

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*'İN ÜREME HIZI ÜZERİNE  
*PISTACIA EURYCARPA*'DAN ELDE EDİLEN DEĞİŞİK ÖZÜTLERİN VE  
BAZİ VİTAMİNLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Merih ŞİMŞEK**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Nedim SULTAN

ANKARA  
Eylül 2011

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

***MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*'İN ÜREME HIZI ÜZERİNE  
*PISTACIA EURYCARPA*'DAN ELDE EDİLEN DEĞİŞİK ÖZÜTLERİN VE  
BAZI VİTAMİNLERİN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Merih ŞİMŞEK**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Nedim SULTAN

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından 01/2010-91 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA  
Eylül 2011

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

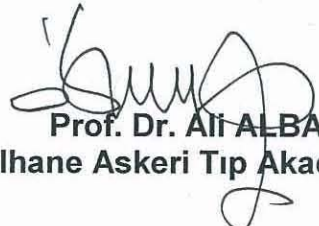
Tez Savunma Tarihi : 16/9/2011

Prof. Dr. Nedim SULTAN  
Gazi Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR  
Gazi Üniversitesi

  
Prof. Dr. Meltem YALINAY ÇIRAK  
Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Deniz ERBAŞ  
Gazi Üniversitesi

  
Prof. Dr. Ali ALBAY  
Gülhane Askeri Tıp Akademisi

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>Kabul ve Onay</b>	<b>I</b>
<b>İçindekiler</b>	<b>II</b>
<b>Şekiller, Resimler</b>	<b>V</b>
<b>Tablolar, Grafikler</b>	<b>VI</b>
<b>Kısaltmalar</b>	<b>VIII</b>
<b>Önsöz</b>	<b>X</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Mikobakterilerin sistematikteki yeri	4
2.2. Morfoloji	6
2.3. Hücre duvarı	7
2.3.1. Peptidoglikan yapı	9
2.3.2. Arabinogalaktan(AG)	9
2.3.3. Mikolik asitler	10
2.3.4. Açil-trehalozlar	12
2.3.5. Oligosakkarid içeren lipidler	13
2.3.6. Fosfatidilinositol'ün glikozil türevleri	14
2.4. Kapsül	15
2.5. Tüberküloz basilinin genom yapısı	16
2.6. Mikobakterilerin kültür özellikleri	16
2.7. Epidemiyoloji	17
2.8. Tüberküloz için enfeksiyon riskleri	18
2.9. Tüberkülozda immünoloji	18
2.10. Tüberkülozda patogeneze	20
2.10.1. Primer enfeksiyon	20
2.10.2. Sekonder enfeksiyon	21
2.10.3. Akciğer dışı tüberküloz	22

	<b>Sayfa No</b>
2.11. Mikobakterilerin laboratuvar tanısı	22
2.11.1. Uygun örnek alma esasları	23
2.11.2. Örneklerin işlenmesi	24
2.11.3. Mikroskopik inceleme	25
2.11.4. Kültür	25
2.11.5. Moleküler biyolojik tanı yöntemleri	28
2.11.6. Mikobakterilerin identifikasyonunda kullanılan fenotipik özellikler	30
2.11.7. Tüberkülin deri testi	30
2.11.8. Mikobakteri enfeksiyonlarında serolojik tanı	32
2.12. Tüberkülozun tedavisi	34
2.12.1. Tüberküloz tedavisinde uyulması gereken kurallar	34
2.12.2. Tüberküloz tedavi sürecinin takibi	35
2.12.3. Tüberkülozda ilaç direnci	36
2.13. Tüberkülozdan korunma	37
2.14. Lipidler	39
2.14.1. Lipidlerin sınıflandırılmaları	39
2.14.2. Yağ asitleri	40
2.14.3. Bakterilerde lipid biyosentezi	46
2.15. <u><i>Pistacia eurycarpa</i></u>	48
2.16. Vitaminler	52
2.17. Bitkisel yağların ve diğer özütlerin elde edilmesi ve tanımlanması	56
2.17.1. Ekstraksiyon	56
2.17.2. Ekstraksiyon yöntemleri	56
2.18. Kromatografik yöntemler	61
2.18.1. Gaz kromatografisi	61
2.18.2. Sıvı kromatografisi	65

	<b>Sayfa No</b>
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>66</b>
3.1. Gereçler	66
3.2. Deneyde kullanılan bakteriler	67
3.3. Etkisi incelenen bitki meyvaları	68
3.4. Deneylerde kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları	69
3.5. Elde edilen yağ asitleri	70
3.6. Deneyde kullanılan vitaminler	70
3.7. Ham kabuk ve meyva özütünün hazırlanması	71
3.8. Soxhlet ekstraksiyonu (Katı sıvı ekstrasyonu) ile sabit yağ miktarı tayini	71
3.9. Yağların Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile Analizi	74
3.9.1. Sabit yağların metilleme işlemi ( Yağların <i>trans</i> -metil esterifikasyonu reaksiyonu)	75
3.10. <i>P.eurycarpa</i> kabuk ve meyvasının suda çözünen ekstraksiyon örneklerinin hazırlanması ve besiyerlerine eklenmesi	76
3.11. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 'in üreme hızı üzerine etkisi incelenen farklı özütler ve vitaminlerin deneyde kullanılması	77
3.12. İstatiksel Analiz	82
<b>4. BULGULAR</b>	<b>83</b>
4.1. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi Yöntemiyle meyva ve kabuğunda belirlenen yağ asitleri	84
<b>5.TARTIŞMA</b>	<b>101</b>
<b>6. SONUÇ</b>	<b>103</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>116</b>
<b>8 SUMMARY</b>	<b>118</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>120</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>132</b>

<b>ŞEKİLLER</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1:Mikobakteri hücre duvarı	8
Şekil 2: Mikolik asit yapısı	10
Şekil 3: <i>M.tuberculosis</i> 'in hücre duvarının şematik görünümü	15
Şekil 4:Yağ asitlerinin genel formülleri	40
Şekil 5:Doymuş yağ asitlerinin yapı formülü	41
Şekil 6: Doymamış yağ asitlerinin yapı formülü	43
Şekil 7: Doymamış yağ asitlerinin cis-trans izomerleri	44
Şekil 8: Yabani <i>Pistacia</i> türlerinin Türkiye'de bulunduğu yerler	50
Şekil 9: Soxhlet ekstraksiyon cihazı	58
Şekil 10: Gaz kromatografisi uygulama şeması	62
Şekil 11: MBA besiyerinde test edilecek maddeler için 1. plak planı	80
Şekil 12: MBA besiyerinde test edilecek maddeler için 2. plak planı	80

## **RESİMLER**

Resim 1: <i>P. eurycarpa</i> 'nın meyvaları	69
Resim 2: Lipidlerin ekstraksiyon işlemi	73
Resim 3: Soxhlet cihazı ve ekstraksiyon solventinin uzaklaş tırılması	73
Resim 4: <i>P.eurycarpa</i> 'nın meyvası ve katmanları	76
Resim 5: Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometri Sistemi	84
Resim 6: Bir <i>M.tuberculosis</i> suşunun MBA'da <i>P.eurycarpa</i> 'nın suda çözünen özütleri varlığında 11.günde üreme durumunun kontrol ile karşılaştırılması	93
Resim 7: Bir <i>M.tuberculosis</i> suşunun MBA'da <i>P.eurycarpa</i> 'nın suda çözünen özütleri varlığında 9.günde üreme durumunun kontrol ile karşılaştırılması	94
Resim 8: Bir <i>M.tuberculosis</i> suşunun MBA'da <i>P.eurycarpa</i> 'nın suda çözünen özütleri varlığında 7.günde üreme durumunun kontrol ile karşılaştırılması	95

## Sayfa No

Resim 9: Bir <i>M.tuberculosis</i> suşunun LJ'de <i>P.eurycarpa</i> 'nın suda çözünen meyva özütü varlığında 11.günde üreme durumunun kontrol ile karşılaştırılması	96
Resim 10: Bir <i>M.tuberculosis</i> suşunun LJ' de <i>P.eurycarpa</i> 'nın suda çözünen meyva özütünde 14.günde üreme durumunun kontrol ile karşılaştırılması	97

