırıcı nitelik kazanmasına neden olur. Kavite içine oksijenin girmesiyle basiller daha hızlı çoğalır.

Hücresel immünitesi yeterli olanlarda ise kazeöz odakta bulunan aktif makrofajlardan salınan hidrolitik enzimler ile granülom sınırlandırılır. Çapı 0.1-1.3 mm olan kazeöz odaklar makrofajlarca temizlenirken 2-8 mm çapında olanlar hidrolitik enzimlerle eritilir ve geride fibröz doku oluşur. Çapı 5-20 mm olanlar ise fibröz kapsülle çevrilerek izole edilir (tüberküloma). Bu lezyonların iyileşme sürecinde kalsifikasyon da gelişebilir. Bu fibrotik odakta tüberküloz basili dormant veya metabolizması durmuş olarak ömür boyu canlılığını sürdürebilmekte ve konağın direnci düşerse, aktif hale geçebilmektedir. Sonuçta primer enfeksiyon adı verilen bu süreç durdurulmakta ve geride tüberkülin deri testinin pozitifleşmesi dışında hiçbir kanıt kalmamaktadır (6).

2.1.5. Bulaşma

Tüberküloz esas olarak insandan insana solunum yolu ile yayılır. En bulaştırıcı tüberküloz şekilleri balgam mikroskopisinde ARB pozitif olan tedavi görmemiş aktif akciğer ve larinks tüberkülozlulardır. Tüberkülozla mücadelenin asıl amacı bulaşı engellemektir (21).

Çeşitli solunum fonksiyonlarının aerosol oluşturma potansiyeli farklıdır. Konuşma sırasında 0-210, öksürme ile 0-3.500 ve hapşırma ile 4.500-1.000.000 partikül oluşur. İçinde 1-3 canlı tüberküloz basili bulunan ve birkaç saat havada asılı halde kalabilen, 1-5 µ büyüklüğündeki damlacık çekirdekleri önemlidir. Ortamda bulunan kişi solunum yolu ile damlacığı alır. Basil ya elimine edilir ya da solunum yolu savunma mekanizmalarından kurtulabilenler alveollere kadar gelir ve latent enfeksiyonu başlatırlar. Kişi bulaştırıcı değildir. Tüberküloz basiliyle enfekte olan kişilerden % 5'i 1-2 yıl içerisinde aktif tüberküloz hastası olur. % 5'i ise ilk 2 yıldan sonra hayatının herhangi bir zamanında aktif tüberküloz hastası olabilir. Böylece yaşam boyu hastalık gelişme riski % 10'dur (6, 22, 26).

Standart ısı ve nemde aerosol tüberküloz basillerinin % 60-71'i üç saat, % 48-66'sı altı saat, % 28-32'si ise dokuz saat canlı kalabilmektedir. Tüberküloz basillerini öldürmede en etkin iki faktör havalandırma ve ultraviyole (UV) ışınlarıdır. Tedavi olmayan dirençli bir hasta da dirençli mikropları bulaştırır. Bulaşma açısından en yüksek risk altında olanlar hasta ile uzun süre ve yakın temasta olan aile bireyleri, akrabaları ve yakın çalışma arkadaşlarıdır (3, 6).

HIV/AIDS, diyabet, kanser, alkolizm, ilaç bağımlılığı, tütün kullanımı, kronik böbrek yetmezliği, uzun süre kortikosteroid kullanımı, düşük vücut ağırlığı (ideal kilodan % 10'dan fazla zayıf olunması) enfekte kişilerin aktif tüberküloz hastası olma olasılığını artıran risk faktörlerindedir. Doğru ve etkili tedavi başlandıktan sonra, hastanın bulaştırıcılığı 2-3 haftada sona erer.

HIV, tüberküloz hastalığının gelişmesine yol açan bilinen en güçlü etken olup hastalığın epidemiyolojisinde üç farklı değişikliğe yol açabilmektedir. HIV ile enfekte kişilerde daha önceden var olan latent tüberküloz enfeksiyonunun reaktivasyon riski, yeni enfeksiyonun hastalığa dönüşme riski ve HIV nedeniyle tüberküloz gelişmiş kişilerden topluma tüberküloz bulaşma riski artmaktadır. HIV enfeksiyonu CD4 T lenfosit sayısı ve fonksiyonlarını azaltır. Hastanın immün sistemi tüberküloz basilinin üreme ve yayılmasını engelleyemez. İlerlemiş HIV'de immüntenin zayıflamasıyla, akciğer dışı tüberküloz ve miliyer tüberküloz olasılığı artmaktadır (3, 21, 26).

Hastanın balgamındaki basil sayısı, basilin canlılığı ve virülansı bulaşmayı etkiler. Hedef kişinin hastalığa veya basile dirençliliği, basil kaynağı ile birlikte geçirilen süre, hastalanmayı artıran durum ve hastalıklar tüberküloz basilinin bulaşmasını etkileyen faktörler arasındadır (6).

2.2. Tüberkülozun Tanısı

Mikobakteri türleri farklı virülans ve antibiyotik duyarlılık profili gösterdiklerinden, MTBC ve TDM içerisinde yer alan türlerin doğru ve hızlı biçimde tanımlanması hastalığın kontrolü ve tedavinin başarısı açısından son derece önemlidir. Tanı testleri hızlı, duyarlı, özgül, tekrarlanabilir, güvenilir, basit, prediktif değeri yüksek, maliyeti ucuz ve yaygın kullanılabilmesi için tanı değeri yüksek olmalı ve kolay uygulanabilirlik özelliklerini taşımaktadır (3, 28).

Hastanın değerlendirilmesi kapsamlı bir süreç gerektirir. Hastanın anamnezi, fizik bulguları, akciğer filmi ile eğer tüberkülozdan şüphelenilirse gerekli bakteriyolojik, histolojik incelemeler yapılır. Akciğer tüberkülozunun kesin tanısı bakteriyolojik olup en geçerli tanı yöntemi balgam yaymasıdır (29).

İki hafta ya da daha uzun süren öksürük, balgam, kanlı balgam, göğüs veya sırt ağrısı, nefes darlığı, ses kısıklığı, halsizlik, çabuk yorulma, iştahsızlık, kilo kaybı, ateş, gece terlemesi bulgularından bir ya da birkaçı bulunan kişilerde akciğer tüberkülozundan şüphelenilmelidir. Hasta verem savaşı dispanseri (VSD) ya da göğüs hastalıkları polikliniğine sevk edilmelidir. Ülkemizde hastalığın tanısı, tedavisi, ilaçlar ve takip ücretsizdir (1).

Tüberkülozdan şüphelenilen hastanın HIV enfeksiyonu, silikozis, diabetes mellitus, kronik böbrek yetmezliği, lösemi gibi tüberküloz hastalık riskini artıran bir sağlık sorununun olup olmadığı da sorgulanmalıdır (29).

Bir enfeksiyon hastalığı olan tüberkülozun tanısı bakteriyolojiktir. Tüberküloz şüpheli hastalardan usulüne uygun üç balgam örneği alınır. Akciğer, plevra, larinks ve miliyer tüberküloz olgularında 3 balgam tetkiki (yayma ve kültür) yapılması önerilir. En uygun balgam örneği üç gün üst üste sabah alınan ilk balgam örneğidir (29).

2.2.1. Mikroskopi

Hastalığın tanısında ve tedavi alan hastaların izleminde tüm dünyada yaygın olarak kullanılan hızlı, ucuz ve kolay bir yöntemdir. Yöntemin özgüllüğü yüksek olmasına karşın (>% 90) duyarlılığı; örneğin türü ve kalitesine, içerdiği bakteri miktarına (mililitrede 5.000-10.000 bakteri), uygulanan tekniğe, uygulama ve değerlendirme yapan personelin deneyimine bağlı olarak (% 20-85) değişmektedir. Bu duyarlılık, çocuklarda % 15-20 oranlarındadır. Tüberküloz şüphesi ile gelen tüm örneklere, mikroskopinin duyarlılığının düşük olması ve ilaç duyarlılık testi

yapılabilmesi için mutlaka kültür işlemi uygulanmalıdır. Bu nedenle tanıda altın standart, kültür ve klinik tanı birlikteliğidir (6, 30, 31).

ARB boyanma özelliği mikolik asit yapısının hasarlanması ile değişiklik göstermektedir. Basilin asit sabitliği; hücrenin travma veya otolize uğraması, özgül mikobakteriyofajlar ile enfekte olmak veya izoniyazid gibi hücre duvarı sentezine yönelik antibiyotikler ile tedavi sonucu zarar görür. Farklı kültür koşullarında yapılan boyamalardaki farklılıklar, basilin asit sabitliğinin besin maddeleri ve oksijen basıncı ile ilişkili olduğu izlenimi vermektedir. Dormant basil hücre duvar yapısındaki değişiklikler nedeniyle EZN ile saptanamayabilir (5).

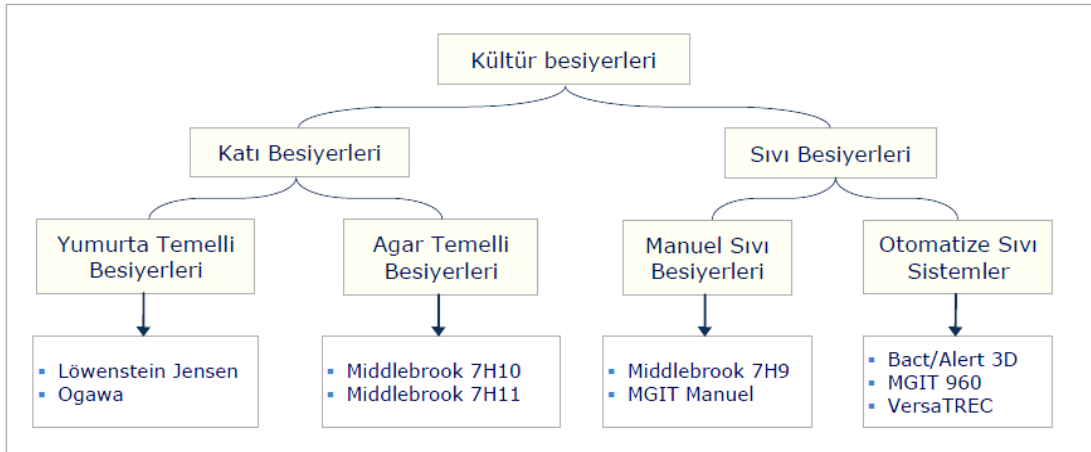
Mikobakterilerin mikroskopik tanısında karbol fuksin (EZN, kinyoun) ve floresan (auramin O, auramin-rhodamin) boyama yöntemleri kullanılır. Aside dirençli organizmalar karbol fuksin boyalarla mavi zeminde kırmızı, florokrom boyalarla ise sarı-portakal renkte floresan verir şekilde görülür (3, 30).

EZN boyama yöntemi ile *M. tuberculosis* ve TDM, canlı/ölü ve duyarlı/dirençli basil ayırmaları yapılamaz. Negatif sonuç hastanın tüberküloz olmadığını göstermez. Florokrom boyama yöntemi için floresan mikroskop gereklidir. Boyamada kullanılan florokrom boyalar kanserojen özelliktedir ve boya solduğu için kısa sürede değerlendirilmelidir. Hazırlanışı sırasında solunmamalı, boyama sırasında cilde temas etmemelidir. Florokrom boyama ile duyarlılık artmakta ve tarama için gerekli zaman daha kısalmaktadır. Pozitif yayma sonuçları (ARB pozitif) derecelendirilerek raporlanmalı ve en geç 24 saat içinde İl Halk Sağlığı Müdürlüklerine bildirilmelidir. Florokrom yöntemi ile saptanan pozitiflikler yalancı pozitif olasılığı yüzünden EZN yöntemi ile teyit edilmelidir. Yayma pozitif hastalar toplum ve yakın çevreleri için önemli enfeksiyon kaynaklarıdır (3, 6, 30).

2.2.2. Kültür

Tüberkülozun tanısında altın standart olan kültür yöntemleri; tüberküloz basillerinin üremesine, tanımlanmasına, ilaç duyarlılık testleri ve epidemiyolojik çalışmaların yapılmasına olanak sağlar. Duyarlılığı % 80-85, özgüllüğü yaklaşık % 98 olan konvansiyonel bir yöntemdir. Hasta örneklerinin mililitresinde 10-100 canlı basilin olması üreme için gereklidir. *M. tuberculosis*'in bölünme süresi 18-24 saate kadar sürdüğü için kültürde üremenin değerlendirmesi 2-8 haftaya kadar uzayabilmektedir. *M. tuberculosis* genel üretim besiyerlerinde üretilemez; özgün besiyerlerine ihtiyaç duyulur (30, 31).

Tablo 2.1. MTBC kültürü için kullanılan besiyerleri (30)



Kültür yöntemlerinin duyarlılığı mikroskopiden yüksektir ancak sonuçlar geç çıkmaktadır. Mikobakterilerin koloni morfolojileri ve pigmentasyonu sadece katı besiyerlerinde görülebilir. Sıvı besiyerleri katı besiyerlerine göre kontaminasyona daha açıktır. Mikobakteri izolasyon oranlarını artırmak amacıyla Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) en az bir sıvı, bir de katı besiyerinin birlikte kullanılmasını önermektedir. Sıvı besiyerlerine üretme özelliği kazandırmak için oleik asit albümin dekstroz katalaz (OADC) ilave edilmelidir (3, 30).

2.2.3. Tür Tayini

MTBC'nin tanımlanması ile uygun tedavi belirlenir. Kültürde üremiş izolatların MTBC-TDM olarak ayırımında üreme özellikleri ve biyokimyasal testler kullanılmakla birlikte, son yıllarda hızlı ve güvenilir genotipik ve immünokromatografik yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır.

MTBC-TDM ayırımı için kullanılmakta olan yöntemler:

-Fenotipik Yöntemler

- Üreme Özellikleri
- Biyokimyasal testler
- HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

- Genotipik yöntemler

- PZR restriksiyon enzim analizi (PZR-RFLP)
- Ters hibridizasyon testleri

-İmmünokromatografik yöntemler

Fenotipik yöntemler zahmetli ve zaman alıcıdır, taze kültür ve pasaj gerekir, özellikle TDM ayırımında kesin sonuç vermeyebilir ve biyolojik risk düzeyi yüksektir. Genotipik yöntemler ise hızlı ve güvenilir olmasına rağmen maliyetlidir, ekipman ve deneyimli personel gerektirir (3, 30).

Niasin testi, nitrat redüksiyon testi, katalaz testi ve pirazinamidaz testi biyokimyasal testlerdendir. Test ısıya stabil ve semikantitatif katalaz testi olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır (3).

Isıya stabil katalaz testi

Katalaz enzimi hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırır. Oksijen oluşumu ile hava kabarcıkları ortaya çıkar. Katalaz enziminin bazı formları 68 °C'de 20 dakika ısı uygulanmasıyla inaktive olur. Çok az kabarcık oluşması bile pozitif olarak yorumlanır. Test bazı mikobakteri türlerinin ayırımında değerli bir tanı yöntemi olarak geçerliliğini sürdürmektedir (32, 33).

Semikantitatif katalaz testi

Oluşan kabarcıkların yüksekliğine göre değerlendirme yapılır. *M. kansasii*, hızlı üreyen mikobakteriler ve sıklıkla izole edilen sitokromojenler 45 mm'den yüksek kabarcık oluşturarak güçlü katalaz reaksiyonu verirler. 45 mm altında *M. tuberculosis* ve MAC zayıf katalaz reaksiyonu verir. Kabarcık oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilir (32, 33).

Klinik ve radyolojik tanıyı desteklemek amacıyla tüberküloz şüpheli hasta örneklerinde MTBC varlığının hızlı saptanmasında nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT) de kullanılabilir. Örnekteki basilin homojen dağılmaması, nükleik asit yetersizliği veya örneğin kontamine olması gibi ortamda çoğalmayı engelleyen faktörler yalancı negatifliğe neden olarak testin duyarlılığını düşürmektedir (30).

2.2.4. Moleküler Tanı

Mikobakterilerin klinik örnekten tanısında, tür düzeyinde tanımlanmasında, ilaç direncinin belirlenmesinde ve epidemiyolojik araştırmalarda moleküler yöntemlerin kullanımı son yıllarda artmıştır. Ancak NAAT mutlaka altın standart olan kültür yöntemleri ile birlikte kullanılmalı ve sonuçları doğrulanmalıdır (3).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR; bakteri, virüs, mantar, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin spesifik komplementer oligonükleotitler ve ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri kullanılarak in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan basit

ama oldukça özgün, başarılı ve güvenilir moleküler biyolojik bir tekniktir. Hızlı sonuç vermesi, konvansiyonel yöntemlerle saptanması zor ya da imkansız mikroorganizmaları saptayabilmesi, tekrarlanabilir ve güvenilir olması, yüksek duyarlılığı nedeniyle önemli bir tanısal yöntemdir. Kısa süre içerisinde çok küçük bir miktar DNA baz dizisinden milyonlarca defa DNA parçacığı çoğaltmak mümkündür (34).

PZR yöntemi birkaç farklı ısı ve bir termostabil DNA polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilir. Nükleik asidi DNA olan mikroorganizmanın nükleik asit ekstraksiyonunu müteakip doğrudan PZR uygulanabilir. RNA olanlar için önce ters transkripsiyon basamağıyla komplementer zincirli DNA (cDNA) sentezi gerekir. Her bir PZR döngüsü sonrasında DNA kopyaları ikiye katlanır; teorik olarak “n” sayıda döngü ile reaksiyon başlangıcında mevcut olan DNA moleküllerinin her birinin 2^n sayıda kopyası sentezlenir. Gerçekte 30-45 döngü sonra hedefin milyarlarca kopyası elde edilir, reaksiyon doyumuna ulaşır ve bir plato çizer (34).

Escherichia coli’ den DNA polimeraz enziminin kullanılmasının dezavantajı, PZR reaksiyonunda kullanılan yüksek ısılarla denatüre olması ve bu sebeple her PZR siklusu sonucunda taze enzimin yeniden ilave edilmesi zorunluluğuydu. Bu problem termofilik bir bakteri olan, ısıya karşı çok dayanıklı *Thermus aquaticus*’ tan enzimin eldesiyle ortadan kalkmıştır. Bu enzimin geliştirilmesi aynı zamanda otomatik ısı ve zaman ayarlı PZR cihazının geliştirilmesine de imkan tanımıştır. Enzimin 9000 bp’ de 1 baz hata payı vardır. En iyi aktiviteyi 75-80 °C de gösterir ve düşük sıcaklıklarda aktivitesi azalır. Taq DNA polimerazın 5’ → 3’ ekzonükleaz aktivitesi çıkarılmıştır (3, 34).

PZR için hedef bölgeyi içeren DNA, sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz, dört farklı dNTP, tampon ve MgCl₂ (primer bağlanması), iki tane tek zincirli DNA molekülü gereklidir, üç aşamada gerçekleşir (34).

DNA zincirinin açılması (denatürasyon)

Kalıp DNA (template DNA), 92-95 °C’de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. İn vivo DNA replikasyonundaki helikaz gibi iş yapar. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir. PZR basamakları için kullanılan bu dereceler ve süreler çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir. Hedef DNA’nın Guanin ve Sitozin bakımından zengin olduğu durumlarda denatürasyon için 95 °C’den daha yüksek bir ısı uygulanabilir.

Bağlanma (annealing)

Reaksiyon sıcaklığının, 52-60 °C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Hidrojen bağlarının yardımıyla olur. İşlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir.

Uzama (extension)

DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polimeraz) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Bütün DNA molekülleri reaksiyonun sonunda çift sarmallı olarak bulunur. Taq DNA polimeraz 72 °C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır. 3' yönüne dNTP ekleyerek hedef DNA zincirinden DNA polimeraz ile yeni zincir üretilir, böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir.

PZR ile amplifiye edilmiş ürünlerin saptanmasında en yaygın kullanılan metot, bu ürünlerin uygun moleküler ağırlıkta bir marker ile birlikte etidyum bromür ile boyalı agaroz jel üzerine yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutmak ve neticede ayrılan bandları UV transimülatör ile görüntülemektir. DNA negatif yüklüdür, anoda doğru hareket eder, yükleme katod tarafına yapılmalıdır.

Moleküler biyoloji ve biyomedikal araştırmalarda, bakteriyel, viral, fungal ve protozoal hastalık etkenlerinin teşhisinde, su ve yiyeceklerde bulunan mikroorganizmaların tanısında, genetik bozukluklar ve kanser taramalarında, kalıtsal hastalıkların doğum öncesi tanısında ve cinsiyet belirlenmesinde, adli tıpta suçlu teşhisinde ve daha pek çok alanda PZR kullanılmaktadır (3, 33-35).

2.2.5. İlaç Duyarlılık Testleri (İDT)

Tüberkülozda etkenin kısa sürede tanınması ve ilaç direncinin belirlenmesi ve ilaçların uygun dozlarda kullanılması önem kazanmıştır. Antitüberküloz ilaçlara karşı direnç gelişimini saptamak için *M. tuberculosis* kökenlerinin antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesinde DSÖ tarafından sıvı (7H12 besiyeri kullanılan ticari sistemler) ve katı (proporsiyon yöntemi) bazlı yöntemler önerilmektedir (36).