## GRAFİKLER

Grafik 1: <i>Pistacia eurycarpa</i> meyva kabuğundan ekstrakte edilmiş lipitlerin içerdiği yağ asitlerine ait kromatogram	85
Grafik 2: <i>Pistacia eurycarpa</i> meyvasından ekstrakte edilmiş lipitlerin içerdiği yağ asitlerine ait kromatogram	85

## TABLolar

Tablo 1: Doymuş yağ asitleri genel formülleri ve isimleri	42
Tablo 2: Farklı ülkelerdeki <i>Pistacia</i> türleri	49
Tablo 3: <i>Pistacia eurycarpa</i> meyva ve meyva kabuğundan ekstrakte edilmiş lipitlerde GC-MS yöntemi ile belirlenen yağ asitleri, % oranları, karbon ve çift bağ sayıları	86
Tablo 4: 11 farklı değişken katkı maddesi varlığında Löwenstein Jensen besiyerinde <i>M.tuberculosis</i> complex suşlarının üreme zamanları (gün)	88
Tablo 5: 11 farklı değişken katkı maddesi varlığında Löwenstein Jensen besiyerinde <i>M.tuberculosis</i> complex suşlarının üreme zamanları (gün)	89



**Sayfa No**

Tablo 6: 11 farklı değişken katkı maddesi varlığında Middle Brook Agar besiyerinde <i>M.tuberculosis</i> complex suşlarının üreme zamanları	90
Tablo 7: 11 farklı değişken katkı maddesi varlığında Middle Brook Agar besiyerinde <i>M.tuberculosis</i> complex suşlarının üreme zamanları	91
Tablo 8: LJ besiyerine 1 den 11.maddeye kadar eklenen maddelerin 40 bakteri suşu için gün olarak üreme zamanlarının ortanca, minumum, maksimum değerleri ve kontrol grubuna göre önemlilik test sonuçları	98
Tablo 9: LJ besiyerine 13' ten 23. maddeye kadar eklenen maddelerin 40 bakteri için gün olarak üreme zamanlarının ortanca, minumum, maksimum değerleri ve kontrol grubuna göre önemlilik test sonuçları	98
Tablo 10: MBA besiyerine 1'den 11.maddeye kadar eklenen maddelerin 40 bakteri için gün olarak üreme zamanlarının ortanca, minumum, maksimum değerleri ve kontrol grubuna göre önemlilik test sonuçları	99
Tablo 11: MBA besiyerine 13'den 23.maddeye kadar eklenen maddelerin gün olarak üreme zamanlarının ortanca, minumum, maksimum değerleri ve kontrol grubuna göre önemlilik test sonuçları	99
Tablo 12: LJ ve MBA besiyerlerinde 40 farklı suşun üreme zamanları istatistiksel değerler ve üreme zamanı arasındaki farkın önemlilik test sonucu	100

## KISALTMALAR

AIDS	: Acquired immune deficiency syndrome
AG	: Arabinogalaktan
AGP	: Arabinogalaktan
AraLAM	: Arabinan lipoarabinomanan
ARB	: Asido-Resistan Boyama
BAL	: Bronko alveolar lavaj
BCG	: Bacille-Calmette-Guerin
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CF	: Kord faktör
ÇİD-TB	: Çoklu ilaç dirençli tüberküloz
DAP	: Diaminopimelik asit
DAT	: Di-açıl-trehaloz
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
EMB	: Etambutol
ETH	: Etionamid
EZN	: Ehrlich- Ziehl-Neelsen
FID	: Flame ionization detector
GC-MS	: Gaz kromatografisi- kütle spektromerisi
HIV	: Human İmmunodeficiency Virus
HPLC	: High-Pressure Liquid Chromatography
INH	: İzoniazid
LAM	: Lipoarabinomannan
LM	: Lipomannan
LJ	: Löwenstein Jensen besi yeri
LZR	: Ligaz Zincir Reakasyonu
MOTT	: <i>M.tuberculosis</i> kompleks dışındaki mikobakteriler
MTBC	: <i>M.tuberculosis</i> kompleks
ManLAM	: mannoz lipoarabinomanan

mAGP	: Mycolylarabinogalaktan peptidoglikan
MBA	: Middle brook agar
MDR	: Multi-Drug-Resistant
MGIT	: Mycobacteria Growth Indicator Tube
MHC	: Major doku uygunluk kompleksine
NALC	: NAsetil-L-Sistein
NAP	: p-nitro-asetilamino-hidroksi propiyofenon
PANTA	: PolimixinB, amfoterisinB, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosilin
PAS	: Para-amino salisilik asit
PG	: Peptidoglikan
PGL	: Fenol glikolipidler
PI	: Fosfatidilinositol
PILAM	: Fosfomiyoinositol lipoarabinomanan
PPD	: Purifiye protein derivesi
PZA	: Pirazinamid
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RBT	: Rifabutin
RIF	: Rifampisin
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
SM	: Streptomisin
TAT	: Tri-açil-trehaloz
TAT	: Trehaloz-6,6-dimikolat
TB	: Tüberküloz
TDM	: $\alpha,\alpha'$ trehaloz dimikolat
TDT	: Tüberkülin deri testi
TMM	: $\alpha,\alpha'$ trehaloz monomikolat
XDR	: Extensively Drug-Resistant
YİD-TB	: Yaygın ilaç dirençli tüberküloz

## ÖNSÖZ

Tüberküloz asırlardan beri olduğu gibi günümüzde de önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir. Halen dünyada tüm insanların üçte biri tüberküloz basili ile enfekte durumdadır ve her yıl yaklaşık iki milyon insanın ölümüne neden olmaktadır. Antitüberküloz ilaçlara gelişen dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisi oldukça güç ve zaman alıcıdır. Bu dirençli suşların toplum içinde yayılması tehlikeyi daha da büyütmektedir.

Tüberküloz ile mücadelede en önemli adım hastaların süratle tanımlanması, bulaşıcılık dönemlerinde kontrol altında tutulmaları ve tedavilerinin yapılmasıdır. Tüberküloz tanısında altın standart olan kültür yöntemiyle hastalığın tanımlanması 1,5-2 ay kadar zaman almaktadır. Buda tanının ve tedavinin gecikmesine ve hastanın bulaşıcılık açısından toplum için tehlike yaratmasına neden olmaktadır.

Bu çalışmada klasik tüberküloz besiyerlerine *P.eurycarpa*'dan soyutlanan bazı özütlerin ve bazı vitaminlerin eklenmesinin tüberküloz basili üremesini hızlandırıp hızlandırmayacağı araştırılmıştır. Tüberküloz basilinin daha erken üretilmesi tanının ve spesifik tedavinin gecikmesindeki problemin çözümüne katkı sağlayacaktır.

## 1. GİRİŞ

Tüberküloz tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Tüberküloz günümüzde her yıl 2-3 milyon insanın ölümüne yol açan bir hastalıktır. Dünya nüfusunun üçte biri *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte durumdadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre 2007 yılı itibariyle dünyada 13.7 milyon tüberküloz vakası olup, bunların 0.5 milyonu çoklu ilaç direncine (ÇİD) sahip tüberküloz olgularıdır.<sup>1</sup>Türkiye'de Verem Savaş Dairesinin 2009 raporuna göre 2007 yılı itibariyle ülkemizde 19.694 kayıtlı tüberküloz olgusu bulunmaktadır. Bunların 17.781'i (%90.3) yeni olgudur.<sup>2</sup> Günümüzde dirençli izolatların yaygınlaşması nedeni ile tüberküloz tedavisi ve kontrolünde sorunlar yaşanmaktadır. Uygulanan tedavi, hasta sağlığı açısından sorun oluşturma potansiyeli olabilen bir tedavi yöntemidir. Aynı zamanda hastalık etkeni bakteriler yanlış ve eksik tedavi uygulamalarına bağlı olarak ilaçlara direnç kazanabilmektedirler. Son yıllarda giderek artan sayılarda belirlenen çoklu ilaç direnci olan mikobakterilerin hastalardan saptanması, bu hastalığın tekrar bütün dünyada yayılma eğilimi gösterebileceğinin bir işaretidir. DSÖ'nün tahminlerine göre ÇİD tüberkülozu olan bir hasta hayatı boyunca yaklaşık 20 kişiyi enfekte etmektedir.<sup>3</sup> Yine bağışıklık sistemi baskılanan kişilerde özellikle gelişmiş ülkelerde sayıları her geçen gün artan fırsatçı mikobakteri enfeksiyonları da ciddi bir halk sağlığı problemidir. Bu bakteri enfeksiyonlarının tedavisi klasik tüberküloz tedavisinden farklıdır ve ayrı sorunları beraberinde getirmektedir. Tüberküloz dünyada en çok mortalite ve morbiditeye yol açan bir hastalık olması nedeniyle hastalıkla mücadelede epidemiyolojik verilerin büyük önemi vardır. Sosyo-ekonomik düzeydeki kötüye gidiş, beslenme ve barınma koşullarının kötüleşmesi, Human immunodeficiency virus (HIV) gibi etkenlerin neden olduğu immun yetmezlik sendromlarının yaygınlaşması, hastalığın takip ve tedavisindeki aksaklıklar, seyahat koşullarının kolaylaşması nedeniyle hastalardan direk bulaşma ve dirençli olguların artması söz konusudur. Bu nedenle, enfeksiyonun yayılımının

önlenmesi ve spesifik tedaviye gecikmeksizin başlanması için *M.tuberculosis*'in tanımlamasının mümkün olan en kısa sürede yapılması gereklidir.

Tüberküloz'un tanısında kullanılan geleneksel yaklaşım, örneklerin asido-resistan boyama (ARB) ile boyanarak mikroskopla incelenmesi ve etkenin kültürünün yapılarak tanımlanmasıdır. Geleneksel yöntemler kullanılarak tüberküloz basilinin tespiti için, ARB yönteminde mililitrede 5-10 bin basil, kültür yönteminde ise birkaç basil olması yeterlidir. Kültür yöntemi mikobakterilerin tanısında altın standarttır. Ancak kültür yönteminde basillerin üreyerek gözle görünür koloni oluşturmaları 3-6 hafta kadar süre almaktadır. Günümüzde Bactec 460 TB Sistemi, MGIT, Bact-Alert gibi otomatize sıvı kültür sistemleri güvenilirlikleri kabul edilmiş sistemlerdir. Ancak bu yöntemlerde de mikobakteri üreme süresi ortalama 10-12 gündür. Bu nedenle tüberküloz tanısında geleneksel yöntemlerin yanında bunları tamamlayan duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, çabuk sonuç veren moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Moleküler tanı yöntemi olarak PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve PZR'ın modifiye edilmesiyle birçok nükleik asit esaslı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Günümüzde, klinik örneklerden *M.tuberculosis* varlığını araştırmak, kültürde üreyen mikobakterileri tür düzeyinde tanımlamak ve tüberküloz ilaçlarına karşı dirençle ilgili mutasyonları tespit etmek için moleküler tanı yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır.<sup>4</sup>

Ancak hassas çalışma metodları ile dahi PZR laboratuvarında karşılaşılan sorunlar aşılamamıştır. PZR tekniğinin üstünlüğü, ideal şartlarda bir tek genomu (bakteri, virüs, vb.) dahi tespit edebilmesine dayanmaktadır. Ancak bu teknikle ilgili çeşitli sorunlar bulunmaktadır. Bu sorunlar arasında, yalancı pozitiflik ve negatiflik,

deneyimli personel ve dikkatli çalışma gerekliliği, uzun zaman alması, özel laboratuvar alt yapısı ve ekipman gerektirmesi, sonuçların deneyimli kişiler tarafından yorumlanması, standardizasyon gerekliliği ve maliyet sayılabilmektedir.<sup>5</sup>

Bu nedenle daha güvenilir, standart, uygulaması kolay, az emek ve maliyet gerektiren, aynı zamanda kısa sürede sonuç veren tekniklere rutin uygulamada büyük ihtiyaç vardır.

Bu amaçla, bu çalışmada mikobakterilerin laboratuvar tanısında altın standart olma özelliğini sürdüren kültür yöntemi ile daha kısa sürede üretilip üretilmeyeceği araştırılmak istenmiştir. Mikobakterilerin lipidce zengin yapıları göz önüne alınarak yine lipidce zengin olan ve ülkemizin epidemik bir bitkisi olan *Pistacia eurycarpa*'nın değişik özütlerinin ve bazı vitaminlerin Löwenstein Jensen Besiyerine ve Middlebrook Agar'a eklenmesinin *M.tuberculosis*'ın bu besiyerlerinde daha erken üretilmesi üzerinde bir etkisi olup olmayacağı ve mikobakteri enfeksiyonlarının bu yolla daha erken tanımlanmasının mümkün olup olmayacağıın incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Uzun yıllardan beri doğada varlığını sürdüren tüberküloz basili, doğada özellikle sularda, otlaklarda, çamurda ve samanda bol miktarda bulunan bir bakteridir. İnsanlarda en sık hastalık yapan *Mycobacterium* türü, tüberküloz hastalığının etkeni olan *Mycobacterium tuberculosis*'dir. İnsanlara ilk geçişi sığır besiciliği ile başlamış olabilir. Hayvanlarda bulunan *Mycobacterium bovis* insanlara bulaştığında lenf bezleri ve kemik tutulumu ortaya çıkıyordu. Ancak zamanla bu basilde akciğerleri tutan ve öksürükle bulaşan tüberküloz tipi basile dönüşmüştür. Robert Koch 1882 yılında tüberkülozun sebebi olan *Mycobacterium*'u ilk olarak balgamda göstermiştir. Daha sonra bu bakterinin kültürü yapılabildiği. Bunu izleyen yıllarda antitüberküloz ilaçlar ve BCG aşısı da bulunmuş ve tüberküloz korunma ve tedavi ilkeleri ortaya konmuştur.<sup>6</sup>

### 2.1. Mikobakterilerin Sistematikteki Yeri

Mikobakteriler prokaryot aleminde yer *Actinobacteria* sınıfı içinde yer almaktadırlar. *M.tuberculosis*'in sistematikteki yeri şu şekildedir.

Alem : *Prokaryot* (Bakteri)

Bölüm : *Firmicutes*

Sınıf : *Actinobacteria*

Takım : *Actinomycetales*

Aile : *Mycobacteriaceae*

Cins : *Mycobacterium*

Tür : *M. tuberculosis*

*Mycobacterium*, *Actinomycetales* takımına ait *Mycobacteriaceae* ailesinin tek üyesidir. Mikobakteriler genel olarak hızlı ve yavaş üreyenler olmak üzere ikiye ayrılırlar ancak Ernest Runyon sınıflandırılmasına göre üreme hızları, pigment üretimleri ve koloni morfolojileri esas alınarak 5'e ayrılırlar.<sup>7</sup>



## Mikobakterilerin Runyon'a göre Sınıflandırılması<sup>Z</sup>

A) Runyon sınıflamasına girmeyen

- *Mycobacterium tuberculosis* kompleks

- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycobacterium bovis*
- *Mycobacterium ulcerans*

- *Mycobacterium leprae*

B) Runyon Grup I: Fotokromojenler: Sadece ışıpta pigment oluşturur ve yavaş ürerler.

- *Mycobacterium kansasii*

- *Mycobacterium marinum*

- *Mycobacterium simiae*

C) Runyon Grup II: Skotokromojenler: Aydınlık ve karanlıkta pigment oluşturur, yavaş ürerler.

- *Mycobacterium szulgae*

- *Mycobacterium scrofulaceum*

- *Mycobacterium xenopi*

- *Mycobacterium gordonea*

D) Runyon Grup III: Pigment oluşturmazlar, yavaş ürerler.

- *Mycobacterium haemophilum*

- *Mycobacterium malmøense*

- *Mycobacterium avium*

- *Mycobacterium intracellulare*

E) Runyon Grup IV: Hızlı üreyenler, pigment oluşturmazlar.