Agar proporsiyon yöntemi

Proporsiyon yöntemi belli bir ilaç konsantrasyonunda (kritik konsantrasyon) dirençli olan organizmaların oranının belirlenmesine yol açar. Test edilecek bakteri suşu ilaçlı ve ilaçsız katı besiyerlerine inkübe edilir. İlaçlı ve ilaçsız besiyerlerindeki kolonilerin sayısı karşılaştırılır. Belli bir ilaca dirençli basillerin oranı hesaplanıp, test

edilen popülasyona yüzdesi olarak belirtilir. Bu oran %1'e (Kritik Proporsiyon) eşit ya da yüksek ise test edilen suş o ilaca karşı dirençli, az ise duyarlı olarak değerlendirilir. CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), katı besiyeri olarak MD7H10 besiyerinin kullanıldığı agar proporsiyon yöntemini referans yöntem olarak kabul etmektedir.

Agar proporsiyon yönteminin en büyük avantajı farklı konsantrasyonlarda ve minör ilaçlar için uygulanabilir olması ayrıca ticari sistemlere göre ucuzluğudur. Çoklu ilaç direnci gözlenen suşlarda yüksek konsantrasyonlarda duyarlılığın belirlenebilmesi, hastaya alternatif tedavi şansı sağlamaktadır. Ancak ticari sistemlere göre daha uzun sürede sonuç alınması, ilaç konsantrasyonlarının besiyeri hazırlanması sırasında değişebilmesi ve inkübasyonun uzunluğundan ilaç aktivitesinin etkilenmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (30, 32, 33).

Kültürde *M. tuberculosis* izolatının TDM ile karışık olması yanlış dirençli sonuçların çıkmasına yol açabilir. Daha hızlı sonuç vermesine rağmen, kontaminasyon riskinin yüksek olmasından dolayı kültüre dayalı testlerin direkt klinik örnekten çalışılması (direkt test) önerilmez (30).

Yeni ÇİD-TB olgularının önüne geçilebilmesi için tüberküloz ve dirençli tüberküloz olgularının erken ve doğru tanısı son derece önemlidir. Ancak, geleneksel yöntemler hastalığın tanısında köşe taşı olarak kalmalıdır. Mevcut durumda moleküler testler, mikroskopiyi takiben kullanılacak testler olarak kullanılmalıdır (37).

2.3. Tüberkülozun Tedavisi ve Direnç Sorunu

Tüberküloz tedavi edilebilir ve önlenebilir bir enfeksiyon hastalığıdır. Çoklu ilaca dirençli suşların giderek artması ve yaygınlaşması, HIV ile ko-infeksiyon gibi faktörlere ilave olarak; tüberkülozun uzun süreli, kombine, kompleks, pahalı bir tedavi rejimini gerektirmesi ve bu tedaviye yeterli hasta uyumunun sağlanamaması hastalığın kontrolünü giderek zorlaştırmaktadır (33).

M. tuberculosis'de ilaç direnci her antibiyotik için farklı sıklıkta olmak üzere spontan kromozomal mutasyonlar sonucunda gerçekleşir ve bağımsız bir gende meydana gelen mutasyonlara bağlıdır. Genetik çalışmalar antitüberküloz ilaçlara direncin; ilacın hedef bölgesini ya da aktivasyonunda rol alan enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlarla ortaya çıktığını göstermiştir (38).

Primer direnç basilin alındığı kaynağa ait olan dirençtir. Tüberküloz kontrol programlarının etkin uygulandığı ülkelerde antitüberküloz ilaçlara primer direnç oranı

% 5'in altında, etkin bir kontrol programının bulunmadığı ülkelerde ise % 15 ve üzerindedir (3, 38).

Başlangıçta duyarlı olan basillerle enfekte olan tüberküloz hastasında kötü tedavi, kötü tüberküloz programı ya da tedaviye uyumsuzluğa bağlı olarak dirençli mutantların artması sonucunda duyarlı mikroorganizmalar baskılanmakta ve ilaca dirençli kökenler seçilerek bakteri topluluğu içinde baskın duruma geçmektedirler. Tedavi sırasında gelişen bu dirence “kazanılmış direnç” ya da “sekonder ilaç direnci” denmektedir. Yani, tüberkülozda ilaç direnci sorunu insan ürünüdür. Dirençli tüberküloz hastalarında daha uzun süreli, daha çok yan etkisi olan ve daha pahalı bir tedaviye gerek duyulmaktadır. Dirençli hastada düzensiz ve kötü tedavi sonucunda “tedavi edilemez” hastalar ortaya çıkmaktadır. Toplumda kendi basillerini yaymayı sürdürmeleri nedeniyle toplum için büyük bir tehdit oluştururlar (39, 40).

Tüberküloz tedavisinin başlıca hedefleri balgam kültürlerini en kısa sürede negatifleştirmek, hasta bireylerde kür sağlamak ve nüksleri önlemek, *M. tuberculosis* basilinin sağlıklı bireylere yayılımını düşürebilmek, ilaca dirençli olguların ortaya çıkmasına engel olmak ve ölümleri önlemektir (6).

Standart tüberküloz tedavisinin üçüncü ayında ARB yayma pozitifliği devam edenler, tedaviye rağmen hastalığı klinik ve radyolojik olarak progresyon gösterenler, dirençli tüberküloz hastaları ile temas öyküsü olanlar, relaps gelişen ve tedaviyi tamamlamayan olgular, hastane personeli, HIV pozitif olgular, ÇİD-TB oranları yüksek olan toplumlarda yaşayanlar ve malabsorbsiyon gibi ko-morbid hastalıkları olan olgular çok ilaca dirençli olma yönünden yüksek risk taşımaktadırlar. Kaynakları sınırlı olan ülkelerde duyarlılık testlerinin ancak ÇİD-TB riski yüksek olan hastalarda yapılması önerilmektedir (41).

Bir tüberküloz basil topluluğunda ilaç kullanımından bağımsız olarak her ilaca karşı dirençli mutant basiller bulunmaktadır. Böyle bir basil topluluğuna tek ilaçla tedavi uygulandığında çoğunluğu oluşturan duyarlı basilleri ölecek, ancak sayıca az olan dirençli mutant basiller, yaşamaya ve çoğalmaya devam edecek ve ortama egemen olacaklardır. Akciğer tüberkülozunda monoterapi uygulanması ile verilen ilaca hassas bakteriler yok olurken, dirençli olanların egemen olduğu bir süreçle ilaç direncinin ortaya çıkmasına “Düşüş Yükseliş Fenomeni” denir. Dirençli mutant basillerin varlığı, düşüş yükseliş olayının gelişmesine ve tedavi başarısızlığı anında direnç oluşmasına neden olacaktır. Tüberküloz tedavisi kombine olmak zorundadır (42).

Tedavi ve Direnç ile İlgili Kavramlar

Vahşi tip köken: Hiçbir antibakteriyel ilaçla karşılaşmamış *M. tuberculosis* kökeninidir.

İlacı dirençli olgu: En az bir tüberküloz ilacına dirençli basille hastalanmış olgu demektir.

Yeni olgularda ilaç direnci (primer ilaç direnci): Yeni olguda, yani daha önce tüberküloz ilacı kullanmamış ya da bir aydan daha kısa süre kullanmış hastada görülen dirençtir.

Tedavi almış olgularda ilaç direnci (edinsel yada sekonder ilaç direnci): Hastanın daha önce bir aydan uzun süre kullanmış olduğu ilaca karşı saptanan dirençtir. Tedaviden önce duyarlılık testi yapılmamış ise, bu ilaç direncinin en baştan mı var olduğu, yoksa tedavi sırasında mı geliştiği bilinemez.

Çok ilaca direnç (ÇİD) (multi drug resistance: MDR): Hem izoniyazid hem de rifampisin direnci olmasıdır. Birlikte başka ilaç direnci de olabilir.

Yaygın ilaç direnci (YİD) (extensive drug resistance: XDR): ÇİD'e ek olarak, bir kinolona ve bir parenteral ilaca (kapreomisin, kanamisin, amikasin) direnç olmasıdır. Birlikte başka ilaç direnci de olabilir.

Kür: Başlangıçta balgam yayması pozitif hastada, klinik ve radyolojik iyileşmeyle birlikte birisi tedavinin idame döneminde diğeri tedavinin tamamlandığı sırada olmak üzere en az iki kez balgam yayması negatifliğinin gösterilmesidir. Kür tanımı sadece yayma pozitif hastalar için kullanılır.

Tedaviyi tamamlama: Öngörülen tedaviyi süresi içinde tamamlayan olguda tedavinin idame dönemi ya da sonunda balgam incelemesi yapılmadığı durumlarda, klinik ve radyolojik bulguları ile başarılı kabul edilerek tedavinin sonlandırılmasıdır. Akciğer dışı tüberküloz olgularında tedavi sonucu başarılı ise bu gruba eklenir.

Tedavi başarısı: Kür ve tedaviyi tamamlamanın toplamıdır.

Tedavi başarısızlığı: Tedavisinin 5. ayı ve sonrasında hastanın balgam yayma pozitifliğinin saptanmasıdır. Pozitiflik ya tedavi süresince devam edebilir ya da negatifleşir ve yeniden pozitifleşebilir.

Tedaviyi terk: Tedavisi sırasında tüberküloz hastasının iki ay ya da daha uzun süre ile ilaçlarını almamasıdır (26, 29).

Tüberküloz tedavisi için kısa süreli standart tedavi rejimlerinin seçilmesi, ilaçların doğrudan gözetimli tedavi ile düzenli ve yeterli süre kullanımı tüberkülozun

tedavi ilkeleridir. Tedavi başlangıcında basil sayısı en üst düzeyde olduğundan dirençli mutant suşların ortaya çıkma olasılığı en yüksektir.

Anti tüberküloz ilaçlar iki gruba ayrılır.

Birinci seçenek (majör) antitüberküloz ilaçlar: İzonyazid (İNH/H), rifampisin (RMP/R), etambutol (EMB/E), pirazinamid (PZA/Z), streptomisin (SM/S)

İkinci seçenek (minör) antitüberküloz ilaçlar: Kanamisin, amikasin, kapreomisin, fluorokinolonlar (ofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin), etiyonamid, protiyonamid, sikloserin, terizidon, p-aminosalisilik asit (PAS), sodyum PAS, tiyoasetazon, klofazimin, linezolid, amoksisilin/klavulonat, tiyoasetazon, imipenem/cilastatin, yüksek doz izonyazid, klaritromisin.

Tablo 2.2. TB olgu tanımlarına göre erişkin hastalar için önerilen tedavi şeması (29)

OLGU TANIMI	BAŞLANGIÇ DÖNEMİ	İDAME DÖNEMİ
Yeni olgu	2 ay HRZE	4 ay HR
Tedaviyi terkten dönen olgu, Nüks olgu	2 ay HRZES 1 ay HRZE	5 ay HRE
Tedavisi başarısız olgu, Kronik olgu	Dirençli tüberküloz tedavisi yapan bir merkezde ikinci seçenek ilaçlarla tedavi edilir	

Tedavi rejimleri başlangıç ve idame dönemi olmak üzere iki dönemlidir. Başlangıç dönemi hızlı çoğalan basillerin temizlendiği dönem olup dört ilaç (nüks ve tedaviyi terkten dönenlerde 5 ilaç) kullanılır. Bakterisidal aktivite ve direnç gelişimini önleyici aktivite vardır. Genellikle yeni olgularda 2 ay, nüks ve terkten dönen olgularda 3 ay sürer. Bu dönemde tedavi bırakılırsa, tedavi başarısızlığı olabilir ve ilaç direnci gelişme olasılığı yüksektir.

İdame döneminde ise sterilizasyon gerçekleştirilir. Yani, zaman zaman aktivasyon gösteren, aralıklı çoğalan basiller ortadan kaldırılır. Yeni olgularda genellikle 4 ay sürer. Nüks ve terkten dönen olgularda ise 5 ay sürer. Bu dönemde tedavi terkedilirse, nüks görülebilir ve genellikle basil ilaçlara duyarlıdır (26, 29).

2.3.1. İzoniyazid (INH/H)

İzoniyazid, izonikotinic asitin hidrazididir. En yaygın olarak kullanılan, en güçlü antitüberküloz ilaçtır. Meyer ve Mally tarafından 1912 sentezlenmiş olmasına rağmen antitüberküloz etkinliği ancak bundan 40 yıl sonra (1952) ispatlanabilmiştir. O zamandan beri de tüberkülozun önlenmesi ve tedavisinde etkili olan tüm tedavi rejimlerinin temel ilacıdır (3, 6).

Makrofajlar ve kazeöz lezyonlar içine girebilmesi, iyi absorbe edilmesi, toksisitesinin düşük biyoyaralanımının yüksek olması ve ucuz olması bu ilacı en önemli antitüberküloz ilaç yapar. İzoniyazid, *Mycobacterium tuberculosis*'ten başka bakteriler üzerinde antibakteriyel etki yapmaz. Bu nedenle çok dar spektrumlu bir ilaçtır. (3, 43, 44)

Klinik dozlarla oluşan konsantrasyonlarda basiller üzerinde bakteriyostatik etki yapar. İzoniyazid mikobakterilerde yüksek derecede morfolojik değişiklikler oluşumuna yol açar. Basil izoniyazide yüksek duyarlılık gösterir ve aktif çoğalan basiller üzerine çok etkili iken durağan fazdaki bakterilere bin kat daha az etkilidir, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) 0,02-0,2 mg/l (7H9/7H10)' dir (3, 43, 45, 46).

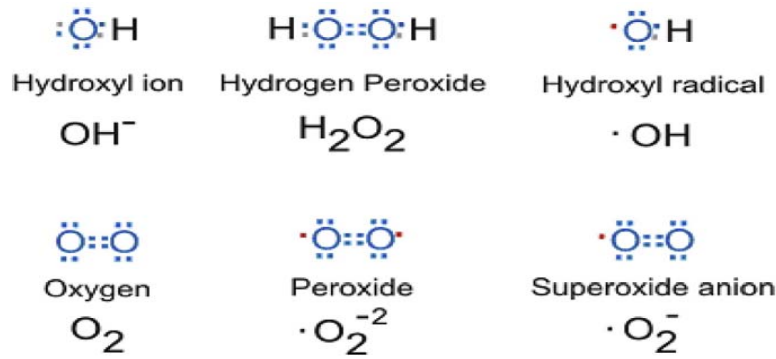
2.3.1.1. Etki Mekanizması

İzoniyazid, bir piridin halkası ve hidrazid grubundan oluşan basit kimyasal yapısına rağmen oldukça karmaşık bir etki mekanizmasına sahiptir. İzoniyazid bir ön ilaç olup aktif hale gelmesi için *M. tuberculosis* KatG geni gereklidir, pasif difüzyonla basile giren izoniyazidin aktivasyonu ile çoklu hedeflere saldıran bir dizi yüksek reaktif türler oluşur. Bunlar reaktif oksijen ara türlerinden (ROT) olan süperoksit, peroksit, hidroksil radikali ile nitrit oksit ve izonikotinic asit radikali veya anyonu gibi reaktif organik ara ürünlerdir. Bu radikaller ile başta mikolik asit olmak üzere DNA, karbohidratlar, lipitler ve DNA metabolizması hedeflenir (43-50).

Serbest radikaller, orbitallerinde paylaşılmamış elektron bulunan oldukça reaktif ve toksik bileşiklerdir. Diğer moleküllerle birleşerek dış yörüngelerindeki elektron sayısını eşleştirmeye böylece kararlı hale dönüşmeye çalışırlar. Katalaz enzimi hidrojen peroksitin hiçbir konsantrasyonu ile doyumluğa ulaştırılamayan tek enzimdir. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ile oluşan H₂O₂'nin büyük bir kısmı katG tarafından H₂O₂ ve O₂'ye dönüştürülür. Glutatyon peroksidazın (GSH-Px) hidrojen peroksit dışındaki peroksitleri de detoksifiye edebilir. Oksidatif stres, ROT ile

antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması ile gelişir. Şiddetli olması hücre hasarlarına ve ölümlere bile yol açabilmektedir (51).

İzoniyazidin oksidasyon ve aktivasyonunda peroksidatik proseslerin önemli rolü vardır. İzoniyazid, NADH ve katG varlığında peroksidatik reaksiyonların aktivasyonu için ortama düşük seviyede ve yavaş akılı hidrojen peroksit ilavesi ile NADH'ın moleküler oksijeni süperoksite indirgelediği gösterilmiştir. Süperoksit oluşumu reaksiyonun hız kısıtlayıcı basamağında olmayıp INH-NAD bileşiğinin sentezi için gereklidir. Süperoksitin peroksidatik sürecin başlaması ve doyurulmasında izoniyazidin izonikotinoil anyonuna bölünmesini hızlandırıcı ve son ürün olan IN-NAD⁺ redüksiyonuna neden olan iki ana rolü bulunmaktadır (48).



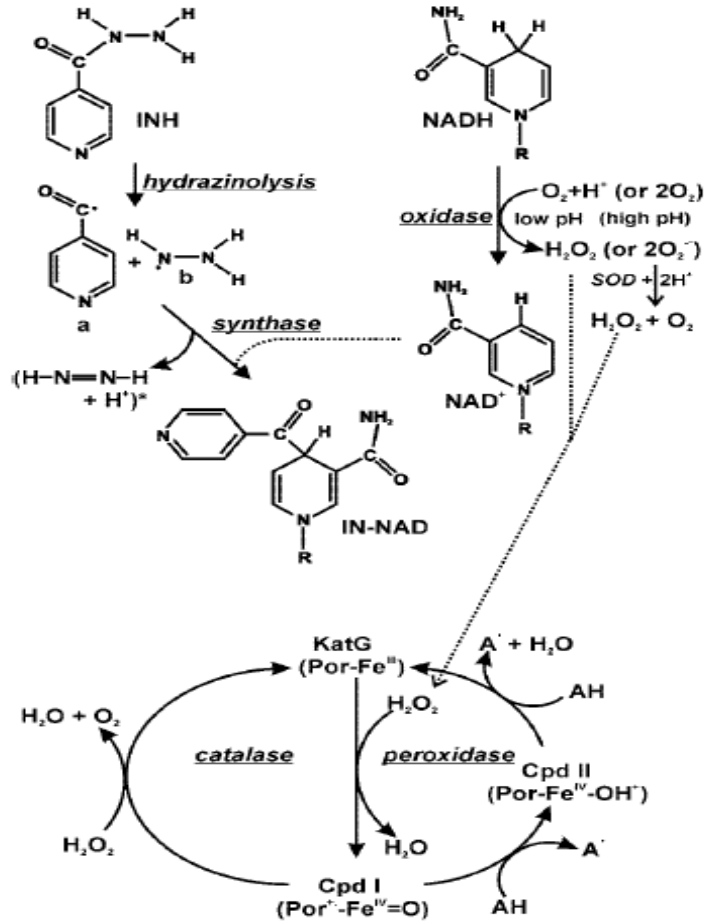
Şekil 2.5. Reaktif oksijen türleri (ROT) (52)

İzoniyazid aktivasyonu ile oluşan NO. serbest radikalinin antimikrobiyal etkisine karşı mikobakteri NO. süpürücü etki ile kendisini korur (12). Ancak farklı antibiyotiklerin kullanımı ile de ortaya çıkan NO.'in artan yıkıcı etkisi bakteri tarafından kontrol edilemez bir hal alır. İzoniyazidin antibakteriyel etki mekanizmalarından sorumlu olan tüm bu serbest radikaller arası sinerjidir (53).

KatG bağımlı izoniyazid aktivasyonu ile oluşan izonikotininik asit radikali NADH ile okside olarak INH-NADH kovalent bağlı bileşiğini oluşturur. Ortamdaki NADH/NAD oranı bakterinin yaşayabilirliğini sürdürmesi açısından son derece önemlidir ve mikobakterinin izoniyazide duyarlılığını da etkiler. Ortamdaki NAD'ın azalması izoniyazid direncine neden olur. Oksidatif fosforilasyonda NADH dehidrogenaz enzimi, NADH oksidasyonu ile NAD oluşturur. Basilde tip I ve tip II NADH dehidrogenaz olmak üzere iki çeşittir (53, 55).

Mikobakteriler çok yüksek hücre yüzey hidrofobisitelemeleri nedeniyle makrofajlar tarafından kolayca fagositoza uğrarlar. Patojenik mikobakteriler fakültatif hücre içi

bakteri olup makrofaj fagolizozomların içinde uzun süre hayatiyetlerini sürdürüp çoğalma yeteneğine sahiptirler. Bunu fagozom-lizozom birleşmesini inhibe ederek fagozom içindeki pH'ı düşürerek gerçekleştirirler. Mikobakterinin sahip olduğu katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri virülans faktörlerindedir. Bunlar toksik oksijen radikallerini inaktive ederek bakterinin hayatta kalmasını sağlar (56).