- *Mycobacterium fortuitum*

- *Mycobacterium chelonae*

- *Mycobacterium abscessus*

*M.tuberculosis* kompleks (MTBC) dışındaki mikobakteriler MOTT (*Mycobacteria other than M.tuberculosis* ) olarak isimlendirilir.<sup>6,7</sup> Patojen türlerin en önemlisi *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTBC) olarak tanımlanan gruba giren türlerdir. Bu grubta *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti*, *M.canetti* türleri bulunmaktadır.<sup>7</sup>

İnsanlarda hastalık yapan mikobakteriler; *M. tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) *M. avium complex* (*M. avium*, *M. intracellulare*), *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. genevense*, *M. xenoi*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. haemophilum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. leprae*, *M. fortuitum-chelonae complex* (*M. fortuitum*, *M. chelonae*)'tir. Saprofit olduğu düşünülen mikobakteriler ise; *M. gordonae*, *M. terrae complex*, *M. flavescens* ve *M.smegmatis*'tir.<sup>7</sup>

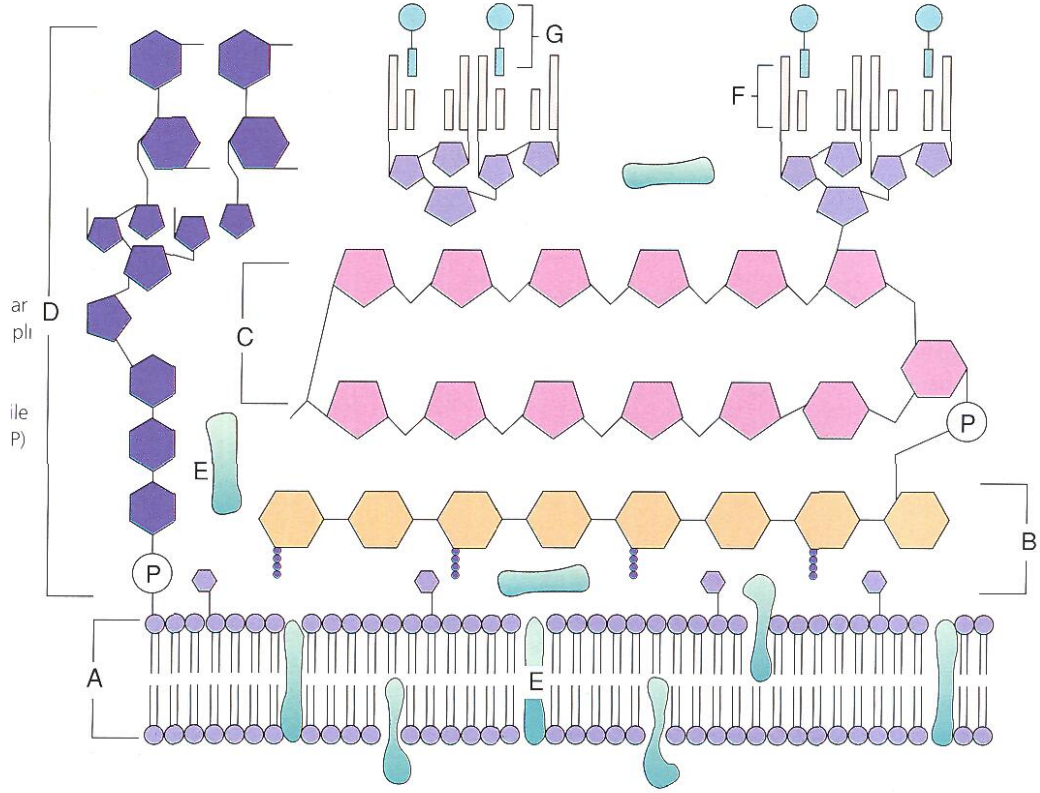
## 2.2. Morfoloji

Mikobakteriler yaklaşık 0,2-0,6X1-10 µm boyutlarında olup aerob çomaklardan oluşur. Mikobakteriler lipidden zengin bir hücre duvarına sahiptir. Aside dirençli boyanma özelliği hücre duvarındaki yağ oranının yüksek olması nedeniyle etil alkol ve hidroklorik asite rağmen aldığı boyayı bırakmamasından kaynaklanmaktadır.<sup>8</sup> *M. tuberculosis* hücre duvarı birbirine kovalan bağlarla bağlanmış peptidoglikan, arabinogalaktan ve mikolik asitten oluşmaktadır. Hücre duvarı ile sitoplazmik membranı birbirine bağlayan molekül lipopolisakkarid yapısındaki lipoarabinomannan (LAM)'dır.<sup>9</sup> Hücre duvarının ağırlığının yarısını beta-hidroksi yağ asidi yapısındaki mikolik asit oluşturur. Glikolipidler hücre duvarının dışında bulunur. Glikolipidler, kord (trehaloz 6-6'dimikolik asit) faktörün yapısına katılır.<sup>8</sup> Mikobakterilerde hücre duvarının önemli bir özelliğini kemotip IV peptikoglikan yapısı oluşturmaktadır. Bu yapı basile şeklini verir, aynı zamanda hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandırır. Bu tabakanın

üzerinde arabinoz ve galaktozdan oluşan bir polisakkarid olan arabinogalaktan (AG) tabakası bulunur.<sup>9</sup> Bu karmaşık yapı nedeniyle *M.tuberculosis* yapay kültür ortamlarında çoğunlukla 4–6 haftada üremektedir. Basil olumsuz koşullara son derece dayanıklıdır ve uzun süre canlı kalabilmektedir.<sup>7</sup>

### 2.3. Hücre duvarı

Mikobakterilerin hücre duvar yapısı lipid zenginliği nedeniyle diğer bakterilerden farklıdır. İlk tabaka plazma membranıdır. Orta tabaka ise peptidoglikan ve arabinogalaktan (AGP)'ın mikolik asit esterinden oluşan *mycolylarabinogalaktan peptidoglikan* (mAGP)'dan oluşur.<sup>10</sup> Hücre duvarında mikolik asitlerin dışında polar veya apolar nonkovalent bağlanmış lipid ve glikolipidler bulunur. Lipid ve glikolipid fazlalığı ile asimetrik diziliş şekilleri hücre duvarına hidrofobisite kazandırır. Non kovalent bağlanmış olarak bulunan lipidlerden,  $\alpha,\alpha'$  trehaloz dimikolat (TDM) ve  $\alpha,\alpha'$  trehaloz monomikolat (TMM) gibi açillenmiş trehalozlar, gliserol monomikolat ve fosfolipidler oldukça önemlidir. En dışta polisakkarit ve proteinden zengin ancak az miktarda lipid içeren kapsül yer almaktadır. Bu yapılarda alfa-1,4 glukoz, arabinomannan ve mannan içeren lipomannan (LM) ve lipoarabinomannan (LAM) gibi kapsüller polisakkaritler virulansta önem taşır. Duvarda porin proteinleride bulunmaktadır.<sup>10,11</sup> Şematik duvar yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1: Mikobakteri hücre duvar yapısı<sup>8</sup>

A: plazma membranı, B: peptidoglikan, C: arabinogalaktan, D: mannoz kaplı lipoarabinomannan, E: plazma ve hücre duvarı ile ilgili proteinler, F: mikolik asitler, G: mikolik asitlerle ilgili glikolipit yüzey molekülleri, P: fosfat molekülü

Mikobakterilerde, sitoplazmik membran diğer bakteri membranlarına benzer. Membran, protein ve fosfolipidlerden oluşmuş olup çift katmanlı bir yapıya sahiptir. Periplazmik boşluk ile peptidoglikandan ayrılır. Hücre duvarındaki orta tabaka; peptidoglikan, AG, mikolik asitler, açil trehalozlar, oligosakkarid içeren lipidler ve fosfatidilinositol'ün glikozil türevlerini içermektedir. Ayrıca glikoproteinler ve porinlerde orta tabakada bulunabilmektedir.<sup>11</sup>