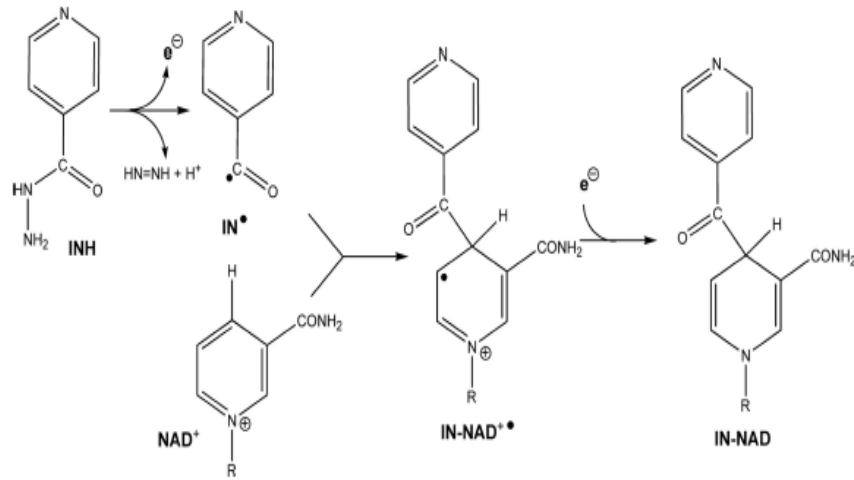
Şekil 2.6. *M. tuberculosis* katG'sinin aktiviteleri (54)

SOD enzimi son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit radikalini, moleküler oksijene ve daha zayıf etkili H₂O₂'ye katalizler. H₂O₂ ise katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz ile su ve oksijene dönüştürülür. Basilin çoğalma sürecinin başında güçlü bir süperoksit radikal süpürücü olan SOD ortamda bolca bulunur. Makrofaj içinde oksidatif stres ürünü olan reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerine karşı mücadelede önemli rol oynar. SOD ortamda yokken veya yetersizken

konağın doğal immünitesi başlar. *M. tuberculosis*'in iki SOD enzimi vardır. Bunlardan SodA demiri, SodC ise bakır ve çinkoyu kofaktör olarak kullanır (56, 57).

M. tuberculosis'in virülansı hidrojen peroksid direncine bağlıdır. Düşük virülanslı izolatların yüksek virülanslılarla karşılaştırıldığında H_2O_2 'ye daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle oksidatif strese karşı korunmada diğer enzimlerinde rolü olduğu düşünülmektedir (56).

Aktif izoniyazid inhA geni tarafından kodlanan ve mikobakteriyal tip II yağ asit (FAS II) biyosentezi yolağında yer alan NADH bağımlı enoil açil taşıyıcı protein redüktaz enziminin (inhA) yavaş ve sıkı bağlanan başlangıç inhibitörüdür. Enzim inhibisyonu ile bakteri için esansiyel olan mikolik asit biyosentezi bozular (43, 45). Böylece hücre duvarı inşasında prekürsör olarak davranan çok uzun zincirli yağ asitlerini oluşturan mikolik asitlerin biyosentezinin inhibisyonuyla hücre duvarının bütünlüğü bozularak hücre lizise uğrar (43). FAS II üyesi olan kasA (β -ketoaçil taşıyıcı protein sentaz), mabA (NADPH bağımlı β -ketoACP redüktaz) ve DfrA (DNA sentezinde yer alan NADH bağımlı dihidrofolat redüktaz)'nın da izoniyazidin hedefleri arasında olabileceği gösterilmiştir (53, 56, 58-60).



Şekil 2.7. İzoniyazidin aktivasyonu (48)

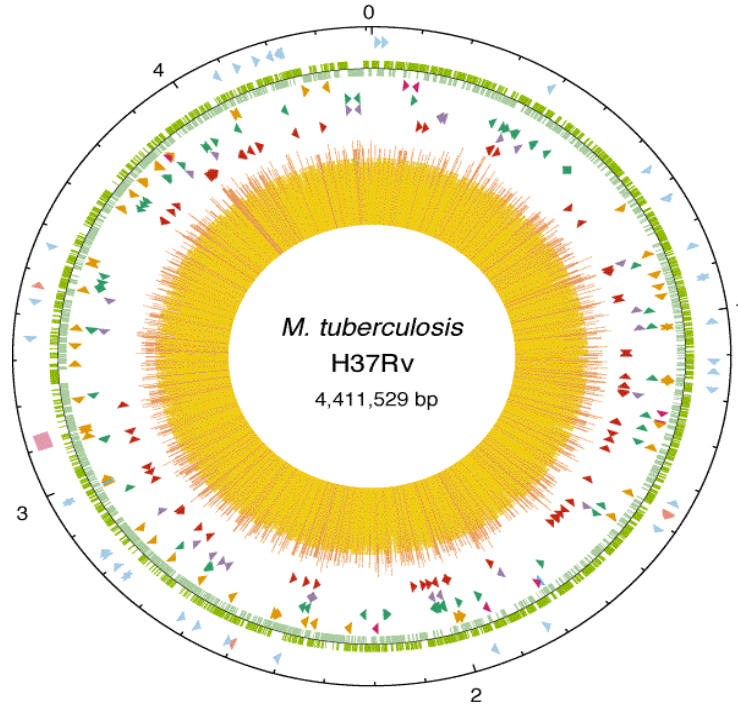
M. tuberculosis ile enfekte akciğer tüberkülozlu hastalarda fagositoz sırasında nötrofiller, hipoklorik asit oluşumunun katalizlenmesinde çok etkin bir antimikrobiyal ajan olan miyeloperoksidaz (MPO) enzimini kullanırlar. MPO enzimi katG gibi izoniyazidin oksidasyonunu da gerçekleştirmektedir. Bu heme enzim, klorürün hipoklorik asite oksitlenmesinde ortamdaki H_2O_2 ve süperoksiti kullanmaktadır.

İzoniiazid ile MPO etkileşimi sonucu izoniiazidin MPO'nun nötrofillerdeki antibakteriyel etkisini kısıtladığı gösterilmiştir (61).

2.3.1.2. KatG

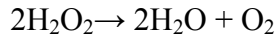
M. tuberculosis H37RV suşunun 4.4 Mb sirküler genom sekansı olduğu 11 Haziran 1998'de Nature dergisinde yayınlanmış olup, 4.411.529 baz çifti içeren 4000'den fazla geni olduğu tespit edilmiştir (62). *M. tuberculosis* katG'si iki fonksiyonlu katalaz-peroksidaz olup mantar, bitki ve bakteriyel peroksidazların sınıf I süper ailesine aittir ve *M. tuberculosis* genomunun yaklaşık % 40'ını oluşturur (49, 52, 63).

Hem prokaryot hem de ökaryotlarda bulunan katalaz enziminin insanlarda konak savunma mekanizmaları, hüresel apoptoz, yaşlanma, enflamasyon, tümör oluşumu ve mutagenesis ile ilişkili oksidatif stresi baskılayıcı fonksiyonları vardır. Prokaryotik organizmalarda ise katalaz enziminin ana rolü enfeksiyonun ilerlemesi ve bakteri kolonizasyonu ile mücadele sırasında konak tarafından oluşturulan peroksidlerin detoksifikasyonunun sağlanmasıdır (17).

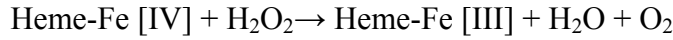
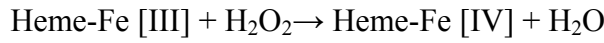


Şekil 2.8. *M. tuberculosis* genomu (62)

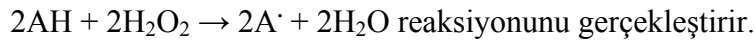
Katalaz hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştürür (64).



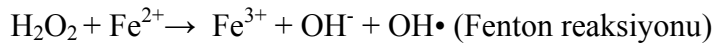
Bu reaksiyon iki basamaklıdır (65):



Peroksidaz enzimi ise (46)



Hidrojen peroksit proteinlerin sistein rezidüleri ve sülfür kümeleri ile etkileşime girme yeteneğine sahiptir. Toksisitesinin ana kaynağı Fe^{+2} varlığında (ferröz demir) direkt fenton veya süperoksit radikali ile Haber-Weiss reaksiyonuna girmesi ile açığa çıkan hidroksil radikali. Hidroksil radikali, en aktif radikal olarak bilinir. OH^\cdot meydana gelebilmesi için O_2^\cdot ve H_2O_2 gereklidir. Bunlarda SOD, CAT veya GSH-Px sistemiyle uzaklaştırılır (51, 52).



Hidrojen peroksit aerobik solunum sırasında aktif çoğalan bakteriler tarafından açığa çıkan inorganik mesajcıdır. Düşük seviyelerde stresle ilişkili protein ve antioksidan enzimlerin seviyelerini artırarak oksidanlara karşı hücrenin adaptasyonunu sağlar. Yüksek seviyeleri ise oldukça toksiktir ve programlı hücre ölümüne yol açar. *M. tuberculosis*' deki tek katalaz olan katG etkili bir hidrojen peroksit süpürücüsüdür (66, 67).

M. tuberculosis hidrojen peroksitin milimolar konsantrasyonlarına karşı yüksek toleransa sahiptir. İzoniyazidin aktivasyonunda ortamda yavaş akıllı H_2O_2 bulunması INH-NAD bileşiğinin oluşumunda son derece etkilidir. Ancak ortama yüksek miktar H_2O_2 ilavesinin ürün oluşumunu neredeyse hiç etkilemediği ve izoniyazidin aktivasyonunu kısıtladığı gösterilmiştir (52, 67, 68).

KatG katalaz-peroksidaz aktivitesine ek olarak Mn^{+2} bağımlı peroksidaz, sitokrom p450 benzeri oksijenaz, peroksinitritaz, NADH oksidaz, INH-hidrozinoliz, INH-NAD sentaz aktiviteleri de gösterir (67-69).

Katalaz-peroksidazlar, sekans ve yapısı yüksek oranda korunan demir taşıyan aktif bölgeye sahiptir. Tek polipeptit zincirlerinin herbiri yaklaşık 80 kDa olan iki domain içeren homodimer veya homotetramer yapıdadır (70-72). Demir bağlanma bölgesi ve iki fonksiyonlu katalaz peroksidaz aktif bölgesi katG'nin N terminal ucunda lokalizedir. KatG'nin dimerizasyonu ve katalaz-peroksidaz aktivitesi için C terminal ucu

etkin rol oynar. N ve C terminal ucu arasındaki molekül içi etkileşimler ise genin enzimatik fonksiyonları açısından çok önemlidir (58).

KatG nötral pH'ta normal peroksidaz aktivitesine ek olarak yüksek katalitik aktivite gösteren tek peroksidaz olma yönü ile de eşsizdir. Met 275, Tyr 249, Trp 122 katG üzerinde heme nin dış kısmında lokalize olup bu 3 aminoasit yan zinciri arasında 2 kovalent bağ vardır. Bu Met-Tyr-Trp (MYW) çapraz bağları tüm katG'lerde yaygın karakteristik özelliktir, pH'a çok duyarlıdır ve katalaz aktivitesi için esansiyeldir (65, 68, 73). Ayrıca geniş hidrojen bağlanma bölgesinin de katalaz aktivitesinin sürdürülebilmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (74).

Fakültatif hücre içi bakteri akciğer dokusundaki immün hücre içindeyken kofulda yaşar ve endositoz boyunca olgunlaşmaz. Enfekte dokuda dormant faza girebilme özelliği sebebiyle yıllarca yaşayabilir. Bakterinin dormant faza hücre bağımlı immün sinyal yolağa cevap olarak, sadece direkt yaşlanma veya immün süpresyonu reaktif ederek kronik hastalık oluşturmak üzere girdiği düşünülmektedir. Monosit içindeki bakteri yaşamını sürdürebilmek için ROS içeren bakterisidal mekanizmalara karşı kendini korumalıdır (52).

Basiller KatG ve ahpC proteinleriyle ortamdaki oksidatif strese karşı direnç gösterirler. KatG gen mutasyonları olan suşlar oksidatif strese karşı daha duyarlıdır. Katalaz-peroksidaz seviyeleri azaldıkça hidrojen peroksidin yıkıcı etkisi artmaktadır. Sonuç olarak katalaz-peroksidaz aktivitesi basilin konak içerisinde yaşaması ve enfeksiyon oluşturma kabiliyeti açısından son derece önemlidir (52).

2.3.1.3. Direnç

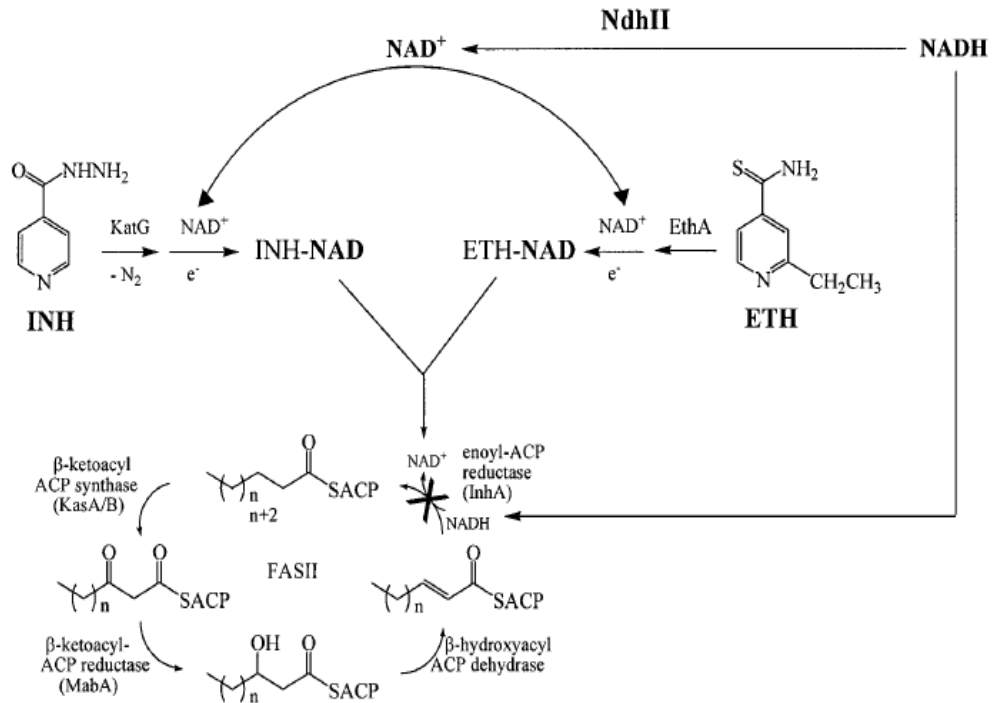
M. tuberculosis' in katG, inhA, ahpC, kasA, ndh, mabA gen lokuslarındaki mutasyonların izoniyazid direnci ile ilişkili olduğu bulunmuştur (47).

İzoniyazid direncinin esas kaynağı olan katG gen mutasyonları sonucu katalaz peroksidaz enzim aktivitelerinde yaşanan ciddi kayıplar MİK seviyelerini 0.2' den 256 mg/l' ye kadar yükseltmiştir (45, 50). Missens, nonsens mutasyonlar insersiyon, delesyon, trunkasyon ve nadiren tam gen delesyonlarına rastlanmıştır (45, 74). En fazla mutasyon katG geninin 315. kodonundaki AGC-ACC (Ser-Thr) transversiyonu olup % 50-95 oranında klinik izolatlarda rastlanmış ve MİK değerini 20-200 kata kadar artırmıştır (64, 75). S315T mutasyonuna farklı coğrafi bölgeler içinde farklı sıklıklarda (% 60-70) rastlanır (10). S315T mutasyonunu izoniyazid direncinin belirlenmesinde potansiyel bir genetik (marker) belirteçtir (47).

İzoniyazid direnci; *inhA* geninin aşırı ekspresyonuna neden olan *mabA-inhA* operonunun promoter bölgesinde veya *inhA*'nın İNH-NAD bileşiğine afinitesinin düşmesine yol açan *inhA*'nın aktif kısmındaki mutasyonlar sonucu da oluşabilir. İnhA ya da promoter bölgesindeki mutasyonlar sıklıkla düşük seviyede dirence neden olur ve *katG* mutasyonlarından çok daha az görülür (MİK=0,2-1mg/L). *KatG* gen mutasyonlarına ek olarak gerçekleşirse yüksek düzeyde direnç gelişimine neden olur (50).

İnhA gen mutasyonlarının sadece izoniyazid direnciyle ilişkili olmayıp yapısal olarak izoniyazide benzeyen ikinci basamak ilaç olan etiyonamide çapraz dirence de yol açtığı bilinmektedir (45, 50). Bir ön ilaç olan etiyonamidin asıl hedefi de *inhA* üzerinden mikolik asit biyosentezinin inhibisyonudur. En yaygın *inhA* mutasyonu genin promoter bölgesindeki (-15C-T) mutasyonudur. İnhA geninde mutasyon oluşma frekansı % 8-43' dür (26, 29).

Mikotiyol biyosentezinde rol oynayan *mshA* gen mutasyonlarının da *M. tuberculosis* suşlarında izoniyazid ve etiyonamid direncine de neden olduğu gösterilmiştir (50).



Şekil 2.9. INH ve ETH'in aktivasyonu ve etki mekanizmaları (76)

KatG gen ekspresyonunun down regülasyonunun da izoniyazid direnciyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. FurA-KatG genler arası bölge mutasyonlarının aynı suşlarda KatG gen ekspresyonunu düşürdüğü ve böylece izoniyazid direncine neden olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde ahpC geninin putative promoter bölgesinde lokalize oxyR-ahpC genler arası mutasyonlarının inhA geninin aşırı salınımı azaltarak izoniyazid direncine yol açtığı gösterilmiş, ancak izoniyazid direncindeki rolleri tam olarak aydınlatılamamıştır (45, 47).

M. tuberculosis ahpC geni alkil hidroperoksidaz enzimini kodlar. Yapılan birçok çalışma ahpC gen ekspresyonundaki artışın izoniyazide dirençli katalaz negatif suşlarda katalaz peroksidaz aktivite kayıplarına karşı kompensatuvar etki ettiğini göstermiştir. AhpC geninin aşırı ekspresyonu ile izoniyazid direncinde önemli artış oluşmaz (45, 50). AhpC gen mutasyonları sıklıkla (-12G/A) bölgesinde gerçekleşir ve izoniyazid direnci için marker olarak görev yapabilir. AhpC geni *in vivo* ortamda izoniyazidi direkt etkisizleştirerek ve katG gen kayıplarını gidererek bakterinin yaşabilirliğini arttırmada önemli rol oynar (44, 63, 78).

Mikobakteriyel DNA bağlanma proteini (MDP1) mikobakterideki histon benzeri protein olup DNA'daki guanin ve sitozin rezidülerine bağlanır. Transkripsiyon, rekombinasyon ve DNA replikasyonunu düzenleyici etkisi vardır. Genellikle gen ekspresyonlarının negatif düzenleyicisidir. Stasyonel ve dormant mikobakterilerde MDP1 proteinin ekspresyonu artmaktadır. KatG gen ekspresyonunu da azaltarak izoniyazide karşı fenotipik tolerans oluşumuna yol açar. MDP1 Fe⁺² varlığında hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştürür yani katG gibi H₂O₂ detoksifikasyonunda önemli rol oynar. MDP1 proteininin de izoniyazide dirençli katG mutantlarında ahpC geni ile birlikte kompensatuvar etki oluşturduğu gösterilmiştir (46).

Ndh (tip II NADH dehidrogenaz) genindeki mutasyonlar NADH dehidrogenaz enzim aktivitesinde azalmalara yol açmıştır. İzoniyazide dirençli suşlarda katG gen mutasyonlarına ek olarak ndh gen mutasyonlarına da rastlanmıştır (45, 78).

Arilamin N-asetiltransferaz enzimleri asetil-CoA dan akseptör substrata bir asetil grubu transfer eden sitozolik konjugasyon enzimleridir . Bu enzim memelilerde ilaç detoksifikasyonunda görev alan önemli farmakogenetik role sahiptir. Genomik ve deneysel çalışmalar sonucu *M. tuberculosis*'te izoniyazidi inaktive eden N-asetil transferaz aktivite kayıplarına neden olan mutasyonların izoniyazid duyarlılığını arttırdığı düşünülmektedir, ancak net bir kolerasyon (bağıntı) yoktur. Ayrıca arilamin N-asetiltransferaz proteini yavaş çoğalan mikobakterilerde, mikobakteriyel hücre duvarı

sentezinde önemli bir rol oynamaktadır, bu yüzden olası antimikrobiyal tedavi hedefleri arasında yer almaktadır (45, 53).

M. tuberculosis'de pek çok gende gerçekleşen mutasyonların ilaç direncine neden olduğu kanıtlanmıştır. Dünya çapında ilaca dirençli olgulardaki ciddi artış da dikkate alınarak tüm bu direnç mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması hastalığın kesin tedavisi için ilaç geliştirilmesinde son derece önemlidir. Dirençli tüberküloz hastalığının tedavisi oldukça kompleks, düşük etkinlikte, çok toksik, daha pahalı, tolere edilebilirliği düşük, hastalarda uyuncu problemine rastlanmakta, mortalite ve morbiditesi yüksek olduğundan erken tanı ve uygun tedavi seçimi için identifikasyon son derece önemlidir. PCR-RFLP yöntemi izoniyazide dirençli suşların belirlenmesinde ekonomik, hızlı, güçlü, uygulama ve yorumlanması basit testlerdir, katG S315T mutasyonlarının tanımlanmasında MspA 1 restriksiyon enzimi kullanılır. % 80 duyarlı % 100 özgüllük gösteren bir yöntemdir (45, 79).

2.3.1.4. Enoil Redüktaz (inhA)

INH-NAD bileşiği, mikobakteriyel NADH bağımlı 2-trans-enoil-ACP redüktaz enziminin (inhA) yavaş, yüksek afiniteli, sıkı bağlı kompetitif inhibitörüdür. Enoil ACP redüktaz enzimi kısa zincirli alkol dehidrogenaz /redüktaz süper ailesinin bir üyesidir (80, 81).

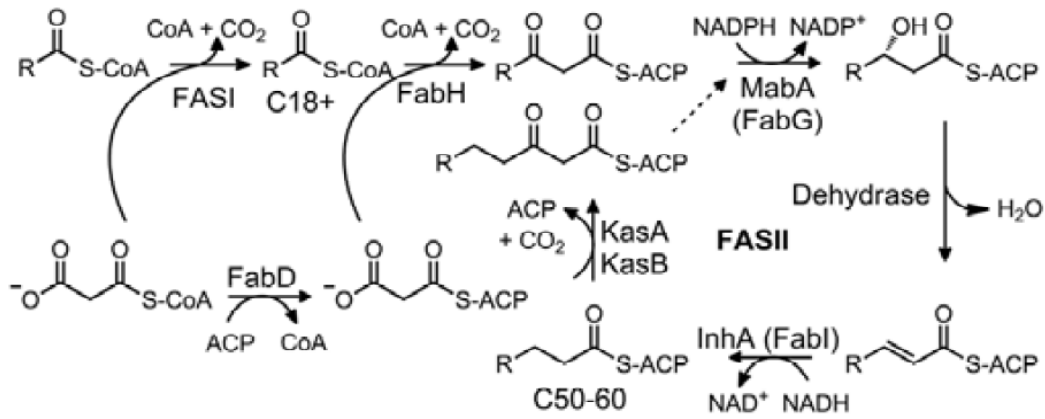
Mikolik asitler α dallanma gösteren β hidroksillenmiş 74-90 karbonlu büyük yağ asitleridir. Arabinogalaktan ile kovalent bağ yaparlar. Hücre duvarını yaygın kullanılan antibiyotiklere karşı korur ve bakterinin virülansının büyük kısmından sorumludur (82).

Mikolik asit biyosentezin için gerekli yağ asit prekürsörleri mikobakteriyel tip FAS I ve FAS II biyosentez yolağı ile sentezlenir. FAS I yolağındaki tek enzim kompleksi asetil CoA ve malonil CoA'dan 20-24 karbonlu kısa zincirli yağ asitlerini sentezler FAS II yolağında ise birbirinden farklı tek fonksiyonlu enzimler vardır. Bunlar yağ asitlerinin 56 karbona kadar uzamasını sağlar. InhA'nın inhibisyonu ile FAS I yolağının ürünü olan doymuş yağ asitleri birikir, mikolik asit sentezlenemez ve bakteri lizise uğrar (83, 84).

FAS II sistemi mikolik asitlerin meromikolat dallarının uzun karbon zincirlerini üreterek yağ asit prekürsörlerini uzatır. *Mycobacterium tuberculosis* inhA'sı FAS II yolağında yağ asitlerinin uzamasında son temel enzimatik basamağı katalizler. NADH'ın 4S hidrojeninden, 2-trans-enoil-CoA (ACP) substratının C2-C3 çift bağının

C3 pozisyonuna hidrid transfer ederek 2-trans-enoil-ACP'yi açil-ACP'ye dönüştürür. (82, 83, 85).

Mikolik asitlerin moleküler yapısı $R_2CH(OH)CHR_1COOH$ şeklinde olup, bu yapıda R_1 20-24 karbonlu linear bir alkan, R_2 ise 30-60 karbon atomuna sahip daha kompleks bir aldehit yapıyı temsil eder. Meromikolik asitler β hidroksillenmiş bölgedeki fonksiyonel gruplara göre isimlendirilirler. C=O grubu içerenler keto- (veya oxo-) mikolatlar, $CH_3OCH=$ grubu içerenler metoksimikolatlar, bir metil grubu ile trans-O içeren epoksi-mikolatlar, COOH içerenler karboksimikolatlar veya sıklıkla anıldığı gibi, dikarboksi-mikolatlar olarak tanımlanırlar (3).



Şekil 2.10. *M. tuberculosis*'de yağ asidi sentez yolağı (86)

18 ve daha fazla karbonlu açil CoA'lar açil CoA ve malonil CoA'lardan FAS I yolağında sentezlenir. FAS II yolağında zincir uzamasında Fab D (malonil CoA:ACP transaçilaz) ile malonil CoA'dan üretilen malonil ACP kullanılır. Yağ asitleri açil CoA ile malonil CoA'yı dönüştüren β -ketoACP sentaz (Fab H) ile FAS II yolağına girerler. Oluşan β -ketoACP NADH bağımlı redüktaz MabA ile indirgenir ardından NADH bağımlı enoil ACP redüktaz inhA (Fab I) ile tepkimeye girer. Zincir uzaması β -keto ACP sentazlar (KasA ve KasB) ile devam eder (86).

2.3.1.5. Yan Etkileri

İyi tolere edilebilen izoniyazidin en sık görülen yan etkileri, sinir sistemi ve karaciğer üzerinedir. İzoniyazid sinir sisteminde görev alan nörotransmitterlerin sentezinde kofaktör olarak rol oynayan piridoksinin (Vit B6) metabolizmasını etkiler. Yetersiz beslenen hastalara, HIV hastalarına, diyabetik, böbrek yetmezliği, kronik

alkolizmi olanlara, hamilelere ve epileptik nöbetleri olanlara piridoksin verilmesi önerilmektedir (6).

Baş dönmesi, felç, optik nörit, ensefalopati, aplastik anemi, lupoid reaksiyonu, atralji, jinekomasti yaygın görülen yan etkilerindendir. Hepatit, periferik nöropati, ciltte aşırı duyarlılık reaksiyonu nadir görülür (87).

2.3.1.6. Metabolizması

İlaç, gastrointestinal sistemden tama yakın emilir ve 1-2 saat içinde maksimum serum konsantrasyon seviyelerine (2-5g/l) ulaşır. İlaç tüm vücut sıvıları ve boşluklarına, santral sinir sistemine kolayca geçer. Karaciğerde asetilasyon yoluyla metabolize olan izoniyazid serum proteinlerine çok düşük orandabağlanır, plasentaya ve anne sütüne geçer. Asetilasyon hızındaki farklılıklara da bağlı olarak yarılanma ömrü yaklaşık 1-3 saattir. İlacın % 50-70'i 24 saat içinde idrarla itrah edilir (6, 88).

2.3.2. Rifampisin (RİF/R)

İlk olarak *Streptomyces mediterranei*'den 1957 yılında sentezlenmiştir. 1966'da klinik kullanıma girmiş ve 1971 yılında FDA onayı alarak standart altı aylık tedavinin temel ilacı haline gelmiştir.

Rifampisin mikobakterinin DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin beta alt ünitesine bağlanarak, mesajcı RNA'nın uzamasını inhibe ederek etki gösterir. Bakterisidal etkilidir. Hızlı ve hücre içinde çoğalan basillere ve metabolik aktivitesi düşük, yavaş veya aralıklı çoğalan basillere etkili bir ilaçtır. Sterilizan aktivitesi en güçlü ilaçtır. RNA polimerazın beta alt ünitesini kodlayan rpoB geninin 81 baz çiftlik bölgesindeki mutasyonlar, özellikle 507-533 kodonları rifampisinlere karşı dirençten sorumlu tutulmaktadır (45).

Hipersensitivite reaksiyonları, deri döküntüleri, hepatotoksisite, vücut sıvılarında renk (turuncu-kırmızı) değişikliği, trombositopeni, kolestatik sarılık, jinekomasti, böbrek yetmezliği, grip benzeri sendrom rifampisinin yan etkilerindendir (29).

2.3.3. Etambutol (ETB/E)

Etambutol, sentetik yapıda, bakteriyostatik etkili bir ilaçtır. İNH, RİF ve PZA'dan oluşan tedaviye; primer İNH direnç riski yüksek olgularda, RİF direnci gelişimini önlemek üzere eklenmiştir. Etambutol arabinogalaktan ve lipoarabinomannan sentezinde rol alan arabinozil transferaz enzimiyle etkileşerek *M. tuberculosis*' in hücre

duvarı sentezini bozar. Özellikle arabinozil transferaz enzimini kodlayan *embCAB* geninde meydana gelen mutasyonlar etambutol direncinden sorumludur (3, 6, 38).

Doza bağılı optik nörit, bir ya da iki gözde görme keskinliği ve renkli görmeye bozulmaya yol açabilir. Erken dönemde değişiklikler genellikle geri döner, fakat tedavi hemen kesilmezse körlük olabilir. Önerilen dozlarda 2-3 aylık kullanım ile görme toksisitesi nadir görülür. Bacaklarda periferik nörit bulguları gelişebilir. Diğer nadir yan etkiler arasında yaygın deri reaksiyonu, artralji ve çok nadiren hepatit olabilir (29).

2.3.4. Pirazinamid (PZA/Z)

Nikotinamidin sentetik pirazin analogudur. Güçlü tuberkülsid etkisi vardır. Pirazinamid tuberküloz tedavisinin 9 aydan 6 aya kısaltılmasında çok önemli bir rol oynar, çünkü pirazinamid diğer tuberküloz ilaçlar tarafından öldürülemeyen asidik ortamdaki (monositler ve makrofajlar içindeki) yarı dormant basil popülasyonunu öldürür (3, 45).

M. tuberculosis suşlarının ürettiği pirazinamidaz enzimi, pirazinamid ön ilacını pirazinoik asit denilen aktif şekline dönüştürür. İlacın aktif formu olan pirazinoik asit membran iletimini inhibe eder. Özellikle pirazinamidaz enzimini kodlayan *pncA* genindeki mutasyonlar pirazinamid direncinden sorumludur (45).

2.3.5. Streptomisin (SM)

Aminoglikozit yapıdadır. Tuberküloz tedavisinde kullanılan ilk antibiyotiktir. *Streptomyces griseus*'tan elde edilir. Bakterisidal etkilidir. Bakteri ribozomunun 30S alt birimine geri dönüşümsüz olarak bağlanarak ribozomlarda protein sentezini inhibe eder. Streptomisin tedavide tek ilaç olarak kullanılmasıyla hızlı bir şekilde ilaç direnci gelişmiştir. Ribozomun 30S alt biriminin bileşenleri olan 16S rRNA bağlanma ünitesindeki veya S12 ribozomal proteindeki değişiklikler direnç gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (45).

Ototoksik etki, kohlear (işitme) veya vestibüler (denge) bozukluk şeklinde, nadiren de her ikisi birlikte görülebilir. İşitme kaybı sıklıkla geri dönüşümsüzdür. İşitme bozukluğunun yanı sıra kulak çınlaması ve kulakta dolgunluk hissi oluşabilmektedir. Vestibüler toksisite sonucu hastalarda bulantı, kusma, baş dönmesi ve nistagmus gelişebilir. Nefrotoksik ve nörotoksik yan etkileri de vardır. Streptomisin enjeksiyonu ağrılıdır. Enjeksiyon yerinde deride kızartı, şişlik ya da steril abse oluşabilir (6, 29).

2.4. Tüberküloz Epidemiyolojisi

2.4.1. Dünya'da Tüberküloz

Tüberküloz dünyada, erişkinlerde bulaşıcı hastalıklardan ölümün HIV/AIDS'den sonra en büyük ikinci nedenidir ve ciddi bir halk sağlığı sorunudur (89).

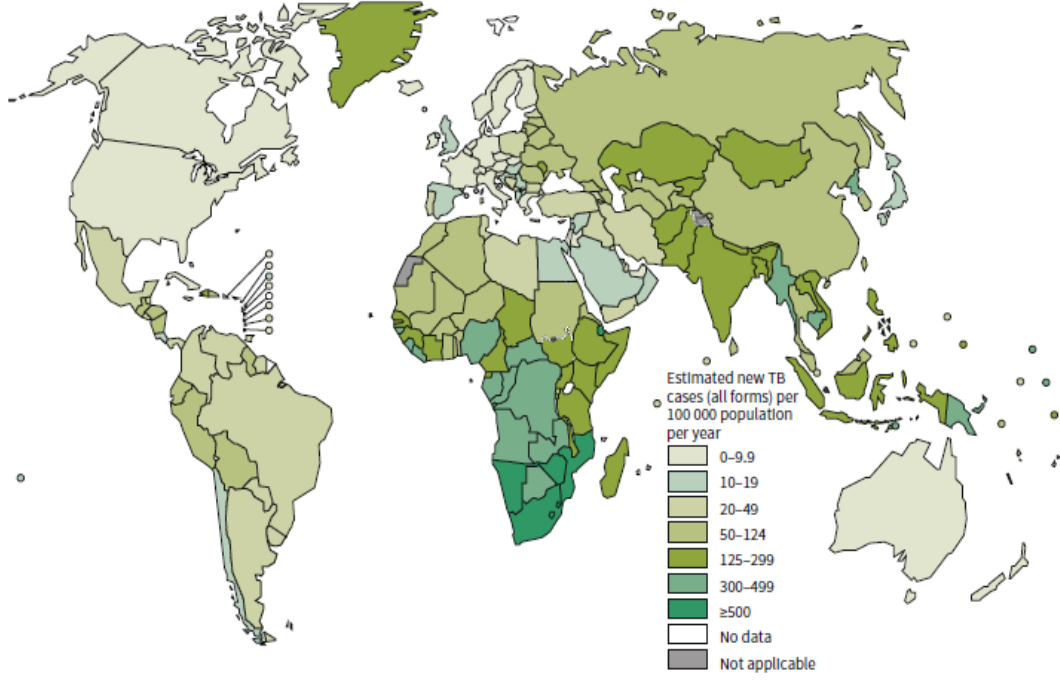
1990'lı yıllarda tüberkülozun dünyada önemli bir sağlık sorunu olduğunun fark edilmesi üzerine DSÖ, tarihinde ilk kez 1993 yılında bir hastalık için küresel acil durum ilan ederek, tüm dünya ülkelerine Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisini (DGTS) önermiştir ve hükümetleri tüberküloza karşı etkin bir mücadeleye davet etmiştir (26).

DSÖ, DGTS yaklaşımının bütün ülkelerin Ulusal Tüberküloz Kontrol Programlarında (UTKP) temel alınmasını önermiştir. Bu yaklaşımın esası tüberküloz hastalığının toplum içinde yayılmasından asıl sorumlu olan balgam yayma pozitif akciğer tüberkülozlu kişilerin tanısı ve tam olarak tedavi edilmesidir (90). Bu strateji, semptomatik hastalarda pasif yöntemle bakteriyolojik tanı, gözetimli kısa süreli tedavi, kayıt-raporlama-analiz sistematığının kurulması, ücretsiz kesintisiz ilaç temini ve bütün bunları yürütmek için politik kararlılığın ortaya konması unsurlarını içermektedir (3). 2006 yılında DSÖ dünyada tüberkülozlu hasta sayısını azaltmak için kanıta dayalı bir yaklaşım olarak Stop TB Stratejisi'ni benimsemiş ve bu amaçla "2006-2015 Küresel Planı"nı bir yol haritası olarak uygulamaya koymuştur (91).

Tüberkülozun giderek artan bir sağlık sorunu haline gelmesinin en önemli nedenleri; hastalığın ihmali ve öncelik verilmemesi, göçler, yoksulluk, HIV salgını ve sosyo-ekonomik değişiklikler olarak sayılabilir (3). Doğal bağışıklık gelişmesi, erken tanı, etkili anti-tüberküloz ilaç tedavisi ve aktif hasta olan kişilerin toplumdan izole edilerek tedavi edilmesi hastalığın önemli ölçüde kontrol altına alınmasını sağlamıştır (92).

İnsidans, 100,000 kişilik bir toplumda bir yıl içerisinde ortaya çıkan yeni tüberküloz olguları; prevelans, 100,000 kişilik bir toplumda bir yılda saptanan eski ve yeni tüm olgular göstermekte olup nokta prevalans olarak da ifade edilmektedir; mortalite ise 100,000 kişilik bir toplumda bir yılda tüberkülozdan ölenlerin sayısı demektir (93).

2000-2013 yılları arasında etkili teşhis ve tedavi yöntemlerinin kullanılmasıyla yaklaşık 37 milyon hayat kurtarılmıştır. DSÖ raporlarına göre dünya genelinde tüberküloz görülme sıklığı ve ölüm hızları düşüyor olmasına rağmen dünyadaki tüberküloz vaka sayısı halen çok yüksektir (94).



Şekil 2.11. DSÖ 2013 yılı tahmini TB insidansı oranlar (94)

Dünya üzerinde kayıtlı yeni tüberküloz olgu sayısı ülkelerin ekonomik durumları ile yakından ilişkilidir. En yüksek olgu sayısı en düşük gayri safi milli hasılaya sahip Afrika, Asya ve Latin Amerika ülkelerinde görülmektedir (5).

2013 yılında dünya çapında vakaların çoğunluğu (% 56'sı) Güney Doğu Asya ve Batı Pasifik bölgelerinde, dördte biri ise Afrika'dadır. Dünyada yüksek olgu yükü olan 22 ülke tüm tüberküloz vakalarının % 80' ini barındırmaktadır. Bu ülkeler; Afganistan, Bangladeş, Brezilya, Çin (% 11), Endonezya, Etiyopya, Filipinler, Güney Afrika, Hindistan (% 24), Kamboçya, Kenya, Kongo Cumhuriyeti, Mozambik, Myanmar, Nijerya, Pakistan, Rusya Federasyonu, Tanzanya, Tayland, Uganda, Vietnam ve Zimbabve'dir (94).

2013 yılında dünya genelinde tespit edilen 9 milyon tüberküloz vakasının yaklaşık % 13'ünün (1,1 milyon) HIV pozitif olduğu tespit edilmiştir. Bunların yaklaşık % 80'i Afrika'da bulunmaktadır. Hayatını kaybeden 1.5 milyon vakanın 360.000'i HIV pozitifdir. Tüberküloz HIV birlikteliği özellikle Afrika Bölgesi'nde oldukça yüksektir (94).

Hastalık erkeklerde kadınlara oranla daha sık (9 milyon vakanın yaklaşık % 60'i) görülmektedir. Tüberkülozdan ölen 1,5 milyon vakanın 510.000'i kadındır. Bunların üçte birinden fazlası HIV pozitifdir. 2013 yılında Dünya genelinde HIV olmadığı bilinen 80.000 tüberküloz kaynaklı çocuk ölümü rapor edilmiştir (94).

DSÖ 2014 Tüberküloz Raporu'na göre dünya genelinde tüberküloz hastalarının % 5'inin çok ilaca dirençli tüberküloz hastası olduğu tahmin edilmektedir. Dünya genelinde çok ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) oranı; yeni olgularda % 3,5 ve önceden tedavi görmüş olgularda % 20,5'tir. Yeni olgularda ÇİD-TB oranı en yüksek olan ülkeler Belarus, Kırgızistan, Kazakistan, Moldova, Özbekistan ve Rusya'dır. Yine DSÖ, ÇİD-TB olgularının % 9'unun YİD-TB vakası olduğunu tahmin etmektedir. 2013 yılında yaklaşık 480.000 ÇİD tüberküloz vakası belirlenmiştir. YİD tüberküloz vakaları özellikle Litvanya, Kazakistan, Letonya ve Tacikistan'da oldukça yüksektir (94).

Rapora göre 2013 yılında dünyadaki tüberküloz insidansı 126/100.000, prevalans 159/100.000, mortalite ise 16/100.000'dir (94).

2.4.2. Türkiye'de Tüberküloz

Türkiye'de 20. yüzyılın ilk yarısında ciddi bir salgın yapan verem hastalığından her yıl bin kişiden 2-3'ü ölmekteydi (30). Tüberküloz ölümleri, bütün ölüm nedenleri içinde birinci sırada yer alıyordu. Bu durum 1950'li yıllara kadar devam etti; 1945 yılında tüberküloz ölümleri yüz binde 262, 1950 yılında yüz binde 204 idi (26).

Tablo 2.3. DSÖ bölgelerine göre tahmini TB hastalık yükü, 2013 (94)

BÖLGE	İnsidans (100.000'de)	Prevalans (100.000'de)	Mortalite (100.000'de)
Afrika Bölgesi	280	300	42
Güney Doğu Asya Bölgesi	183	244	23
Doğu Akdeniz Bölgesi	121	165	23
Batı Pasifik Bölgesi	87	121	5,8
Avrupa Bölgesi	39	51	4,1
TÜRKİYE	20	23	0,42
Amerika Bölgesi	29	38	1,5
DÜNYA GENELİ	126	159	16

DSÖ'nün 2014 Tüberküloz Raporu'nda Türkiye profili incelendiğinde Türkiye'nin 2013 yılı tüberküloz prevalans hızı yüz binde 23, insidans hızı yüz binde 20, mortalite hızı yüz binde 0,42 ve vaka bulma hızı yüzde 88'dir. 2013 yılında verem

savaşı dispanserlerine kayıtlı toplam vaka sayısı 13.409'dur. Bunlardan % 92'si (12.352 kişi) yeni olgu, % 8'i (1.057 kişi) önceden tedavi görmüş olgulardır (94).