### 2.3.1. Peptidoglikan yapı

Bu yapı bakteriye şeklini verir, hücre duvarına bütünlük ve sertlik kazandırır. Tetrapeptid yapıda yer alan diaminopimelik asit nedeni ile lizozimlere karşı dirençlidir. Bu yapı diğer bakterilerde olduğu gibi N-asetil- glukozamin ve N- glukozilmuramik asitin beta-glikozid ve fosfodiester bağlarla bağlanmasıyla oluşan bir heteropolimerdir. Muramik asidin glikolik asit ile glikozillenmiş residülerinin yaklaşık olarak % 10-12' sinde 6. pozisyonda yer alan tetrapeptid yan zinciri yardımcı ile fosfodiester bağlarla bağlanmışlardır. Diğer bakterilerin peptidoglikanlarından farklı olarak mikobakteri peptidoglikanında, iki farklılık görülmektedir. Birincisi muramik asidin asetillenmiş yapısı yerine glikolik asitle glikozillenmiş şeklinin bulunması, ikincisi ise tetrapeptid yan zincirlerinde diaminopimelik asidin (DAP) bulunmasıdır. Tetrapeptid'ler arasındaki pentapeptid zincirler, bir tetrapeptide ait DAP ile diğer zincirin D-alanin'ini bağlar. Transglikolizasyon ve transpeptidasyon reaksiyonları penisilin bağlayan proteinler aracılığıyla sağlanır. Kor bölgesinin iskeletini oluşturmak için peptidoglikan tabaka ile AG tabakası birbirine kovalent olarak bağlanmıştır. Bu yapıya çok dallı arabinoz ve galaktoz molekülleri sitoplazmik membran aracılığıyla taşınır. Bu yapılara mikolik asitlerin bağlanmasıyla kor tamamlanır.<sup>7,10,11</sup>

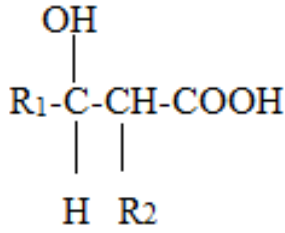
### 2.3.2. Arabinogalaktan(AG)

D-galactofuranos'lar ve D-arabinofuranos'lardan oluşurlar. Doğada nadir bulunur ve yapısal olarak diğer bakteri polisakkaritlerinden farklıdırlar. Tekrarlayan üniteler içermezler.<sup>12,13</sup> Yapısal bazı motifler taşırlar. AG'in homohalaktan rezidüleri PG'daki muramik asidin C6 pozisyonu ile bağ oluşturur. Arabinan 5 halkadan oluşur. Bu halkalarda yan halkalar oluşturur. Arabinanın 3. halkası homogalaktanın indirgeyici ucu ile bağlanmıştır. Mikolik asitlerin farklı türleri arabinan zincirinin son halkası olan pentarabinofuranozil ünitesinin üzerindeki uçları ile mAG yi

oluşturmak üzere 4'lü gruplar halinde bağ oluştururlar.<sup>10</sup> AG, hem PG, hemde mikolik asitlerle bağlanarak güçlü bir kor oluşturur.<sup>11</sup>

### 2.3.3. Mikolik asitler

Alfa dallanma gösteren, beta hidroksillenmiş büyük yağ asitleridir. Mikobakteriler dışında korinebakterilerde, nokardiya, gordona ve rodokoklarda da bulunmaktadır. Mikolik asitler üç farklı büyüklükte bulunurlar. Korinebakterilerde 28-40 karbonlu korinomikolik asitler, nokardiyalarda 40-60 karbonlu nokardomikolik asitler ve mikobakterilerde 60-90 karbonlu mikolik asitler şeklinde bulunurlar. Mikolik asitlerin basit formülü Şekil 2'de gösterilmiştir.<sup>13</sup>



Şekil 2: Mikolik asit yapısı

Mikolik asitler, doğada polisakkaritlere esterleşmiş yapılar halinde bulunurlar. Hücre duvarında hidrofobik bir bariyer oluştururlar. Mikolik asitler mikobakterilerde tüm hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'sini hücre lipidlerindeki %60'ını oluştururlar.<sup>7,13</sup> Mikolik asitler mikobakteri hücre duvarında AG'in arabinan parçası ile esterleşmiş olarak PG'a dik olarak yerleşmiştir. AGP'de iki farklı mikolik asit türü görülür. Birincisi oksitlenmiş grup içermeyen 60 karbonlu  $\alpha$ -mikolik asitlerdir. Bir çift bağ veya siklopropan halka içerirler. *M.tuberculosis* ve bir çok mikobakteride görülen mikolik asitlerdir. Mikolik asitlerin % 25'ten fazlasını oluştururlar. İkincisi ise oksitlenmiş gruplar içeren meromikolik asitlerdir. Meromikolatlar, hidroksillenmiş bölgelerindeki fonksiyonel gruplara göre isimlendirilirler. C=O grubu taşıyanlara ketomikolat, CH<sub>3</sub>OCH= grubu taşıyanlar metoksimikolat, bir metil grubu ile trans-O taşıyanlar

epoksimikolat ve COOH grubu içerenlere karboksimikolat denmektedir. Meromikolat üzerindeki fonksiyonel grupların mikobakterilerin virulansı ve konakla ilişkisi üzerine önemli etkileri görülür. *M.kansasii* ve *M. tuberculosis* gibi patojen mikobakterilerde siklopropan halka, çift bağların yerini almıştır. Buna karşılık hızlı üreyen apatojen *M.smegmatis*'de siklopropan görülmez.<sup>11,13,14</sup>

Ketomikolat'lar *M.tuberculosis*'in makrofaj içerisinde yaşamasına yardım eder. *M.tuberculosis*'in akciğerlerde en çok havalanan bölgeye yerleşmelerinin en önemli nedeni mikolik asit üretiminin oksijen bağımlılığı göstermesidir. Mikolik asit varlığı, makrofajda vakuol içinde mikobakterilerin hayatta kalmasını sağlar.<sup>13</sup>

#### Mikolik asit sentezi

Mikolik asit sentezi kondensasyon, elongasyon, desaturasyon ve siklopropanasyon evrelerinden oluşmaktadır.

a) Katılım: Mikolik asit katılımı, bir palmitoil kalıntısı ile bir tetradecil-malonil kalıntısının bir reaksiyonla birleşmesi şeklinde olur.

b) Uzama: Bir yağ asidinden bir mero-mikolik asit oluşumu için yağ asidine bir C2 ilavesi ve çift bağ oluşumuna gerek vardır. Bu işlem 15 dakikada gerçekleşebilmektedir.

c)Desaturasyon ve siklopropanasyon: Sentez tamamlandıktan sonra çift bağların yerine siklopropan halkasının bağlanması ile sentez tamamlanmış olur. Matür  $\alpha$ -mikolik asitler ve meromikolik asitler bir taşıyıcı fosfolipite bağlanarak plazma membranı yolu ile TMM veya TDM oluşturmak üzere trehaloz ile esterleşmek için hücre duvarına taşınırlar. Hücre duvarındaki mikolik asitlerin bir kısmında taşıyıcı fosfolipidler üzerinde görülürler. Bu işlem Ag85 kompleksi içerisinde yer alan 4 mikoliltransferaz genleri (*fbpA*,

*fbpB*, *fbpC1* ve *fbpC2*) tarafından yönetilir. Mikolik asit sentezinde çok sayıda gen ve gen ürünleri görev almaktadır.<sup>11,13,15,16,17</sup>

#### Mikolil transferaz genleri

Mikolik asit transportu ve esterleşmesinde *fbpA*, *fbpB*, *fbpC1* ve *fbpC2* genleri tarafından sentezlenen çok sayıda enzim rol oynar. Ancak bu enzimlerden en etkilileri 85A, 85B ve 85C'dir. Ag 85 kompleksi içerisinde yer alan 85A, 85B ve 85C'nin üretim oranı 2-3-1 şeklindedir. Antijen 85 denen bu yapı mikolil transferaz aktivitesi göstermektedir.

Mikolik asitleri hücre duvarının dışına taşımakta ve böylece küçük hidrofilik moleküllere bir bariyer görevi yapmasını sağlamaktadırlar.<sup>18,19</sup> Bunun yanında antijenik özelliği olan 85B'nin konağın immun cevabını inhibe ettiği ve infekte makrofajlarda bulunduğu ispatlanmıştır.<sup>10,15</sup>

#### **2.3.4. Açıl-trehaloslar**

Hücre duvarının orta tabakası ile kapsülde bulunurlar. Açıl trehalozlar, TMM ( $\alpha,\alpha'$  trehalose monomycolates) ve TDM ( $\alpha,\alpha'$  trehalose dimycolates)'nin yer aldığı mikolik asit esterleri ve poliaçıl trehalozlar olmak üzere 2 şekilde bulunmaktadır.