Toplam 13.409 hastanın 7.689'u (% 60) erkek, 5.481'i (% 40) kadındır. Hastaların 8.439'unda (% 65) akciğer tüberkülozu varken, 4.731'inde (% 35) akciğer dışındaki organlar tutulmuştur. 2012 yılında kayıtlı yeni vakalar arasında tedavi başarı oranı %88 iken önceden tedavi görmüş vakalardaki başarı oranı % 66'dır (94).

DSÖ, tüberküloz olgu hızı yüz binde 20'nin altında olan ve son 5 yılda olgu hızı düşme trendinde olan ülkelerin tüberküloz eliminasyon fazında olduğunu kabul etmektedir. Ülkemizin 2013 yılı tüberküloz olgu hızı yüz binde 17,5 ve son 5 yılda olgu hızı düşme trendinde olduğundan eliminasyon fazına girilmiş durumdadır. Ülkemizde yeni tespit edilen tüberküloz hasta sayısı her yıl yaklaşık % 6-7 oranında azalmaktadır. Bu kapsamda önümüzdeki yıllardaki hedef ülkemizde tüberküloz eliminasyonudur.

Ülkemizde "Sağlıkta Dönüşüm Programı" kapsamında Sağlık Bakanlığı, ulusal ve uluslararası kuruluşlarla işbirliği içerisinde tüberküloz kontrol hizmetlerini yürütmektedir. Ulusal Tüberküloz Kontrol Programı çalışmaları "Tüberkülozsuz Bir Dünya" oluşturmak amacıyla, Doğrudan Gözetimli Tedavi Stratejisi (DGTS) ve Stop TB Stratejisi çerçevesinde kamunun yanında özel sektör, sivil toplum örgütleri ve gönüllü kuruluşlarla birlikte yürütülmektedir. Tüberküloz kontrol hizmetleri Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Tüberküloz Daire Başkanlığı tarafından koordine edilmektedir (26).

2.5. Manyetik Alan ve Etkileri

Yerkürenin doğal elektromanyetik alanına (0.03 - 0.07 mT) insan yapımı elektromanyetik alanların da eklenmesi canlıları geçmişe göre çok daha yüksek düzeyde radyasyon ile birlikte yaşamak zorunda bırakmıştır (95). Güneş ışınları, mikrodalga fırınlar, saç kurutma makineleri, elektrik kabloları, uzaktan kontrol cihazları, enerji hatları, elektrikli tren ve tramvay kabloları, kablosuz networkler, cep telefonları, prizler elektromanyetik alan kaynaklarındandır (96).

Elektrik alanı, bir elektrik yükünün başka bir elektrik yükü üzerinde yarattığı çekme veya itme kuvveti etkisidir. Manyetik alan ise, elektrik yükleri yer değiştirdiğinde, yani bir elektrik akımı sirkülasyonu olduğunda meydana gelir. Elektrik alanı ve manyetik alan şiddeti mesafe ile hızla azalır. Manyetik alanda, manyetik akı yoğunluğu birimi tesla (T) uluslararası birim olarak kullanılır.

Elektrik ve manyetik alanların bir araya gelmesiyle elektromanyetik alanlar (EMA) oluşur. Elektromanyetik alanların belirgin özelliği frekansları ve dalga uzunluklarıdır. Belli bir noktadan bir saniyede geçen dalga sayısı ise o ışımının frekansdır ve Hertz (Hz) ile ölçülür. Dalga uzunluğu ise bir titreşim sırasında dalganın katettiği mesafedir. Frekans yükseldikçe dalga uzunluğu kısalır ve alanda yayılan enerji yükselir. Elektromanyetik alanların frekans aralığı; 0-300 GHz'dir. Frekansı 100 kHz'e kadar olan alanlara çok düşük frekanslı elektromanyetik alan (ÇDF-EMA) (extremely low frequency electromagnetic fiels) denir. Elektrik şebekelerinden kaynaklanan çok alçak frekanslı (50 Hz) EMA'lar iyonize olmayan ışınımlardır; tanecik yayılımı yoktur; sistemin gücüne ve yakınlığına bağlı olarak farklı şiddetlerde etkileyici olabilir (97).

Elektromanyetik kuvvetler canlı organizmalarda atomlardan moleküllere, hücrelerden organlara kadar tüm yapıları bir arada tutan kuvvetlerdir. Bu nedenle dış kaynaklı elektromanyetik alanların ve bunların oluşturduğu kuvvetlerin biyolojik yapılara etkileri de kaçınılmazdır. Özellikle elektrik trafoları veya yüksek gerilim hatlarına yakın yerlerde yaşamakta olan insanlar EMA'dan çok daha fazla etkilenirler (98).

Günümüzde, EMA'nın olumlu ve olumsuz yönde birçok biyolojik etkisi üzerindeki araştırmalar yoğunlaşmıştır. Biyolojik sistemler değişik frekans ve şiddetlerdeki EMA maruziyetlerine farklı biyolojik yanıtlar vermektedir. EMA enerjisi özellikle iyonik formdaki atom veya moleküllerin elektron dönüşlerini etkiler ve böylelikle iyonların enerji düzeylerini değiştirir. EMA enerjisinin frekansı, şiddeti, biyolojik sistemin yapısı, hücresel düzeni, su içeriği, EMA kaynağına olan yakınlığı, maruziyet süresi ve sıklığı gibi faktörlere bağlı olarak gelişen bu değişimler, biyokimyasal tepkimeler, hücresel iletişim yolları, hücre döngüsü, gen transkripsiyonu ve protein sentezine kadar uzanan pek çok temel sistem üzerinde ve farklı şekillerde sonuçlanabilen etkilere neden olmaktadır (98).

DSÖ iyonlaştırmayan radyasyonun etkileri konusunda ICNIRP'yi (The International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection) , kanser konusunda IARC'yi (International Agency for Research on Cancer/Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu) kabul etmektedir. Haziran 2001'de IARC, enerji iletim (yüksek gerilim) hatlarının yakın civarında oluşan elektromanyetik alanların (ELF) kanserojen olabileceğini açıklamıştır. DSÖ'nün kanserle ilgili sınıflamasında ELF manyetik alanlar "Olası Kanserojen" (Grup-2B) olarak kabul etmiştir (99).

Stres, görüş alanın daralması, kulak bölgesinde ısınma, kalp pilinin bozulma riski, kulak çınlaması, yorgunluk hissi, konsantrasyon bozulması, baş ağrıları, işitmede geçici aksaklıklar, sersemleme elektromanyetik alanların kısa vadeli etkilerindedir (97).

EMA'nın özellikle hücre zarında iyon taşınım sistemlerini, zar potansiyelini ve iyonlara bağılı hücreyel yanıt oluşumlarını etkiler. Böylece hücre büyümesi ve farklılaşması, apoptozis, DNA sentezi, RNA transkripsiyonu, protein ekspresyonu ve fosforilasyonu, lipid reoksidasyonu, ATP sentezi, hormon üretimi, antioksidan enzim aktiviteleri, metabolik aktivite gibi pek çok hücre fonksiyonlarını etkilemektedir (100-103).

Düşük frekanslı manyetik alan maruziyeti ile çocuklarda lösemi, yetişkinlerde ise kanser (özellikle sinir sistemi, meme kanseri), genotoksik ve nörolojik etkiler, nörodejeneratif hastalıklar (alzheimer, bunama, otizm), immün sistem deregülasyonu, alerjik ve inflamatuvar cevaplar, bazı kardiyovasküler etkiler, kusurlu doğumlar, kısırılık, sperm sayısında azalma arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (104-107).

Süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi serbest radikeller çeşitli metabolik proseslerde oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri; hücre içi sinyal iletim yolağı ayrıca stres yanıtı, hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasından sorumlu gen ifadelerinin düzenlenmesinde rol alır. Aşırı üretilen serbest radikaller immün sistemin aktifleşmesi ve hücre solunumunun aktif hale gelmesiyle oluşan yüksek seviyede oksidatif cevaba yol açar, farklı enzim ve antioksidan bileşiklerce düzenlenen antioksidan savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılmaya çalışılırlar (95, 108).

Manyetik alanların hücre düzeyindeki etkilerini membran yapısı, küçük moleküllerin permeabilitesi, serbest radikal miktarını ve ömrünü etkileyerek ya da melatonin hormonu sentezini azaltarak gerçekleştirdiğı düşünülmektedir (109-111). Hücre üzerine olan etkileri membran düzeyinde başlar. Bütün hücre membranlarının her iki yanında yüksek miktarda serbest iyonlar bulunmaktadır. K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} bunların başlıcalarıdır. Bu iyonlar hücre volümünü kontrol eder, sinyal iletim sisteminde önemli bir rol oynar ve membranda şiddetli elektriksel alan oluşturur. Dış kaynaklı bir elektromanyetik alan iyon kanallarının düzensiz geçişine neden olarak plazma zarı elektrokimyasal dengesini bozar. Böylece hücre normal fonksiyonlarını sürdürmez ve apoptoza gider (104).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Demirbaş Malzemeler

- 1- PCR cihazı (Qiagen Hilden, Germany)
- 2- Elektronik hassas terazi (Denver, Canada)
- 3- Elektroforez aparatı (Cleaver Scientific, United Kingdom)
- 4- UV lambası (Syngene, UK)
- 5- Hız ayarlı vorteks (Velp Scientifica, Europe)
- 6- Etüv (Mettler, Germany)
- 7- Otoklav (Hirayama, Japan)
- 8- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- 9- Laminar air flow (Modkim, Türkiye)
- 10- Su banyosu (Mettler, Germany)
- 11- Elektromanyetik alan kaynağı (Philip Harris, Shonstone, England)
- 12- Buzdolabı (Arçelik)

3.2. Sarf Malzemeler

- 1- MspA I Restriksiyon Enzimi
- 2- Kat G₁ ve Kat G₂ Primerler
- 3- Middlebrook 7H9 ve 7H10
- 4- ATCC H37Rv 27294 ve ATCC H37Ra 25177
- 5- β -Nicotinamide adenin dinükleotid hidrat (Sigma-Aldrich N7004, USA)
- 6- %30'luk H₂O₂ solüsyonu (Carlo-Erba 412072, Fransa)
- 7- Agar
- 8- MgCl₂
- 9- Deoksinükleotid trifosfat (dNTP) mix
- 10- Taq DNA polimeraz tampon çözeltisi
- 11- DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)
- 12- OADC
- 13- Gliserol
- 14- Tris Base
- 15- EDTA
- 16- Etidyum Bromür

3.3. Middlebrook 7H10 Katı Besiyerinin Hazırlanması

Middlebrook 7H10 (Fluka), besiyeri hazırlamak için 19,47 gram toz besiyeri tartılır. Bir miktar distile su eklenerek eriyene kadar karıştırıldıktan sonra distile su ile 900 ml'ye tamamlanır. 5 ml gliserol ilave edilerek hazırlanan solüsyon 121°C'de 15 dakikada otoklavda sterilize edilir. Sterilizasyon işlemi sonrasında su banyosunda 50°C'ye soğutulan besiyerine 10 ml katkı solüsyonu (oleik asit, sığır serum albümini, dekstroz, katalaz, NaCl) (OADC) eklenir. Hazırlanan M7H10 besiyeri petri plaklarına dağıtılır.

3.4. Middlebrook 7H9 Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Middlebrook 7H9 sıvı besiyeri hazırlamak için 2,35 gram toz besiyeri tartılıp distile su ile 450 ml'ye tamamlanır. 1 ml gliserol ilave edilir. Hazırlanan solüsyon 121°C'de 15 dakikada otoklavda sterilize edilir. Sterilizasyon işlemi sonrasında su banyosunda 50°C'ye soğutulan besiyerine 10 ml katkı solüsyonu OADC eklenir. Hazırlanan Middlebrook 7H9 besiyerleri 10'ar ml olacak şekilde tüplere doldurulur. Besiyerlerine Mc Farland 0,5 bulanıklıkta 20 duyarlı (H37Rv) ve 20 dirençli (H37Ra) tüp olmak üzere ekim yaparak her bir tüpe konsantrasyonu 0,2 µg/ml olacak şekilde izoniyazid ilave edilir.

3.5. TBE 10X'in Hazırlanması

121,10 g Tris base

61,83 g Borik Asit

5,84 g EDTA

Distile su ile 1000 ml'e tamamlanır. pH 8.0'e ayarlayarak buzdolabında saklanır.

3.6. Agaroz Jelin Hazırlanması

2,25 g agar tartılır. TBE X ile 150 ml'ye tamamlanır. Mikrodalga fırında kaynatılarak eritilir, 60°C'ye soğuyunca 20 µl etidyum bromür eklenir, karıştırılır ve kalıba dökülür. Tarak ile kuyucukların oluşmasını sağlanır ve donmaya bırakılır. Arkasından tarak çıkarılarak elektroforez uygulamaya hazır hale getirilir.

3.7. PZR Ürülerinin Elde Edilmesi

M. tuberculosis genomunun Kat G gen bölgesinin amplifikasyonu için KatG₁ (– 5' CAT GAA CGA CGT CGA AAC AG 3'), KatG₂ (– 5' CGA GGA AAC TGT TGT CCC AT 3') primerleri kullanılır.

2X amplifikasyon karışımının hazırlanışı

- 200 µl dNTP miks (her bir nükleotid 2,5 mM)
- 200 µl MgCl₂ (15 mM)
- 200 µl Taq DNA polimeraz tampon çözeltisi
- 400 µl Distile su

Toplamda 1000 µl olacak şekilde hazırlanır.

5X supermix hazırlanması

- 25 µl 2X amplifikasyon karışımı
- 1 µl katG₁ (20 pmol/µl) primer
- 1 µl katG₂ (20 pmol/µl) primer
- 1 µl Taq DNA polimeraz tampon çözeltisi
- 17 µl Distile su
- 5 µl DNA kalıp

DNA kalıp sonradan eklenmek üzere her bir tüpe 45 µl olacak şekilde (n+1 n=4) 5 tüp için 225 µl 5X hazırlanır.

- 125 µl 2X amplifikasyon karışımı
- 5 µl katG₁ (20 pmol/µl) primer
- 5 µl katG₂ (20 pmol/µl) primer
- 5 µl Taq DNA polimeraz tampon çözeltisi
- 85 µl Distile su

45 µl her bir tüpe eklenir. Ardından Rv1, Rv2, Ra1, Ra2 DNA örneklerinden 5'er µl alınarak tüplere eklenir ve PZR süreci başlatılır.

3.8. PZR Uygulaması

94 °C'de 5 dakika 1 döngü (denatürasyon)

- 94 °C 45 saniye
 - 60 °C 45 saniye
 - 72 °C 45 saniye
- } 35 döngü

4 °C 18 saat 1 döngü olacak şekilde PZR uygulanır.

3.9. DNA'nın Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi

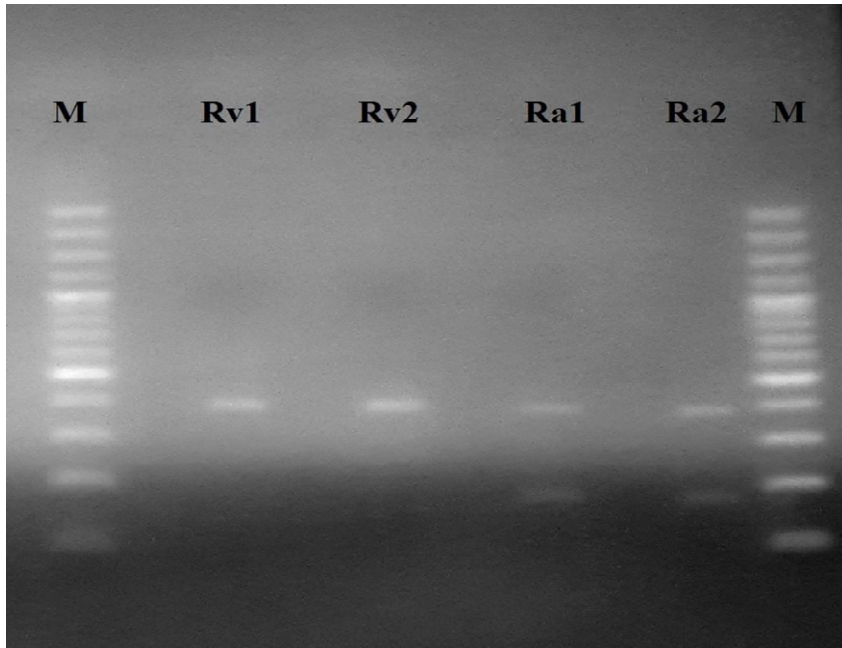
- 2 µl Buffer
- 1 µl MspA I restriksiyon enzimi
- 1 µl PZR ürünü DNA'lar
- 16 µl Distile su

DNA kalıp sonradan eklenmek üzere her bir tüpe 19 µl olacak şekilde (n+1 n=4) 5 tüp için 95 µl hazırlanır.

- 10 µl Buffer
- 5 µl MspA I restriksiyon enzimi
- 80 µl Distile su

Her bir tüpe 19 µl eklenir ve üzerlerine PZR ürünü olarak elde ettiğimiz Rv1, Rv2, Ra1, Ra2 DNA'lardan 1'er µl ilave ederek reaksiyonu başlatılır. Hazırlanan tüpler 37,5 °C 'de 1,5 saat inkübüsyona bırakılır.

RFLP reaksiyonunu durdurmak üzere tüplere 10'ar µl blue dye ve 10 µl Marker üzerine ise 30 µl blue dye eklenir. Elde ettiğimiz ürünler kuyucuklara sırasıyla M (marker), Rv1, Rv2, Ra1, Ra2 ve M olacak şekilde 15'er µl yükleme yapılarak 120 voltta 1,5 saat elektroforeze tabi tutulur. Elde edilen bantlara UV altında görüntüleme yapılır.



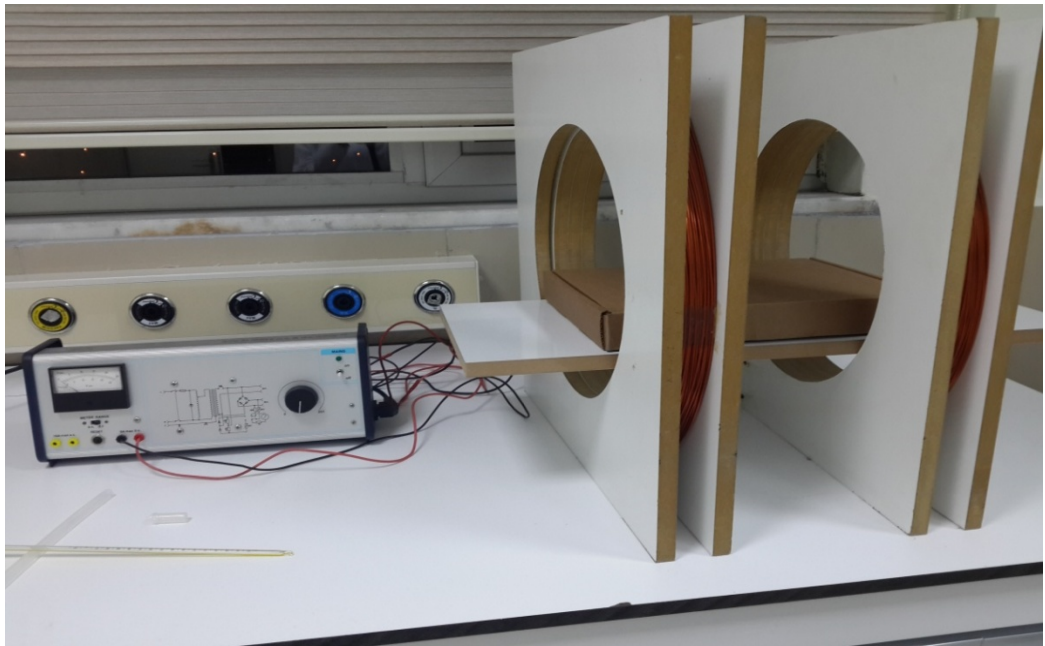
Şekil 3.1. Duyarlı ve dirençli örneklerin RFLP profili

3.10. Agar Proporsiyon Yöntemi

Her bir grupta 4 dirençli (H37Ra) 4 duyarlı (H37Rv) suş olmak üzere 5 grup toplam 40 tüp olacak şekilde önceden hazırladığımız MD7H9 sıvı besiyerlerine ekim yapılır. 0,2 µg/ml INH ilave ederek Mc Farland bulanıklığı 0,5 olarak ayarlanır.