##### a) TMM ve TDM

Hücre duvarının en dış tabakalarında bulunabildiği gibi türe bağlı olarak daha alt tabakalarda da yerleşebilirler. Kord faktör olarak da tanımlanan TDM, Ag85 kompleksi proteinlerin yardımı ile TMM'den bir mikolik asidin diğer TMM'ye transferi ile üretilir ve trehaloz molekülü



serbest kalır. TDM güçlü bir toksindir. TDM granülamotöz inflamasyon ve timik atrofiye neden olmaktadır. Lökosit göçünü durdurmaktadır.

#### b) Poliaçil-trehalozlar

Bu grupta sülfatlanmış trehalozlar veya sülfolipidler (SL) olarak bilinen yağ asitleri esterleri ve di-açil-trehaloz (DAT) ve tri-açil-trehaloz (TAT) yer almaktadır. Ayrıca *M.tuberculosis* suşlarında fitioseranik ve hidroksifitioseranik asitler bulunmaktadır. Palmitat ve stearat gibi sature yağ asitleri ile açillenmiş sülfolipidlerde mikobakterilerde önemli yapı elemanlarıdır. DAT, *M. tuberculosis*'in en dış kısmında bulunan bir glikolipiddir. Yapısı iki yağ açil zinciri içeren bir amfipatik molekül ve 2  $\alpha$ -glukozdan oluşmaktadır. DAT, T lenfositlerde proliferasyonu inhibe ederek proinflamatuvar sitokinlerin salınımını engellemektedir. Bu maddeye karşı antikor cevabı oluşmaktadır.<sup>10,15,20</sup>

#### **2.3.5. Oligosakkarid içeren lipidler**

Lipooligosakkaritler (LOS) ve mikoizidler bu gruptadır. LOS'da oligosakkaritler uzun zincirli yağ asitleri ile açillenmişlerdir. Hücre yüzeyinde yer alır ve immunojenik etkiye sahiptirler. Mikobakteriofajlar için hedef reseptörlerdir. Mikoizidler mikobakteriler için spesifiktir. İki tip mikoizit bulunmaktadır;

1-Fenol glikolipidler (PGL) veya mikoizid A,B,G,

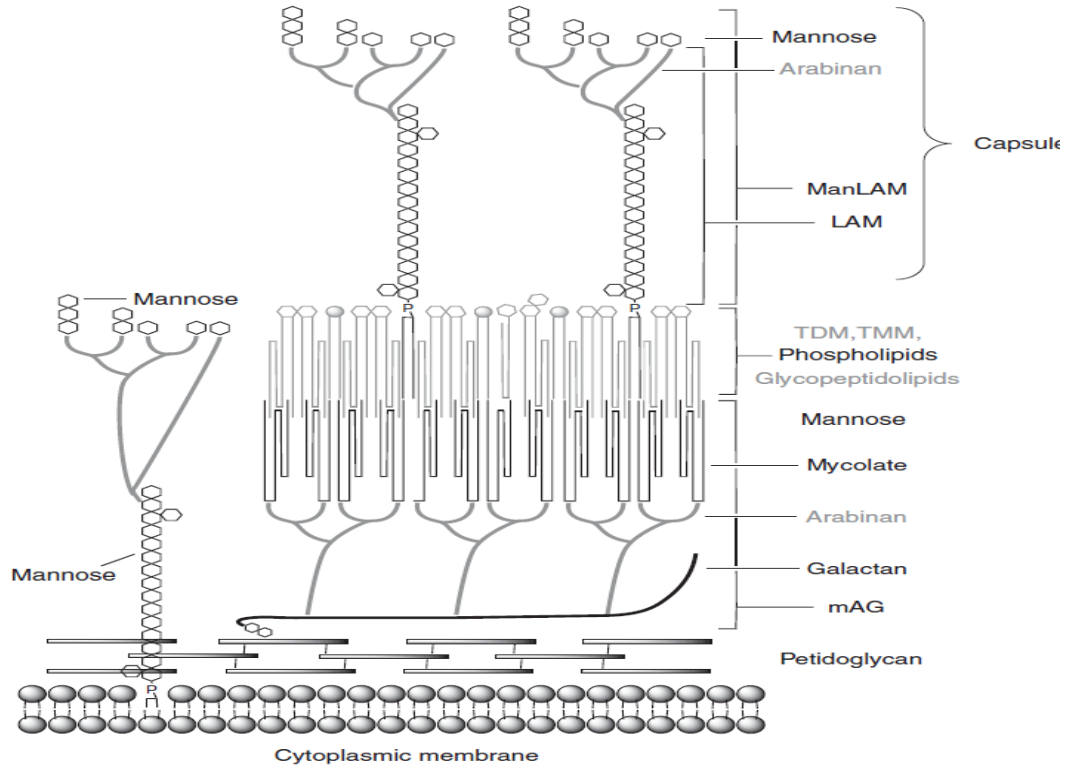
2-Glikopepdidolipitler (GPL) veya mikoizid C.

PGL grubundan, *M.tuberculosis*'de fitiserol dimikoserozat balmumu bulunur ve lenfosit cevabını baskılar. GPL'ise daha çok *M.avium* kompleksi üyelerinde saptanır.<sup>10</sup>

### 2.3.6. Fosfatidilinositol'ün glikozil türevleri

Mikotiyol, fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositolmannozit (PIM) ve glikozillenmiş fosfatidilinositol türevleri duvar yapısında yer alır ve makrofaj içinde bakterinin canlı kalmasında rol oynarlar. Mannoza ile bağlanmış formları LAM ile kompleks oluşturur ve ManLAM yapısını oluştururlar. Arabinan yada fosfomiyoinositol molekülleri LAM yapısına katılarak AraLAM yada PILAM yapılarını oluştururlar.

AraLAM ve PILAM proinflatuvar mediatörlerdir. Mannoza, *M.tuberculosis* ile konak immün sistemi arasındaki etkileşimde önemli bir rol oynar. ManLAM'da mannoza'nın en dışta yer alması bu lipoglikanın biyolojik fonksiyonlarını diğerlerinden daha önemli kılmaktadır. ManLAM immün sistemi baskılar ve makrofajdan sitokinlerin salınımını inhibe eder. Diğer taraftan ManLAM T hücre aktivasyonunu inhibe eder, IFN-γ'nın indüklediği mikrobisidal ve tümörisidal etkileri baskılar. Bu etki ile oksijen radikalleri üretilmez, protein kinaz C aktivitesi inhibe olur ve sitokin salınımı durur. ManLAM'ın mannoza uç yapıları makrofajlarda yüzeyde yer alan mannoza reseptörlerini kullanarak makrofajın içersine girer. Bu giriş makrofaj içersinde intrasellüler yaşayan mikobakteriler için önemli bir giriş yoludur.<sup>10,11,20,21,22</sup> Hücre duvarında bulunan mannoza moleküllerinin yerleşimi Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3: *M. tuberculosis*'in hücre duvarında fonksiyonel mannoz moleküllerinin yerleşimi<sup>11</sup>

## 2.4. Kapsül

Bu tabakada bakterinin patojenitesinde rol oynayan elemanlar bulunur. Özellikle kapsüller glikanlar, bakterinin konak hücreye adezyon ve penetrasyonunda rol oynamaktadır. Hücreden salınan veya yüzeyde eksprese edilen bazı enzimler ve proteinler hücre içi çoğalmada etkilidir. Kapsül bazı makromoleküllerin hücre içine ulaşmasını engeller. Ayrıca, kapsül içerisinde proteazlar ve lipazlar bulunmaktadır. Kapsülde bulunan toksik lipidler ve temasla aktive olan diğer litik maddeler makrofaj aktivasyonunu ve lenfosit proliferasyonunu engeller.<sup>10</sup> Mikobakterilerde görülen bu farklı hücre duvarı yapıları, Mikobakterileri diğer bakterilerden ayırt eder. Ayrıca hücre içi yaşam ve kronik enfeksiyon yapma yeteneği, asit ve alkalilere, antibiyotiklere, dezenfektanlara, enzimlere, serbest radikaller gibi kimyasal toksik maddelere dirençli olmalarını sağlamaktadır.<sup>10,11</sup>