3.11. Manyetik Alan Uygulaması

4'ü duyarlı 4'ü dirençli 8 örnek, günde 45'er dakikadan toplam 4,5 saat olacak şekilde $B_{DC} = 4,95 (\pm 0,02)$ mT, 10 günde 45 saat manyetik alana maruz bırakılır. Oda sıcaklığı 23 ± 2 °C olarak sabitlenir. Birbirine paralel Helmholtz çift sarmalları (200 sarmal) kullanıldı. Uluslararası Radyasyon'dan Korunma Derneği'nin Uluslararası Non-iyonize Radyasyon Komitesi'nin maksimum izin verilebilir kısa süreli maruziyet düzeyi olan 5 mT yoğunluklu manyetik alan uygulaması tercih edildi.



Şekil 3.2. Manyetik alan düzeneği

3.12. Deneyin Birinci Aşaması

Deneyin ilk aşamasında 10 gün boyunca her bir grupta 4 duyarlı 4 dirençli toplam 8 örnek olmak üzere 5 grup (toplam 40 örnek) ile çalışılmıştır. Kontrol 1 grubu, etüvde herhangi bir işleme tabi tutulmaksızın bırakılmıştır. 2. gruba günlük 4,5 saat 5 mT manyetik alan uygulanır. 3. gruba 8 örneğin her birine günde 1 mM olarak hazırlanan H_2O_2 'den 10 gün boyunca 100'er µL ilave edilir. Böylece deney tüpünde 10

μM final konsantrasyonda H_2O_2 elde edilir. 4. gruba aynı şekilde 10 μM final konsantrasyon elde etmek üzere NAD eklenir. 5. gruba hem H_2O_2 hem de NAD'ın 10'ar μM final konsantrasyonda olmasını sağlayacak şekilde 10 gün boyunca H_2O_2 ve NAD birlikte ilave edilir.

10 günün sonunda 40 tüpten 10'ar μL alınarak daha önceden hazırlanan ve içerisine antibiyotik eklenen Middlebrook 7H10 katı besiyerlerine halka öze ile alarak ekim yapılır. 13 gün boyunca etüvde beklettiğimiz plaklarda oluşan kolonileri saymak üzere deneyi sonlandırılır.

3.13. Deneyin İkinci Aşaması

Her biri 5'er sıvı besiyeri (MD7H9) içeren 4 grup hazırlanır. Bunlara ATCC H37Rv duyarlı suşların ekimi yapılır. Final konsantrasyonları 50, 100, 150 ve 200'er μM olacak şekilde H_2O_2 ve NAD'a 12 gün boyunca maruz bırakılır. Tekrar agar proporsiyon yöntemi ile değerlendirmek üzere katı besiyerlerine (MD7H10) ekim yapılarak 14 gün sonra kolonileri saymak üzere deney sonlandırılır.

3.14. İstatistiksel Yöntemler

Yapılan ilk istatistiksel değerlendirme olan normal dağılıma uygunluk testi neticesinde verilerin normal dağılıma uymadığı görüldüğünden, analizlerde nonparametrik istatistik testlerinden olan Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Mann Whitney U testleri kullanıldı. İki'den fazla grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis Varyans analizi yapılarak tüm gruplar değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın tespit edildiği ($p < 0.05$) durumlarda, farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek üzere ikili karşılaştırmalar Mann Whitney U Testi kullanılarak gerçekleştirildi.

İstatistiksel analizleri yapabilmek için tüm deneyleri standardize ederek 17 grup oluşturuldu. Bunlar:

1. Grup Kontrol 1 duyarlı (manyetik alanın kontrol grubu)
2. Grup Manyetik alana maruz bırakılan duyarlı suşlar
3. Grup Kontrol 1 dirençli (manyetik alanın kontrol grubu)
4. Grup Manyetik alana maruz bırakılan dirençli suşlar
5. Grup Kontrol 2 duyarlı (deneyin 1. aşamasının kontrol grubu)
6. Grup 10 μM H_2O_2 eklenen duyarlı suşlar

7. Grup 10 μM NAD eklenen duyarlı suşlar
8. Grup 10 μM H_2O_2 ve 10 μM NAD eklenen duyarlı suşlar
9. Grup Kontrol 2 dirençli (deneyin 1. aşamasının kontrol grubu)
10. Grup 10 μM H_2O_2 eklenen dirençli suşlar
11. Grup 10 μM NAD eklenen dirençli suşlar
12. Grup 10 μM H_2O_2 ve 10 μM NAD eklenen dirençli suşlar
13. Grup Kontrol 2 duyarlı (deneyin 2. aşamasının kontrol grubu)
14. Grup 50 μM H_2O_2 ve 50 μM NAD eklenen duyarlı suşlar
15. Grup 100 μM H_2O_2 ve 100 μM NAD eklenen duyarlı suşlar
16. Grup 150 μM H_2O_2 ve 150 μM NAD eklenen duyarlı suşlar
17. Grup 200 μM H_2O_2 ve 200 μM NAD eklenen duyarlı suşlar

Tablo 3.1. İstatiksel sonuçlar

Descriptives

VAR00002

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	5% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	4	15,0000	,8165	,4082	13,7008	16,2992	14,00	16,00
2,00	4	15,2500	,5000	,2500	14,4544	16,0456	15,00	16,00
3,00	4	82,0000	1,8257	,9129	79,0948	84,9052	80,00	84,00
4,00	4	81,0000	,8165	,4082	79,7008	82,2992	80,00	82,00
5,00	4	17,0000	,8165	,4082	15,7008	18,2992	16,00	18,00
6,00	4	16,2500	1,2583	,6292	14,2478	18,2522	15,00	18,00
7,00	4	15,0000	,8165	,4082	13,7008	16,2992	14,00	16,00
8,00	4	7,5000	,5774	,2887	6,5813	8,4187	7,00	8,00
9,00	4	83,0000	,8165	,4082	81,7008	84,2992	82,00	84,00
10,00	4	83,0000	,8165	,4082	81,7008	84,2992	82,00	84,00
11,00	4	82,0000	1,4142	,7071	79,7497	84,2503	81,00	84,00
12,00	4	82,5000	,5774	,2887	81,5813	83,4187	82,00	83,00
13,00	5	17,0000	,7071	,3162	16,1220	17,8780	16,00	18,00
14,00	5	14,4000	,8944	,4000	13,2894	15,5106	14,00	16,00
15,00	5	7,2000	,4472	,2000	6,6447	7,7553	7,00	8,00
16,00	5	9,6000	,5477	,2449	8,9199	10,2801	9,00	10,00
17,00	5	13,6000	1,1402	,5099	12,1843	15,0157	12,00	15,00
Total	73	35,9863	32,7403	3,8320	28,3474	43,6252	7,00	84,00

Tablo 3.2. Gruplar arası karşılaştırmaların istatistiksel anlamlılık düzeyi (1-4. gruplar)

Gruplar	1	2	3	4
1	-	p>0,05	-	-
2		-	-	-
3			-	p>0,05
4				-

Tablo 3.3. Gruplar arası karşılaştırmaların istatistiksel anlamlılık düzeyi (5-12. gruplar)

Gruplar	5	6	7	8	9	10	11	12
5	-	p>0,05	P:0,029	P:0,029	-	-	-	-
6		-	p>0,05	P:0,029	-	-	-	-
7			-	P:0,029	-	-	-	-
8				-	-	-	-	-
9					-	p>0,05	p>0,05	p>0,05
10						-	p>0,05	p>0,05
11							-	p>0,05
12								-

Tablo 3.4. Gruplar arası karşılaştırmaların istatistiksel anlamlılık düzeyi (13-17. gruplar)

Gruplar	13	14	15	16	17
13	-	P:0,008	P:0,008	P:0,008	P:0,016
14		-	P:0,008	P:0,008	p>0,05
15			-	P:0,008	P:0,016
16				-	P:0,016
17					-

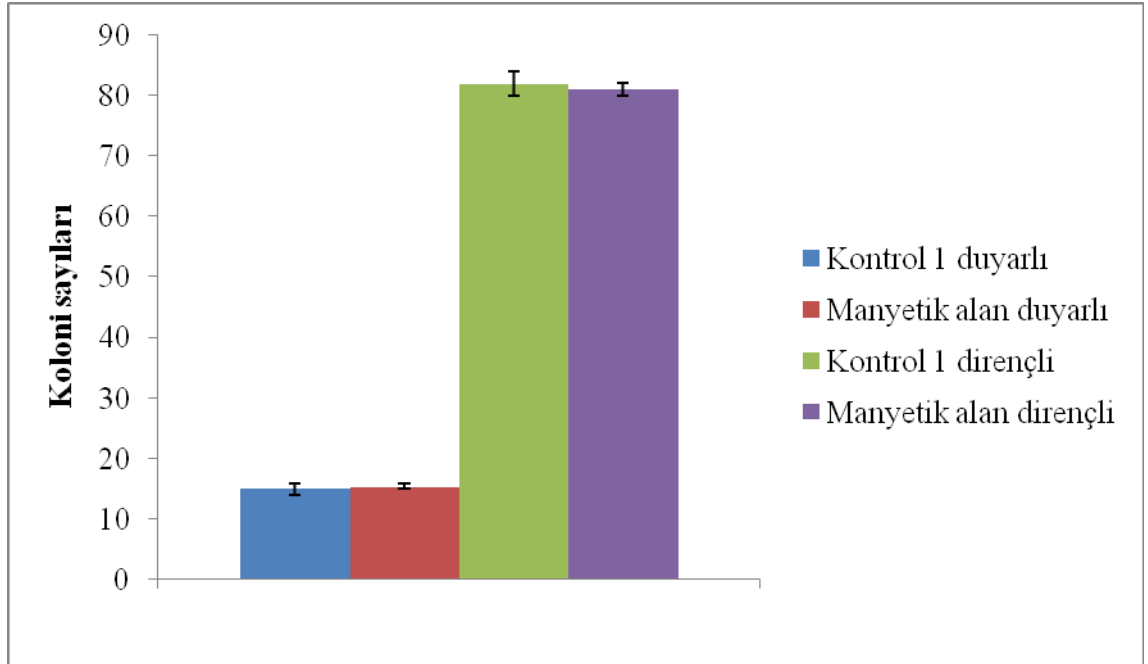
İstatistiksel hesaplamalara göre ikili karşılaştırmalarda $p>0,05$ farkın anlamlı olmadığını gösterir. İkili karşılaştırmalarımızdan 5-7, 5-8, 6-8, 7-8, 13-14, 13-15, 13-16, 13-17, 14-15, 14-16, 15-16, 15-17 ve 16-17 istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4. BULGULAR

Deneyin birinci aşamasında elde ettiğimiz sonuçlar tablo 1,2 ve şekil 1,2,3'te gösterilmiştir. Deneyin 2 aşamasına ait bulgular ise tablo 3 ve şekil 4'te verilmiştir.

Tablo 4.1. 45 saat 5 mT manyetik alan uygulamasının duyarlı ve dirençli suşların koloni sayılarına etkileri

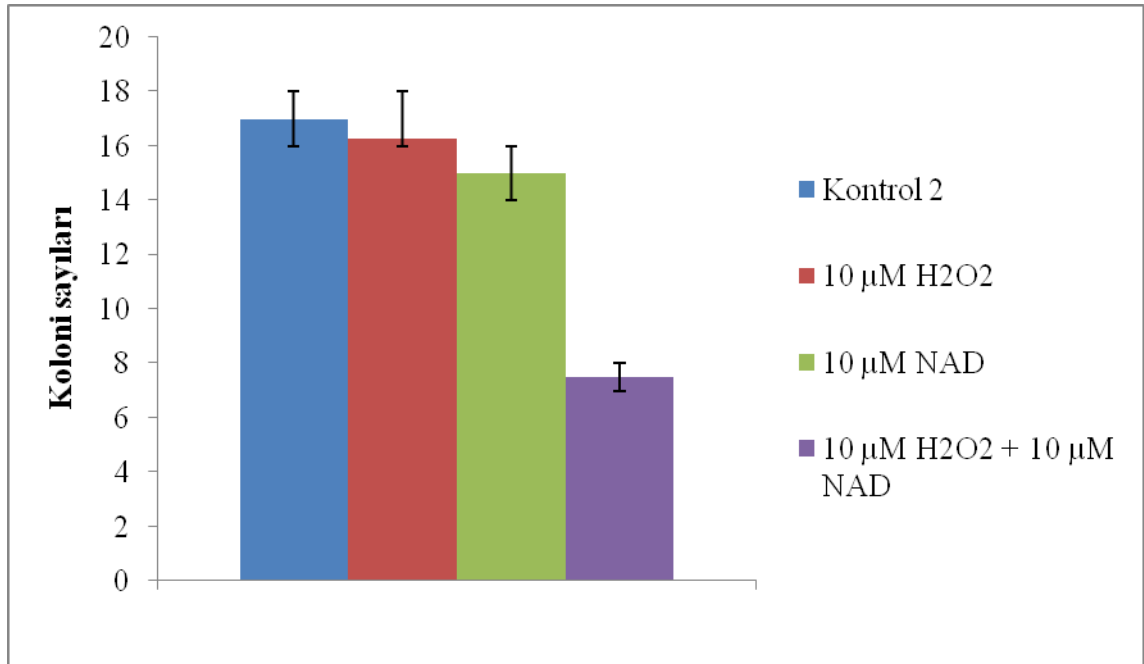
GRUPLAR	DUYARLI SUŞ H37Rv ATCC 27294 (koloni sayıları)	DİRENÇLİ SUŞ H37Ra ATCC 25177 (koloni sayıları)
Kontrol 1	a 14	a 83
	b 16	b 81
	c 15	c 84
	d 15	d 80
Manyetik Alan	a 16	a 80
	b 15	b 81
	c 15	c 82
	d 15	d 81



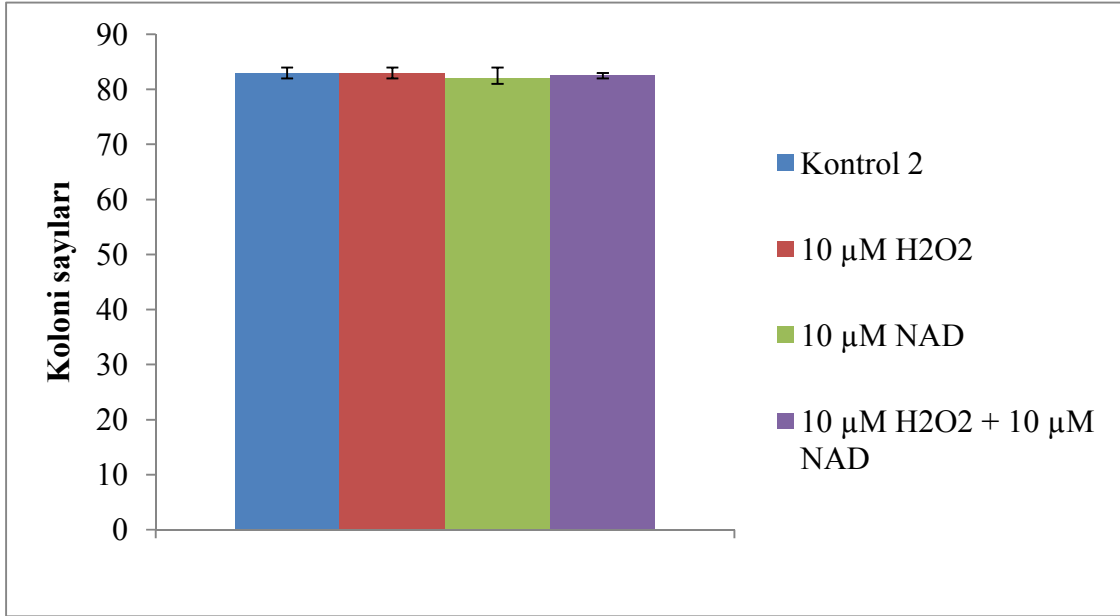
Şekil 4.1. Manyetik alan uygulamasının dirençli ve duyarlı suşların koloni sayılarına etkisi

Tablo 4.2. 10'ar μM H_2O_2 ve NAD ilavesinin duyarlı ve dirençli suşlara etkileri

GRUPLAR	DUYARLI SUŞ H37Rv ATCC 27294 (koloni sayıları)	DİRENÇLİ SUŞ H37Ra ATCC 25177 (koloni sayıları)
Kontrol 2	a 17	a 83
	b 16	b 82
	c 17	c 84
	d 18	d 83
10 μM H_2O_2	a 18	a 82
	b 16	b 84
	c 15	c 83
	d 16	d 83
10 μM NAD	a 15	a 84
	b 15	b 81
	c 14	c 82
	d 16	d 81
10 μM H_2O_2 +10 μM NAD	a 7	a 83
	b 8	b 82
	c 7	c 82
	d 8	d 83



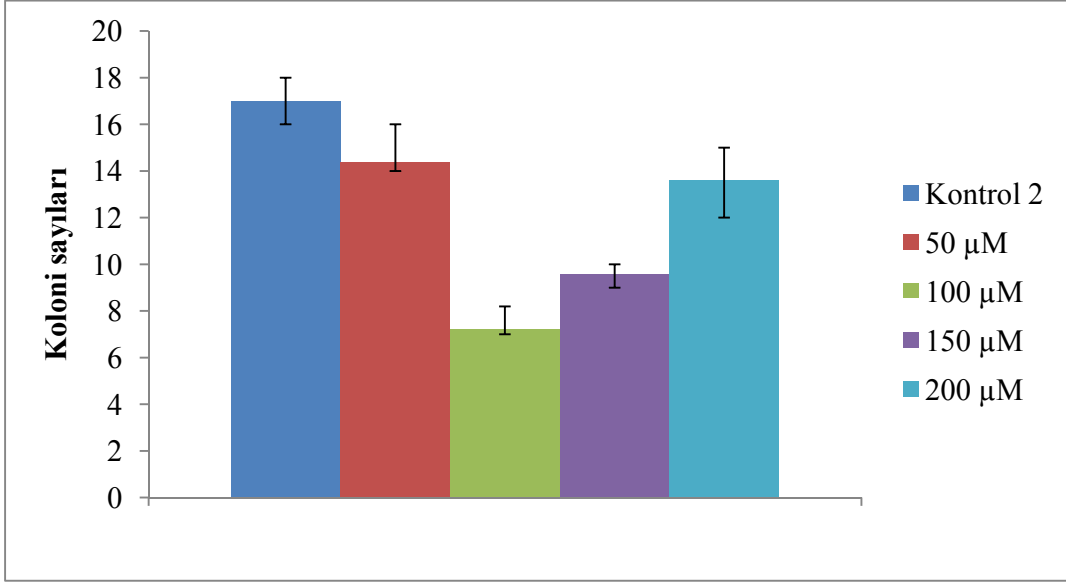
Şekil 4.2. 10 μM H_2O_2 ve NAD ilavesinin duyarlı suşlara etkileri



Şekil 4.3. 10 µM H₂O₂ ve NAD ilavesinin dirençli suşlara etkiler

Tablo 4.3. H₂O₂ ve NAD'ın birlikte ilavesi ile elde edilen koloni sayıları

GRUPLAR	DUYARLI SUŞ H37Rv ATCC 27294 (koloni sayıları)
Kontrol Grubu 2	a 17
	b 16
	c 17
	d 17
	e 18
50 µM H ₂ O ₂ +50 µM NAD	a 14
	b 16
	c 14
	d 14
	e 14
100 µM H ₂ O ₂ +100 µM NAD	a 7
	b 7
	c 7
	d 8
	e 7
150 µM H ₂ O ₂ +150 µM NAD	a 10
	b 9
	c 9
	d 10
	e 10
200 µM H ₂ O ₂ +200 µM NAD	a 12
	b 13
	c 15
	d 14
	e 14



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ve NAD'ın birlikte ilavesinin duyarlı suşların koloni sayılarına etkileri

5. TARTIŞMA

İnsanlık tarihinin bilinen en eski hastalıklarından birisi olan tüberküloz halen dünyada ve ülkemizde önemli bir sağlık problemidir, enfeksiyöz etkenlere bağlı ölümlerin birinci sebebidir. 2013 yılında 9 milyon kişi daha bu amansız hastalığa yakalanmış ve 1,5 milyon insan hastalık nedeniyle yaşamını yitirmiştir (41, 94).

Dünya nüfusunun 1/3'ünü enfekte eden *Mycobacterium tuberculosis*'teki ilaç direnç mekanizmalarının anlaşılması, hastalığın kontrolü açısından son derece önemlidir. Mikobakterilerin sahip olduğu mikolik asit taşıyan eşsiz hücre duvarı yapısı ve dışa atım pompaları kalıtsal olarak kemoterapötiklere karşı direnç sağlarken kromozomal genlerde spontan gelişen mutasyonlar ise kazanılmış ilaç direnci olarak ifade edilmektedir. İlaç direnci gelişmesi riskini azaltmak üzere, tüberküloz tedavisinde monoterapinin yerini çoklu ilaç tedavisi almıştır (14, 45).