## 2.5. Tüberküloz Basilinin Genom Yapısı

*M. tuberculosis*'in H37RV suşunun 4.4 Mb sirkuler genom sekansı olduğu ve 4.411.529 baz çifti içeren 4000'den fazla geni olduğu ortaya konulmuştur. Genlerin çoğunluğu lipid biyosentezi ve metabolizmasında görev almaktadır. *M.tuberculosis* genomundaki bazı gen toplulukları olan PE ve PPE genleri, hücre duvarı lipidlerinin sentezinde görevli ve immun sistemi baskılayan suda çözülmeyen protein kodlamaktadırlar. Mikobakterilerde lipit metabolizması ile ilgili genlerin çokluğu bu bakterilerin metabolizmalarında karbon kaynağı olarak lipidleri kullandıklarını göstermektedir.<sup>7,20,22</sup>

## 2.6. Mikobakterilerin Kültür Özellikleri

Zorunlu aerop olan mikobakteriler 16-18 saat kadar uzun bir sürede ikiye bölünürler. Bu nedenle kültür ile izole edilmeleri için uzun bir inkübasyon süresi gereklidir. Özellikle patojen türlerde üreme zamanı uzun, asit alkole dirençleri fazla, üreme sıcaklıkları sınırlıdır.<sup>6,7</sup> Mikobakterilerin çoğu %5-10 CO<sub>2</sub> varlığında, 37°C'de karanlıkta ve nemli ortamda iyi ürer. *M. tuberculosis* gliserinli besiyerinde yüzeyde bir zar oluşturarak üremektedir. Yumurtalı ve katı besiyerinde yaklaşık 35 günde ürerler. Gliserol üremelerini kolaylaştırır. Kültürde *M.tuberculosis* kolonileri kuru, siğilimsi, düzensiz, yüzeyleri pürüklü, sarımsı bir renkte görülürler. *M. bovis*, yumurtalı katı besiyerinde daha yavaş ürerler (4-8 haftada). Gliserollü besiyeri üremelerini güçleştirir, bu yüzden önceleri yüzeyde zar yaparak daha sonra dipte çökelti yaparak ürerler. Piruvat ise üremeyi stimüle eder. Yumurtalı besiyerinde küçük, yuvarlak, düzgün, hafif kabarık, nemli, beyazımsı koloniler oluştururlar ancak pigment oluşturmazlar.

Diğer *M.tuberculosis* kompleks üyelerinin tersine indirgenmiş oksijenli ortamda daha iyi ürerler. *M.africanum* daha çok *M.tuberculosis*'e benzer şekilde yumurtalı besiyerinde mat ve R tipi koloni oluşturarak üremektedir.<sup>7</sup>

Bazı türler mikroaerofilik şartlarda daha iyi ürerken bazıları düşük oksijen varlığında üreyemezler. Bazı mikobakteriler pigment üretirken (kromojen), diğer bir kısmı pigment oluşturmazlar (nonkromojen). Pigment üretimi bazı türlerde yalnız ışıklı ortamda olabileceği gibi (fotokromojen), bazılarında hem ışıklı hemde karanlık ortamda (skotokromojen) olabilmektedir.<sup>7,8,22</sup>

## 2.7. Epidemiyoloji

Tüberküloz (TB) bütün dünyada yaygın olarak görülen bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) açıklamalarına göre, 2000 yılında dünya çapında TB'li yeni hasta sayısının 3.671.973 olduğu ve bu hastalarında 1.529.806'sının yaymasının pozitif olduğu belirtilmektedir. DSÖ 2004 yılında, tüm dünyada 8-9 milyon yeni TB olgusu bulunduğunu ve bu olguların 3,9 milyonunun, bulaşıcılığın en yüksek olduğu, balgam yaymasında asidoresistant basil (ARB) pozitif olan hastalardan oluştuğunu ortaya koymuştur. DSÖ, 2005 yılında yayınladığı TB raporunda, tüm dünyada 1,6 milyon kişinin TB nedeniyle yaşamını kaybettiğini bildirmiştir. Dünyadaki hastaların yaklaşık % 80'i gelişmekte olan 22 ülkede bulunmaktadır. TB'e bağlı en yüksek ölüm hızının Afrika Kıtasında gerçekleştiği bildirilmiştir.<sup>7,23,24</sup> "Dünya Sağlık Örgütü Küresel Tüberküloz Kontrolü 2009 Raporu" verilerine göre ülkemizin içinde yer aldığı Avrupa Bölgesi'nde 2008 yılı tüberküloz nokta prevalansı yüz binde 39 iken Türkiye için bu rakam yüz binde 22'dir.

Türkiye'de Verem Savaşı 2010 Raporuna göre, 1990 yılında yüz binde 53 olan tüberküloz nokta prevalansını 2002 yılında yüz binde 47'ye düşürülebilmektedir. Çeşitli kontrol çalışmaları sonucu 2005 yılında bu rakam yüz binde 26'ya düşmüştür.<sup>25</sup> Tüberküloz basilinin en önemli bulaş yolu inhalasyondur. *M.tuberculosis* havadaki damlacık çekirdekleri (flugge=1-5 mikron çapında olan 2-3 bakteri taşıyan damlacık) ile taşınır. Öksürme ve hapşırma ile ortama dağılan damlacıkların inhalasyonu ile

bulaş görülür. *M.bovis* ise sindirim yoluyla veya havayolu ile bulaşır. Bunun dışında basiller sindirim sistemi, deri, ürogenital sistem, konjunktiva ve emzirme yoluyla bulaşabilmektedir.<sup>1,2,25</sup>

## 2.8. Tüberküloz için enfeksiyon riskleri

Tüberküloz açısından hastalığa yakalanma olasılığını yaşanan ülkenin tüberküloz prevalansının yüksek olması, tüberküloz enfeksiyonu olan kişilerle temas sıklığı, tüberküloza yakalanma riski yüksek olan kişiler ve onlarla temas (HIV ile enfekte insanlar, uyuşturucu bağımlıları) sıklığı, tüberküloz insidansı yüksek ülkeden gelenlerle temas sıklığı, immun sistemin çeşitli nedenlerle zayıflaması arttırmaktadır. Küçük çocukların (0-4 yaş) tüberküloz enfeksiyonunu alma olasılığı diğer yaş gruplarına göre daha yüksektir.

Her gün dünyada yaklaşık 5000 kişi tüberkülozdan ölmektedir. Seksenli yıllardan sonra tüberkülozlu hasta sayısı artmaya başlamıştır. Bunun nedeni göçler, fakirlik, beslenme bozuklukları, tedavideki ihmaller, yanlış sağlık politikaları ve HIV'li hasta sayısındaki artıştır. HIV'li hastalar tüberküloza oldukça duyarlıdır. Ancak son yıllarda ekonomik olarak gelişmiş toplumlarda hastalık giderek azalma göstermiştir.<sup>24,26</sup>

## 2.9. Tüberkülozda İmmünoloji

Mikobakterilere karşı immun yanıt T lenfositler, makrofajlar ve bunlardan salınan sitokinlerle oluşur.<sup>27</sup> Mikobakteriler hücre yüzeyinde ligandlar bulundurlar ve bunlar sayesinde makrofaj reseptörlerine bağlanırlar. Bu yolla makrofajlara girip enfekte ederler ve böylece aynı zamanda makrofajdan kaçarak makrofaj içinde canlı kalırlar.<sup>8</sup> *M.tuberculosis* makrofaj içinde amonyak sekrete ederek lizozom-fagozom oluşumunu engellerler. Fagolizozom oluşursa da litik enzimlerin fonksiyonlarını etkisiz hale getirirler. Hücre duvarında bulunan

lipoarabinomannan ve glikolipidler ile makrofajlar tarafından salınan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve başka oksijen radikallerini etkisiz hale getirirler. Protein kinaz C'yi inaktive eden lipoarabinomannan, IL-10 sentezini uyararak humoral immün yanıtın harekete geçmesini sağlar ve böylece TNF- $\alpha$ , IL-12 gibi sitokinlerin salınımı azalır. Bunun sonucunda makrofajların öldürme etkisi bozulur.<sup>6,28,29</sup> Diğer taraftan aktif makrofajlar lizozom-fagozom füzyonu oluşturabilme yeteneği kazanırlar. Mikobakterisidal etki gösteren proteolitik enzim ve metabolitler üretir. Özellikle lizozom-fagozom füzyonu sonucu reaktif nitrojen (RNI) ve reaktif oksijen (ROI) ara ürünleri ile basil üremesi durdurulur.<sup>30</sup>