Uygun olmayan ilaç tedavisi, doğal olarak oldukça düşük oranlarda bulunan dirençli basil popülasyonunda artışa ve sonuç olarak tedavi dozundan etkilenmeyen dirençli bakterilerin popülasyona hâkim duruma gelmesine neden olmaktadır. İlaç dirençli tüberküloz, her geçen gün büyüyen küresel bir sorun olmasının yanı sıra tüm dünyada tüberküloz kontrolünü tehdit etmektedir. Özellikle en güçlü iki antitüberküloz ilaç olan izoniyazid ve rifampisine karşı dirençli tüberküloz hastalarında izlenen direnç, klinik açıdan oldukça önemlidir. Çok ilaca dirençli tüberküloz; tedavisi, maliyeti ve yan etki potansiyeli yüksek olan ikinci seçenek antitüberküloz ilaçların uzun süre gözetim altında kullanımını ve hastaların uzun süre hastanede yatmalarını gerektirmektedir (37, 45).

DSÖ'nün 2014 Tüberküloz Raporu'na göre dünya genelinde tüberküloz hastalarının % 5'inin çok ilaca dirençli tüberküloz hastası olduğu tahmin edilmektedir. ÇİD-TB görülme oranı yeni tüberküloz vakalarında % 3,5 iken, önceden tedavi görmüş hastalarda % 20,5'lere kadar ulaşmaktadır. ÇİD-TB vakalarının % 9'unda YİD-TB olduğu tahmin edilmektedir. 2013 yılında ÇİD-TB oranı yeni vakalar arasında en çok Belarus, Kırgızistan ve Kazakistan'da kaydedilmiştir. YİD-TB oranı ise Litvanya, Kazakistan ve Letonya'da oldukça yüksektir. Dünya genelindeki ÇİD-TB vakalarının yarısından fazlası Hindistan, Çin ve Rusya Federasyonu'ndadır (94).

Keşfedilmesinden bu yana etki ve direnç mekanizması halen tam olarak aydınlatılamayan izoniyazid en önemli antitüberküloz ilaçlardandır. Piridin halkası ve

hidrazid grubundan oluşan bir ön ilaçtır. Terapötik dozlarda aktif çoğalan hücre içi ve hücre dışı basillere karşı bakterisidal etki gösterir. Pasif difüzyonla hücre içerisine alınır ve mikobakteri katalaz-peroksidazı (katG) tarafından aktif hale getirilir. Bu dönüşüm bir redoks reaksiyonu olup oksidan ve NAD gerektirir. İlacın aktif şekli olan INH-NAD oluşur ve asıl hedef yağ asit döngüsünün inhA (2-trans-enoil-açıl taşıyıcı protein redüktaz) üzerinden bozularak mikolik asit sentezi üzerinden bakterinin imhasıdır (112).

Çalışma dizaynımız ile, manyetik alan ile birlikte tek tek ve bir arada H₂O₂ ve NAD ilavesinin izoniyazid eklenen besiyerlerinde, duyarlı ve dirençli *M. tuberculosis* basillerinin çoğalmaları üzerine nasıl etki ettiğini agar proporsiyon yöntemi ile göstermeyi amaçladık. Dirençli suş olarak çok daha sık gözlenen izoniyazide dirençli KatG S315T mutantını kullandık. İzoniyazidin etki mekanizması üzerine manyetik alan H₂O₂ ve NAD'ın etkilerini üç aşamada değerlendirdik.

Hızla artan teknolojik gelişmeler sebebiyle artan manyetik alan maruziyeti, tüm canlı sistemler üzerine pek çok olumlu olumsuz etkiye sahiptir. Bu sürecin canlılar üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Canlı vücudunda birçok olay elektriksel alan ve güçler tarafından belirlendiği için, manyetik alanlar atom ve moleküller arasındaki etkileşimi, biyokimyasal olayları ve sonuçta hücrelerin işlevlerini etkileyebilir (98).

Çalışmamızda 5 mT 50 Hz manyetik alanın *M.tuberculosis*'in izoniyazide duyarlı ve dirençli suşlarında ilaç etkinliği üzerine muhtemel etkisini göstermeyi amaçladık. Literatürde manyetik alanın hücre membran geçirgenliğini artırdığını gösteren çalışmalar yer almaktadır (113). İlâveten oksido-redüksiyon reaksiyonlarını katalizleyen ve aktif merkezinde metal iyonu bulunduran enzimlerin aktivitelerini de değiştirdiği bilinmektedir (114, 115). Bu bağlamda zayıf manyetik alanın, çalışmamızda kullandığımız tüberküloz etkeni mikobakterilerin üreme süreçlerine, hem membran geçirgenliğini artırarak bakteri içerisine giren izoniyazid miktarını artırmak suretiyle, hem de metal iyonu içeren enzimlerin enzim aktivitelerini değiştirerek etki etmesini beklemekteydik. Ancak koloni sayılarını belirlemek suretiyle elde ettiğimiz bulgular göstermektedir ki hem duyarlı hem de dirençli suşlarda manyetik alan maruziyetinin besiyerindeki mikobakterilerin üreme ve sağkalım potansiyeli ile ilaç etkinliği üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır (p>0,05).

Yapmış olduğumuz kapsamlı literatür taramasına göre, manyetik alanın *M. tuberculosis*' in üreme potansiyeli üzerine muhtemel etkilerini araştırmış olan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda çalışmamız manyetik alanın *M.*

tuberculosis üzerine etkisini araştıran ilk çalışmadır. Mikobakterilerin hücre duvarlarının düşük permeabilite ve hidrofobisite özelliği; bakteriyi hem zararlı bileşiklere karşı dirençli kılar hem de bazı yararlı metabolitlerin kullanımını zorlaşır. Ayrıca nükleik asit zincirinin uzama hızının oldukça düşük olması sonucu yavaş üreme hızına sahip olan mikobakteriler, 18-24 saatte ikiye bölünürler (3). *M. tuberculosis*'in üreme hızının düşük olmasına bağlı olarak diğer çalışmalara kıyasla bakteriye daha uzun süre manyetik alana uyguladık. *M. tuberculosis*'in eşsiz hücre duvarı yapısı basili manyetik alanının olası etkilerine karşı daha dirençli hale getirmiş olabilir. Ya da çok uzun süre maruziyete karşı bakteri bir metabolik adaptasyon geliştirmiş olabilir.

Farklı mikroorganizmaların aynı manyetik alana maruz kalsalar dahi farklı biyolojik ve moleküler yapıları sayesinde farklı oranlarda etkilendiği bilinmektedir. Ayrıca hücre tipine, maruziyet zamanına, manyetik alanının yoğunluk ve frekansına bağlı olarak çok düşük frekanslı elektromanyetik alanın etkileri çok çeşitlidir (96). Sonuçta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında oluşan koloniler sayıldığında anlamlı bir değişikliğe rastlamadık.

Garip ve arkadaşları  gram pozitif  gram negatif bakteri olan altı bakteri suşuna üç saat boyunca 0.5 mT, 50 Hz manyetik alan uygulamış ve bakterilerin çoğalma oranlarını ve morfolojik değişiklikleri göstermişlerdir. Çalışmada kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında her iki gruptaki bakterilerde manyetik alana maruziyet arttıca üreme oranında azalma gösterilmiştir. Çok düşük frekanslı manyetik alana maruz bırakılan türler arasında suşların morfoloji ve metabolik aktivitelerinin benzememesinden dolayı küçük farklılıklar vardır (111).

Bayır ve arkadaşlarının farklı yoğunluk, frekans ve sürede elektromanyetik alana maruz bıraktığı *E.coli* ve *S.aureus* bakterileri ile yaptığı çalışmada koloni oluşturma kapasiteleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli lde azalma gösterilmiştir. EMA'lar bakteri üremesi üzerine olumsuz etkileri sebebiyle hastanelerde ve gıda üretiminde patojenlerle mücadelede etkin olarak kullanılmaya adaydır (116).

Fojt ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 10 mT, 50 Hz manyetik alana bir saat maruziyetin hem basil (*Escherichia coli*) ve hem kok (*Paracoccus denitrificans*) şeklindeki bakterilerin yüzeyinde ve şeklinde hiçbir morfolojik değişikliğe neden olmadığını rapor etmişlerdir (117). Aynı araştırma ekibinin yaptığı diğer çalışmada ise farklı bakteri suşlarının (*Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata*, *Staphylococcus aureus*) 50 mT, 50 Hz elektromanyetik alan maruziyetinin kontrol gruplarıyla

karşılaştırıldığında koloni oluşturma sayılarında azalmaya rastlanmıştır (118). Yine Fojt ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada da sülfat indirgeyen bakterilerin yaşayabilirliği üzerine 7.1 mT, 50 Hz ve 24 dakika elektromanyetik alan maruziyetinin etkileri araştırılmış ve koloni oluşturma sayısının maruziyetin akabinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında %15 azaldığı gösterilmiştir (119).

Cellini ve arkadaşları ise 50 Hz ve 0.1, 0.5, 1.0 mT manyetik alana 2 saate kadar maruziyetin *E.coli*'nin morfolojisini değiştirerek basiller formdan kokkoit forma dönüştürdüğünü bulmuştur. Kültür ortamında koklarla birlikte atipik uzunluklarda basillere rastlanmıştır. Ayrıca uygulanan 50 Hz elektromanyetik alanın fenotipik ve transkripsiyonel değişiklikleri indükleyerek bakteride bir stres faktörü gibi davrandığı düşünülmektedir (120).

Strasak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 2.7-10 mT, 50 Hz'lik maruziyetin *E.coli*'nin çoğalmasını negatif etkilediği, artan manyetik alan maruziyet süresi ve yoğunluğunun bakterinin koloni oluşturma kabiliyeti ve oksidoredüktif aktivitesini azaltarak bakterisidal etki ettiği ihtimali düşünülmektedir (121).

Strasak ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada 10 mT, 50 Hz manyetik alanın farklı şekildeki bakteri türlerinin çoğalması üzerine etkisi araştırılmış ve maruz kalan bakterilerin şekline bağlı olarak manyetik alan etkilerinin değiştiği gösterilmiştir. Manyetik alan maruziyeti basil şeklindeki bakterileri koklara kıyasla çok daha fazla etkilemiştir. Suşlardaki ve kullanılan manyetik alanlardaki farklılıkların elde edilen sonuçları önemli oranda değiştirdiği gösterilmiştir (122).

Gaffar ve arkadaşları 2 mT ve 50 Hz manyetik alan uygulamasının *E.coli* bakterisinin çoğalma ve antibiyotik duyarlılık özellikleri üzerine etkilerini araştırmıştır. Manyetik alan maruziyet süresine bağlı olarak bakterinin antibiyotik duyarlılığını değiştirmiştir. 6 saatlik bir maruziyet ile *E.coli* hücresi antibiyotiklere (amoksisilin, nalidiksik asit, eritromisin) karşı daha duyarlı bir hale gelirken 16 saatlik maruziyetin yine aynı antibiyotiklere karşı bakteriyi daha dirençli kıldığı gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları kullanılan manyetik alanın bakteride hücre duvarı, protein, nükleik asit ve esansiyel enzimlerin sentezini inhibe ederek, membran geçirgenliğini bozarak ilacın etki mekanizmasını değiştirdiğini belirtmektedir. Ayrıca 6 saatlik maruziyet *E.coli*'nin hücre uzunluğunu azaltırken, 16 saatlik uygulama ise sitoplazmik içeriğin çoğunu yok ederek hücre duvarının incelmeye böylece hücrenin uzamasına sebep olmuştur (34).

Segatore ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri 2 mT, 50 Hz ve 24 saat elektromanyetik alana

maruz bırakılmış üreme özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları değerlendirilmiştir. Sonuçta her iki bakteride kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında antibiyotik duyarlılıklarında ve üreme oranlarında dikkate değer bir farklılığa rastlanmamıştır. Etki mekanizmaları farklılık gösteren farklı sınıf antibiyotiklerin (kanamisin, amikasin, ampicilin, sefazolin, seftazidim, seftriakson, moksalaktam ve levofloksasin) varlığında elektromanyetik alanın her iki bakterinin antibiyotik duyarlılıklarına olan etkileri test edilmiştir ve minimum inhibisyon konsantrasyonlarında önemli bir değişikliğe rastlanmamıştır. Çalışmaya göre antibiyotik yokluğunda bakteri, elektromanyetik uyarıyı tanıyarak fizyolojik şartlarını buna göre düzenleyebilir ve hem sub-inhibitör konsantrasyonda antibiyotiğe hem de çok düşük frekanslı elektromanyetik alana maruz kaldığında olası kümülatif etkiler ortaya çıkabilir (123).

Çalışmamız izoniyazidin etki mekanizmasını aydınlatmak için ortama 10'ar μM H_2O_2 ve NAD'ı tek tek ve birlikte ilave ederek izoniyazide duyarlı ve dirençli *M. tuberculosis* suşlarında etkisini göstermeyi amaçladık. Dirençli suşlarda H_2O_2 ve NAD'nin tek tek ya da birlikte ilavesinin koloni sayıları üzerine herhangi bir etkisi olmazken ($p>0,05$), birlikte ilave edilen 10 μM H_2O_2 ve NAD, duyarlı suşlarda izoniyazidin etkinliğini dramatik bir şekilde artırarak bakteri üremesinin önemli düzeyde inhibe olmasına yol açtı ($p<0,05$). Bunun üzerine H_2O_2 ve NAD'ı değişen konsantrasyonlarda ilave ederek izoniyazidin etkinliğine doza bağlı etkiyi test etmeyi amaçladık.

Final konsantrasyonları 50, 100, 150 ve 200'er μM olacak şekilde, H_2O_2 ve NAD ilave ettiğimiz 4 deney grubunu karşılaştırdığımızda en etkin konsantrasyonun 100'er μM H_2O_2 ve NAD'ın birlikte ilave edilmesi ile sağlandığını gördük. Bu konsantrasyonda diğerlerine kıyasla izoniyazide duyarlı basillerin üremesi daha şiddetli bir şekilde inhibe oldu ($p<0,05$).

Argyrou ve arkadaşları yaptıkları çalışmada artan NAD ilavesinin ilacın etkin hali olan INH-NAD seviyelerini arttırdığını in vivo olarak göstermişlerdir (121).

Zhao ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada ilave peroksitin varlığında ve yokluğunda NAD ve NADH ilavesinin izoniyazid ile INH-NAD bileşiği oluşturma oranı üzerine etkisini in vivo olarak göstermiştir. H_2O_2 ilave edilmeksizin yapılan deneyde NADH, NAD'ye göre bileşik oluşturmada daha etkin iken ortama yavaş akılı H_2O_2 ilave edildiğinde, NAD'ın NADH'a göre 5 kat daha etkin olduğu gösterilmiştir. InhA enzim aktivitesi H_2O_2 'in olmadığı, 200 μM H_2O_2 olan ve yavaş akılı H_2O_2 'nin ilave edildiği deneylerle hem wild tip katG hem de S315T suşu ile yapılmış ve her

ikisinde de yavaş akılı H₂O₂ ilavesinin inhA enzim aktivitesini düşürmede daha etkin olduğu bulunmuştur. Wild tip suş ile yapılan çalışmada 200 µM H₂O₂ ilavesinin de enzim aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğü tespit edilmiştir (67).

Cade ve arkadaşlarının yaptığı başka bir in-vivo çalışmada ise farklı mutasyonlara sahip izoniyazide dirençli suşların çok farklı oksidan spesifik reaktiviteler gösterdiği yönündedir. Çalışmaya göre wild tip suş 400 µM H₂O₂ ilavesi ile çok daha fazla INH-NADH ürünü oluştururken daha düşük peroksit ilavesi daha az ürün oluşumuna neden olmaktadır. Peroksit ilave edilmeden oluşan ürün ise ilave edilenlere kıyasla son derece düşüktür. Farklı mutasyonlara sahip suşlarda bu oranlar oldukça farklı bulunmuştur (74).

Çalışmamızda deneylerimizi H₂O₂ ve NAD'yi ayrı ayrı ilave etmekle birlikte H₂O₂ ile NAD'yi birlikte ilave ederek de gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz sonuçlar bu iki maddenin belirli konsantrasyonlarının birbirlerinin etkilerini potansiyelize ederek izoniyazidin etkisi üzerine müspet etki yaptığını gösterdi.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular, gizemini hala koruyan izoniyazidin etki mekanizması ile *M. tuberculosis*'in geliştirmiş olduğu kompleks direnç mekanizmalarına ilişkin moleküler detayları aydınlatmaya yönelik yapılabilecek daha ileri araştırmalara şiddetle gereksinim duyulduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Manyetik alan maruziyeti membran geçirgenliğini artırmaktadır. Bunun tedavide kullanılabileceği yönünde bir takım yaklaşımlar rapor edilmiştir. Bunlardan bir tanesi, tümörlü dokulara lokal manyetik alan uygulanarak kemoterapotiklerin tümör hücreleri içerisine girişini artırarak daha az ilaçla daha fazla etki edilmesi yönündedir. Çalışmamızı planlarken, tüberküloz etkeni olan *M. tuberculosis*'e ait dirençli ve duyarlı suşların manyetik alana maruziyeti ile izoniyazide karşı hücre zarı geçirgenliğinin artırılarak bakteri içi ilaç konsantrasyonunun yükseltilmesi, böylece ilacın etkinliğinin artırılarak tedavi süresinin azaltılması yönünde hipotetik bir yaklaşıma sahiptik. Ancak manyetik alan uygulanması sonucu bu yönde olumlu değerlendirilebilecek herhangi bir etki göremedik. Mikobakterilerin mikolik asit taşıyan eşsiz hücre duvarı yapısı, diğer bakteri türlerinin ve memeli sistemlerdeki ökaryotik hücrelerin membran yapısından oldukça farklı ve komplekstir. Muhtemelen, ilaçlara ve çeşitli kimyasallara karşı koruyucu bariyer niteliğindeki özel zar yapısı sebebiyle, manyetik alan ökaryotik hücrelerdekine benzer bir etkiyi mikobakteri hücre duvarında gösteremedi.

2. Manyetik alanın oksido-redüksiyon yapan ve merkezinde metal atomu içeren enzimlerin aktivitesini değiştirdiği bilinmektedir. Bu etkiyi enzimin metal atomunun redoks potansiyelini etkileyerek gösterdiği düşünülmektedir. KatG demir atomu içeren bir enzim olup aktivite sırasında demir atomu +2 ve +3 yükseltgenme basamaklarında gidip gelerek redoks aktivitesi gösterir. Çalışmamızda manyetik alanın bu enzim aktivitesini değiştirmediyi belirledik. Oysa beklentimiz manyetik alanın enzim aktivitesini değiştirerek ilacın bakteri içi metabolizması üzerinden etkili olabileceği yönündeydi. Ancak bu etkiyi gözlemleyemedik.

3. NAD ve H₂O₂ pasif difüzyonla basil içine alınan bir ön ilaç olan izoniyazidin etkin hale getirilmesi sürecinde görev almaktadır. Biz de bu iki molekülü değişen konsantrasyonlarda ortama ilave ederek ilacın etki mekanizması üzerine olası rollerini aydınlatmayı amaçladık. Sonuçta NAD ve H₂O₂'in birlikte ilave edilmesi ile, izoniyazidin etkinliğinin dramatik bir şekilde arttığı gözlenmiştir. En güçlü etki 100 µM NAD ve H₂O₂ ilave edilen grupta ölçülmüştür. İzoniyazid ilaç formuna getirilirken nanopartiküller içerisine hapsedilmiş NAD ve hidrojen peroksit ilaç formulasyonuna eklenerek daha az ilaçla daha kısa süreli ve daha etkin tedavi hedeflenebilir. Bu konuda

farmasötik teknoloji ile işbirliği içerisinde formülasyon ve etki çalışmaları planlanmalıdır.

4. *M.tuberculosis* üzerine manyetik alanın etkinliğinin incelendiği çalışmamız invivo deney modelleriyle de araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Aile Hekimleri İçin Tüberküloz El Kitabı. Ankara İl Sağlık Müdürlüğü. Arabula EA, Şimşek AÇ, Özlü A. (eds). Ankara, 2011.
2. Iseman MD. Klinisyenler İçin Tüberküloz Kılavuzu. Çeviren: Ş. Özkara. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 2002.
3. Klimik Derneği Tüberküloz Çalışma Grubu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu Kitabı. Samsun. 2003.
4. Barış İY, Tüberküloz Tarihi. *Klinik Gelişim* 2010, 23(3): 56-9.
5. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tüberküloz 2007.
6. Özkara Ş, Kılıçaslan Z. (editörler). Tüberküloz. İstanbul, Toraks Kitapları 2010.
7. Seber E. Tüberkülozun Dünü. *Ankem Derg* 2010, 24: 52-60.
8. Çalışır H. Dünya'da ve Türkiye'de tüberküloz. *Klinik Gelişim* 2007, 20(1): 57-61.
9. Günal S. Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarının IS6110RFLP (restriction fragment length polymorphism) ve spoligotyping profillerinin belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2006.
10. Durupınar B. Mikobakteriler ve Çevre Koşullarına Dayanıklılıkları. *O.M.Ü. Tıp Dergisi* 1996, 13(4): 297-304.
11. Yarpuzlu M, Ülger M, Aslan G, Tezcan S, Köksel O, Çalikoğlu M, İlvan A, Emekdaş G. Tüberküloz Plörezili 69 Hastanın Değerlendirilmesi ve Antitüberküloz İlaç Duyarlılıklarının İrdelenmesi. *Ankem Derg* 2013, 27(1): 31-7.
12. Kaptan F. Tüberküloz Menenjit. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2005, 19(1): 129-138.
13. Özşahin SL. Tüberküloz Bakteriyolojisi *T Klin Tıp Bilimleri* 1994, 14: 404-8.
14. Kaya NM, Sarıbaş Z. Mikobakterilerde Dışa Atım Pompaları ve İlaç Direnci. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2012, 42(3): 81-4.

15. Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory Research* 2001, 2(3): 164-8.
16. Trauner A, Borrell S, Reither K, Gagneux S. Evolution of drug resistance in tuberculosis: recent progress and implications for diagnosis and therapy. *Drugs* 2014, 74(10): 1063-72.
17. Black PA, Warren RM, Louw GE, van Helden PD, Victor TC, Kana BD. Energy Metabolism and Drug Efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014, 58(5): 2491-503.
18. Sarathy JP, Dartois V, Lee EJ. The role of transport mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance and tolerance. *Pharmaceuticals (Basel)* 2012, 5(11): 1210-35.
19. Machado D, Couto I, Perdigao J, Rodrigues L, Portugal I, Baptista P, Veigas B, Amaral L, Viveiros M. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos One* 2012, 7(4): e34538.
20. Cook GM, Hards K, Vilcheze C, Hartman T, Berney M. Energetics of Respiration and Oxidative Phosphorylation in Mycobacteria. *Microbiol Spectr* 2014, 2(3).
21. Kılıçaslan Z. Tüberküloz Epidemiyolojisi. *Türkiye'de Verem Savaşı Dergisi* 2011, 3: 20-5.
22. Türk Göğüs Hastalıkları Yeterlik Kurulu Tüberküloz Kitabı <http://file.lookus.net/TGHYK/tghyk.13.pdf> 28 Kasım 2014.
23. Sevim T. Tüberküloz Patogenezi ve Doğal Seyri. *Klinik Gelişim* 2007, 20(1): 5-8.
24. Özbal Y. Tüberküloz İmmünolojisi. *Erciyes Tıp Dergisi* 2006, 28(1): 25-34.
25. Karlıkaya C. Tüberküloz Enfeksiyonu-Bulaşı. *Türkiye'de Verem Savaşı Dergisi* 2011, 3: 45-6.
26. Özkara Ş, Aktaş Z, Özkan S, Ecevit H. Türkiye'de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı. T. C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı. 2003.
27. Hacıevliyagil SS. Tüberküloz'da Bulaşma. http://www.verem.org.tr/pdf/tuberkuloz_bulasma.pdf 15 Nisan 2014.

28. Durmaz R. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısında Yenilikler: İdentifikasyonda Yeni Yöntemler. Klimik 2013 XVI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Antalya, 2013.
[http:// www.klimik.org.tr/klimik2013](http://www.klimik.org.tr/klimik2013) 20 Ekim 2014.
29. Tüberküloz Tanı ve Tedavi Rehberi, T.C. Sağlık Bakanlığı. Ankara, 2011.
30. Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberi T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Ankara – 2014 Aydoğdu Ofset.
31. Özyurt M. Akciğer ve Akciğer Dışı Tüberküloz Tanısında Moleküler Yöntemlerin Kullanımı. *Mikrobiyol Bul* 2012, 46(2): 319-31.
32. Yüce A, Ceyhan İ, Sürücüoğlu S, Uzun M, Özyurt M, Sarıgüzel Sar N. V. Tüberküloz Sempozyumu ve VI. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kursu Kitabı. Ankara, 2007.
33. Yüce A, Ayyıldız A, Özyurt M, Uzun M, Sürücüoğlu S, Sarıgüzel Sar N. VIII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı. Erzurum, 2009.
34. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı Nobel Tıp Kitapevleri 2001, 15–35.
35. Alp A, Pınar A, Eser Ö, Sarıbaş Z, Ergünay K. Real-Time PCR Kursu. Ankara, 2012.
36. Aslan G, Delialioğlu N, Yıldız Ç, Direkel Ş, Emekdaş G. *Mycobacterium tuberculosis* Suşlarının Primer Antitüberküloz İlaçlara Karşı Duyarlılığının Belirlenmesinde Bactec 460 ve Agar Proporsiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2007, 21 (2): 75-80.
37. Durmaz R. Tüberkülozda Hızlı Moleküler Tanı Testleri. *Ankem Derg.* 2012, 26(2): 72-81.
38. Tansel Ö. Antitüberküloz İlaçlara Karşı Direnç Mekanizmaları ve Türkiye’de Durum. Klimik 2003 XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi.
39. Durmaz R. *Mycobacterium tuberculosis*’de direnç sorunu. *Ankem Derg.* 2005, 19: 107-10.
40. Özkara Ş. Yaygın İlaç Dirençli Tüberküloz. *Solunum Hastalıkları*, 2007, 18: 88-92.

41. Baylan O. Çok İlaça Dirençli Tüberkülozdan Sonra Yaygın İlaça Dirençli ve Tüm İlaçlara Dirençli Tüberküloz Formları: Eski Hastalığın Yeni Yüzleri. *Mikrobiyol Bul* 2011, 45(1): 181-95.
42. Kongar N. Tüberküloz. *Klinik Gelişim* 2013, 26(1): 33-44.
43. Luckner SR, Liu NN, Ende CWA, Tonge PJ, Kisker C. A Slow, Tight Binding Inhibitor of InhA, the Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285(19): 14330-7.
44. Whitney JB, Wainberg MA. Isoniazid, The Frontline of Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *MJM* 2002, 6(2): 114-23.
45. Da Silva PEA, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011, 66(7): 1417-30.
46. Niki M, Tateishi Y, Ozeki Y, Kirikae T, Lewin A, Inoue Y, Matsumoto M, Dahl JL, Ogura H, Kobayashi K, Matsumoto S. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry* 2012, 287(33): 27743-52.
47. Guo HL, Seet Q, Denkin S, Parsons L, Zhang Y. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *Journal of Medical Microbiology* 2006, 55(11): 1527-31.
48. Wiseman B, Carpena X, Feliz M, Donald LJ, Pons M, Fita I, Loewen PC. Isonicotinic Acid Hydrazide Conversion to Isonicotinyl-NAD by Catalase-peroxidases. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285(34): 26662-73.
49. Suarez J, Rangelova K, Schelvis JPM, Magliozzo RS. Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Peroxidase Intermediate Bypass Causes Poor Isoniazid Activation by the S315G Mutant of *M.tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG). *Journal of Biological Chemistry* 2009, 284(24): 16146-55.
50. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2009, 13(11): 1320-30.

51. Keser S. Civanperçemi (*Achillea millefolium*), Alıç (*Crataegus monogyna*) ve Böğürtlen (*Rubus discolor*)'in Toplam Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Oksidatif Stres Oluşturulmuş Ratlarda Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyokimya Anabilim Dalı. Doktora tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, 2012.
52. Eason MM, Fan X. The role and regulation of catalase in respiratory tract opportunistic bacterial pathogens. *Microb Pathog* 2014, 74: 50-8.
53. Timmins GS, Deretic V. Mechanisms of action of isoniazid. *Molecular Microbiology* 2006, 62(5): 1220-7.
54. Singh R, Wiseman B, Deemagarn T, Donald LJ, Duckworth HW, Carpena X, Fita I, Loewen PC. Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279(41): 43098-106.
55. Awasthy D, Ambady A, Narayana A, Morayya S, Sharma U. Roles of the two type II NADH dehydrogenases in the survival of *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Gene* 2014, 550(1): 110-6.
56. Bartos M, Falkinham JO, Pavlik I. Mycobacterial catalases, peroxidases, and superoxide dismutases and their effects on virulence and isoniazid-susceptibility in mycobacteria - a review. *Veterinarni Medicina* 2004, 49(5): 161-70.
57. Liao D, Fan Q, Bao L. The Role of Superoxide Dismutase in the Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in Macrophages. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2013, 66(6): 480-8.
58. Purkan, Ihsanawati, Syah YM, Retnoningrum DS, Noer AS, Shigeoka S, Natalia D. Novel mutations in katG gene of a clinical isolate of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Biologia* 2012, 67(1): 41-7.
59. Rawat R, Whitty A, Tonge PJ. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: Adduct affinity and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100(24): 13881-6.
60. Ducasse-Cabanot S, Cohen-Gonsaud M, Marrakchi H, Nguyen M, Zerbib D, Bernadou J, Daffe M, Labesse G, Quemard A. In vitro inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase MabA by isoniazid. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48(1): 242-9.

61. Forbes LV, Furtmuller PG, Khalilova I, Turner R, Obinger C, Kettle AJ. Isoniazid as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: Identification of amine adducts and the influence of superoxide dismutase on their formation. *Biochemical Pharmacology* 2012, 84(7): 949-60.
62. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaiia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998, 393:537-44.
63. Lin SYG, Desmond EP. Molecular Diagnosis of Tuberculosis and Drug Resistance. *Clin Lab Med* 2014, 34(2): 297-314.
64. Jakopitsch C, Vlasits J, Wiseman B, Loewen PC, Obinger C. Redox intermediates in the catalase cycle of catalase-peroxidases from *Synechocystis* PCC 6803, *Burkholderia pseudomallei*, and *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 2007, 46(5): 1183-93.
65. Smulevich G, Jakopitsch C, Droghetti E, Obinger C. Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *Journal of Inorganic Biochemistry* 2006, 100(4): 568-85.
66. Martins D, English AM. Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. *Redox Biology* 2014, 2: 308-13.
67. Zhao XB, Yu H, Yu SW, Wang F, Sacchettini JC, Magliozzo RS. Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant. *Biochemistry* 2006, 45(13): 4131-40.
68. Njuma OJ, Ndontsa EN, Goodwin DC. Catalase in peroxidase clothing: Interdependent cooperation of two cofactors in the catalytic versatility of KatG. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2014, 544: 27-39.

69. Ghiladi RA, Knudsen GM, Medzihradzky KF, Ortiz de Montellano PR. The Met-Tyr-Trp cross-link in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG): autocatalytic formation and effect on enzyme catalysis and spectroscopic properties. *Journal of Biological Chemistry* 2005, 280(24): 22651-63.
70. Singh R, Wiseman B, Deemagarn T, Jha V, Switala J, Loewen PC. Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008, 471(2): 207-14.
71. Bertrand T, Eady NAJ, Jones JN, Nagy JM, Jamart-Gregoire B, Raven EL, Brown KA. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279(37): 38991-9.
72. Yu S, Girotto S, Lee C, Magliozzo RS. Reduced affinity for Isoniazid in the S315T mutant of *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a key factor in antibiotic resistance. *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278(17): 14769-75.
73. Rangelova K, Suarez J, Magliozzo RS, Mason RP. Spin Trapping Investigation of Peroxide- and Isoniazid-Induced Radicals in *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase. *Biochemistry* 2008, 47(43): 11377-85.
74. Cade CE, Dlouhy AC, Medzihradzky KF, Salas-Castillo SP, Ghiladi RA. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. *Protein Science* 2010, 19(3): 458-74.
75. Ghiladi RA, Cabelli DE, Ortiz de Montellano PR. Superoxide reactivity of KatG: insights into isoniazid resistance pathways in TB. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126(15): 4772-3.
76. Vilcheze C, Weisbrod TR, Chen B, Kremer L, Hazbon MH, Wang F, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR, Jr. Altered NADH/NAD⁺ ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49(2): 708-20.
77. Wang XD, Gu J, Wang T, Bi LJ, Zhang ZP, Cui ZQ, Wei HP, Deng JY, Zhang XE. Comparative analysis of mycobacterial NADH pyrophosphatase isoforms reveals a novel mechanism for isoniazid and ethionamide inactivation. *Molecular Microbiology* 2011, 82(6): 1375-91.

78. Guo HL, Seet Q, Denkin S, Parsons L, Zhang Y. Molecular characterization of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. *Journal of Medical Microbiology* 2006, 55(11): 1527-31.
79. Caws M, Tho DQ, Duy PM, Lan NTN, Hoa DV, Torok ME, Chau TTH, Chau NVV, Chinh NT, Farrar J. PCR-restriction fragment length polymorphism for rapid, low-cost identification of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2007, 45(6): 1789-93.
80. Dias MVB, Vasconcelos IB, Prado AMX, Fadel V, Basso LA, De Azevedo WF, Santos DS. Crystallographic studies on the binding of isonicotinyl-NAD adduct to wild-type and isoniazid resistant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Structural Biology* 2007,159(3): 369-80.
81. Lu H, Tonge PJ. Inhibitors of FabI, an enzyme drug target in the bacterial fatty acid biosynthesis pathway. *Acc Chem Res* 2008, 41(1): 11-20.
82. Holas O, Ondrejcek P, Dolezal M. *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase inhibitors as potential antituberculars: development in the past decade. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2014: 1-20.
83. Rotta M, Pissinate K, Villela AD, Back DF, Timmers LFSM, Bachega JFR, de Souza ON, Santos DS, Basso LA, Machado P. Piperazine derivatives: Synthesis, inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase and SAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2015, 90: 436-47.
84. Khan S, Nagarajan SN, Parikh A, Samantaray S, Singh A, Kumar D, Roy RP, Bhatt A, Nandicoori VK. Phosphorylation of Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase InhA Impacts Mycobacterial Growth and Survival. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285(48): 37860-71.
85. Rozwarski DA, Vilcheze C, Sugantino M, Bittman R, Sacchettini JC. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate. *Journal of Biological Chemistry* 1999, 274(22): 15582-9.
86. Pan P, Tonge PJ. Targeting InhA, the FASII Enoyl-ACP Reductase: SAR Studies on Novel Inhibitor Scaffolds. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2012, 12(7): 672-93.

87. Leung CC, Rieder HL, Lange C, Yew WW. Treatment of latent infection with *Mycobacterium tuberculosis*: update 2010. *Eur Respir J* 2011, 37(3): 690-711.
88. Mahapatra S, Woolhiser LK, Lenaerts AJ, Johnson JL, Eisenach KD, Joloba ML, Boom WH, Belisle JT. A novel metabolite of antituberculosis therapy demonstrates host activation of isoniazid and formation of the isoniazid-NAD⁺ adduct. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56(1): 28-35.
89. World Health Organization Tuberculosis Report 2013.
90. Kılçaslan Z. Sağlıkta Dönüşüm ve Tüberküloz Kontrolü. *Klinik Gelişim* 2007, 20(1): 82-5.
91. Türk Tabipler Derneği Tüberküloz Raporu 2012.
92. Aslan D. Halk Sağlığı Bakış Açısıyla Sosyal Açıdan Damgalayıcı Bir Hastalık: Tüberküloz. *Klinik Gelişim* 2007, 20(1): 86-90.
93. Öztürk, R. Tüberküloz Epidemiyolojisi. IV Tüberküloz Sempozyumu 9-11 Aralık, Malatya, 2005, Sayfa: 23-32.
94. World Health Organization Tuberculosis Report 2014.
95. Hashish AH, El-Missiry MA, Abdelkader HI, Abou-Saleh RH. Assessment of biological changes of continuous whole body exposure to static magnetic field and extremely low frequency electromagnetic fields in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2008, 71(3): 895-902.
96. TEMKODER (Elektromanyetik Kirliliği Önleme, Ölçme, Araştırma ve Eğitim Derneği) "Elektromanyetik Alanların İnsan Sağlığına Etkileri Çalıştay Sonuç Raporu." 2014. Cem Veb Ofset, Ankara.
97. TMMOB Elektrik Mühendisleri Odası (İzmir) "Elektromanyetik Alanların Etkileri."
http://www.emo.org.tr/ekler/99bb08f940d7461_ek.pdf 17 Ağustos 2014
98. Erol Ö, Oldacay S, Erdem G. *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* Suşlarının Elektromanyetik Alandaki Üreme Davranışları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2003, 33: 191-6.
99. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, 2002, vol 80.
100. Cifra M, Fields JZ, Farhadi A. Electromagnetic cellular interactions. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 2011, 105(3): 223-46.

101. Ciejka E, Kleniewska P, Skibska B, Goraca A. Effects of Extremely Low Frequency Magnetic Field on Oxidative Balance in Brain of Rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2011, 62(6): 657-61.
102. Goraca A, Ciejka E, Piechota A. Effects of Extremely Low Frequency Magnetic Field on the Parameters of Oxidative Stress in Heart. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2010, 61(3): 333-8.
103. Mostafa RM, Moustafa YM, Ali FM, Shafik A. Sex hormone status in male rats after exposure to 50 Hz, 5 mTesla magnetic field. *Archives of Andrology* 2006, 52(5): 363-9.
104. Santini MT, Ferrante A, Rainaldi G, Indovina P, Indovina PL. Extremely low frequency (ELF) magnetic fields and apoptosis: a review. *International Journal of Radiation Biology* 2005, 81(1): 1-11.
105. Akdag MZ, Dasdag S, Uzunlar AK, Ulukaya E, Oral AY, Celik N, Aksen F. Can safe and long-term exposure to extremely low frequency (50 Hz) magnetic fields affect apoptosis, reproduction, and oxidative stress? *International Journal of Radiation Biology* 2013, 89(12): 1053-60.
106. Wolf FI, Torsello A, Tedesco B, Fasanella S, Boninsegna A, D'Ascenzo M, Grassi C, Azzena GB, Cittadini A. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: Possible involvement of a redox mechanism. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 2005, 1743(1-2): 120-9.
107. Hardell L, Sage C. Biological effects from electromagnetic field exposure and public exposure standards. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2008, 62(2): 104-9.
108. Rollwitz J, Lupke M, Simko M. Fifty-hertz magnetic fields induce free radical formation in mouse bone marrow-derived promonocytes and macrophages. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 2004, 1674(3): 231-8.
109. Simko M, Mattsson MO. Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: Possible immune cell activation. *Journal of Cellular Biochemistry* 2004, 93(1): 83-92.
110. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Di Giulio M, Robuffo I, Trubiani O, Mariggio MA. Bacterial response to the exposure of 50 Hz electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 2008, 29(4): 302-11.

111. Inhan-Garip A, Aksu B, Akan Z, Akakin D, Ozaydin AN, San T. Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on growth rate and morphology of bacteria. *International Journal of Radiation Biology* 2011, 87(12): 1155-61.
112. Jena L, Waghmare P, Kashikar S, Kumar S, Harinath BC. Computational approach to understanding the mechanism of action of isoniazid, an anti-TB drug. *International Journal of Mycobacteriology* 2014, 3:276-82.
113. Saunders RD, Jefferys JG. A neurobiological basis for ELF guidelines. *Health Phys.* 2007, 92: 596-603.
114. Batçioğlu K, Öztürk İÇ, Atalay S, Doğan D, Bayrı N, Demirtaş H. Investigation of time dependent magnetic field effects on superoxide dismutase and catalase activity: an in vitro study. *JBPC* 2002, 2:1-5.
115. Batçioğlu K, Doğan M, Uyumlu AB, Satılmış B, Bayrı N, Atalay S, Demirtaş H. Investigation of a weak magnetic field effect on the in vitro catalytic activity of adenosine deaminase and xanthine oxidase. *Gen. Physiol. Biophys.* 2011, 30: 410-4.
116. Bayir E, Bilgi E, Sendemir-Urkmez A, Hames-Kocabas EE. The effects of different intensities, frequencies and exposure times of extremely low-frequency electromagnetic fields on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Electromagnetic Biology and Medicine* 2015, 34(1): 14-8.
117. Fojt L, Klapetek P, Strasak L, Vetterl V. 50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. *Micron* 2009, 40(8): 918-22.
118. Fojt L, Strasak L, Vetterl V, Smarda J. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry* 2004, 63(1-2): 337-41.
119. Fojt L, Strasak L, Vetterl V. Extremely-low frequency magnetic field effects on sulfate reducing bacteria viability. *Electromagnetic Biology and Medicine* 2010, 29(4): 177-85.
120. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Di Giulio M, Robuffo I, Trubiani O, Mariggio MA. Bacterial response to the exposure of 50 Hz electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 2008, 29(4): 302-11.
121. Strasak L, Vetterl V, Smarda J. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. *Bioelectrochemistry* 2002, 55(1-2): 161-4.

122. Strasak L, Vetterl V, Fojt L. Effects of 50 Hz Magnetic Fields on the Viability of Different Bacterial Strains. *Electromagnetic Biology and Medicine* 2005, 24: 293–300.
123. Gaaffar EA, Hanafy MS, Tohamy EY, Ibrahim MH. Stimulation and control of *E. coli* by Using an Extremely Low Frequency Magnetic Field. *Romanian J. Biophys.*, 2006, 16(4): 283–96.
124. Segatore B, Setacci D, Bennato F, Cardigno R, Amicosante G, Iorio R. Evaluations of the Effects of Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields on Growth and Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Microbiol* 2012: 587293.
125. Argyrou A, Vetting MW, Blanchard JS. New insight into the mechanism of action of and resistance to isoniazid: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase with INH-NADP. *Journal of the American Chemical Society* 2007, 129(31): 9582-3.

ÖZGEÇMİŞ

1984 Eskişehir doğumluyum. 2002 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ni kazanıp 2006 yılında mezun oldum. 2012 yılında Malatya İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

Şu an Malatya Sağlık Sosyal Güvenlik Merkezi'nde çalışmaktayım. Evli ve iki çocuk annesiyim.