Hücrel immunitede antijeni spesifik olarak tanıyan hücreler T lenfositlerdir. Bu sistemin efektör hücreleri ise makrofajlardır.<sup>31</sup> Tüberküloza karşı hücrel immün yanıtta asıl görevli hücreler CD4+T, CD8+T hücreleri, aktive makrofajlar ve dendritik hücrelerdir. Ayrıca IFN- $\gamma$ , IL12-, TNF $\alpha$  gibi sitokinlerde hücrel immün yanıtta görev almaktadır. Enfekte makrofajlar ve dendritik hücreler çeşitli sitokinler salgılayarak CD4+T, CD8+T hücrelerini aktive eder ve fagosite ettikleri basilleri aktive ettikleri hücrelere sunarlar.<sup>32,33</sup> Makrofaj içinde ortadan kaldırılmaya çalışılan basilin antijenik yapılarından bazıları, makrofajların major doku uygunluk kompleksine (MHC) bağlanırlar. Bu bileşik yapı makrofaj yüzeyine taşınır ve T lenfositlerin alt gruplarına sunulur. Bu sunumda MHC sınıf II ile sunulan antijenleri CD4+ Th lenfositler tanır.<sup>8</sup> Gelişen hücrel immün yanıtın düzenlenmesinde sorumlu CD4+ (T helper) lenfositlerdir. Aktive olmuş T lenfositler IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , MIF, M-CSF, IL-3, IL-6 gibi sitokinler salgırlar. Bu sitokinler makrofajları aktive ederler. Aktive makrofajlar basilleri yok ederek, çoğalmasını kontrol ederler.<sup>32,34,35</sup>

Th1 lenfositler, IFN- $\gamma$  salgılayarak immatur fagositlerin yıkımını da uyarırlar ve mononükleer fagositleri aktive ederler.<sup>30,36</sup> Hücrel immuniteyi oluşturan Th1 hücreleri tarafından salgılanan sitokinler, monosit/makrofajların aktivasyonunu sağlarlar. IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  en önemli makrofaj aktive edici sitokinlerdir.<sup>33</sup> Aktive makrofajlar, reaktif oksijen ürünleri, lizozomal enzimler ve diğer faktörleri üretirler böylece basilleri yok edebilirler. Ancak geç tip aşırı duyarlılık, reaksiyonu basillerin üremesi için uygun hücre içi ortamı ortadan kaldırıp, basil bulunan inaktif makrofajlara ve komşu dokulara hasar vererek basilin çoğalmasını önleyen durumdur.<sup>28,33,35,36</sup> Geçirilmiş bir enfeksiyon sonucunda canlı basillerin bulunduğu enfeksiyon odağında aktif makrofajlar ve hücrel immun sistem hücreleri birikerek granülomlar oluşur. Enfeksiyonun sınırlandırıldığı bu döneme “primer tüberküloz” denir. Latent fazdaki bu basillerin konak savunmasını geçerek, reaktif olup vücutta yayılması sonucu oluşan enfeksiyona da “sekonder tüberküloz” (reaktif) denir. Oluşan reaktif tüberküloz odaklarında ortaya çıkan granülomlar zamanla giderek nekroza uğrarlar ve doku harabiyeti sonucu kaviteasyonlar meydana getirirler.<sup>7</sup>

## **2.10. Tüberkülozda Patogenez**

### **2.10.1. Primer Enfeksiyon**

İlk enfeksiyon tüberküloz basilinin inhalasyonu ile başlar. 1-5  $\mu$ m büyüklüğünde ve içinde 1-3 canlı basil taşıyan damlacık çekirdekleri alveollere kadar ulaştığında ya enfeksiyon kontrol altına alınır yada enfeksiyon gelişir. Öncelikle basiller alveolar makrofajlar tarafından fagosite edilir. Basillerin yerleştiği alanda kapiller dilatasyon ve lökositlerin infiltrasyonu olur. Makrofajlar bölgeye gelir ve spesifik olmayan bir inflamatuvar cevap oluşur. Çoğunlukla makrofajlar içindeki zayıf basilin çoğalmasını engeller veya onu yok eder.<sup>37</sup> Genellikle enfeksiyonun başlangıç odağı orta akciğer üst lobların alt kısımları ve alt-orta lobların üst



kısımlarıdır. Primer odak genellikle tektir.<sup>34</sup> İlk olarak basil alveolar makrofajlar içinde çoğalmaya başlar ve hücreyi öldürür. Enfekte makrofajlar sitokinler ve kemokinler üreterek lenfomonositer hücrelerle, nötrofiller gibi diğer fagositik hücreleri enfeksiyon bölgesine çekerler. Makrofaj içinde çoğalan basiller makrofajları lizise uğratarak serbest kalırlar. Daha sonra basiller tekrar makrofajları enfekte ederler ve böylece basil yüklü makrofajlar alveollerde birikmeye başlarlar. Primer odakta biriken makrofajlar özellik değiştirerek epiteloid histiyositleri oluştururlar. Onlarında bir araya gelmesi ile Langhans denilen dev hücreler meydana gelir. Bu hücrelerin primer odağın çevresini çevirmesi ile 'granulom' veya 'tüberkül' oluşur. Bölgesel lenf nodlarına ulaşım lenf nodlarına yerleşirler. Lezyon akciğer parankimine doğru ilerleyerek lenf nodları ile birlikte Ghon kompleksini oluşturur. Basiller daha sonra lenfohematojen yayılım gösterirler yani dolaşıma katılarak tüm dokulara yayılırlar. Sonuç olarak hücrel immünite oluşur ve buna bağlı doku hasarı meydana gelir. Hastalığın seyrini bu olay belirler.<sup>6,7</sup> Hücrel immünite sonucu ortaya çıkan immün moleküller kazeifikasyon nekrozunun oluşumuna neden olurlar. Kazeifikasyon nekrozunun içindeki basiller kolayca sindirilir.

Hücrel immünite, basilleri fagosit eden makrofajları aktive eder, ancak gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonu komşu dokulara zarar verir. Hastalık kontrolsüz bir şekilde ilerlediğinde hematojen bir yayılımdan sonra bronkojen yayılım gösterip hastalık akciğerlerde yayılabilir. Bu durumda hastalık daha kolay bulaşabilmektedir. Bundan sonra hastalık ya iyileşir ya da kronikleşir.<sup>6,7</sup>

### **2.10.2. Sekonder Enfeksiyon**

Reaktivasyon tüberkülozuda denilebilir. Latent durumda bulunan kazeifikasyon nekrozunda bulunan basilin tekrar bir klinik tablo oluşturması olayıdır. Genellikle bağışıklık sistemi baskılanmış (HIV pozitif, böbrek yetmezliği, diabetes mellitus, malign lenfoma gibi) hastalarda

görülür. Reaktivasyonda olay ilk enfeksiyonun aksine genellikle bölgeseldir.<sup>7</sup>

### **2.10.3. Akciğer Dışı Tüberküloz**

Akciğer dışı tüberküloz (ADTB) yıllarca sessiz olarak ilerlerken yıllar sonra ortaya çıkıp hızlı bir şekilde akut bir tablo ortaya çıkarabilir. ADTB, en çok genç nüfusta görülmektedir. ADTB, Tüberküloz lenfadenit, plevra tüberküloz, miliyer tüberküloz, genitoüriner sistem tüberküloz, kemik ve eklem tüberkülozu, merkezi sinir sistemi ve duyu organları tüberkülozu, abdominal tüberküloz, kardiyovasküler sistem tüberkülozu veya deri tüberkülozu tarzında görülebilmektedir.<sup>38,39</sup>

### **2.11. Mikobakterilerin Laboratuvar Tanısı**

Tüberkülozda tanı, klinik örneklerde basilin gösterilmesiyle konur. Tanıda altın standart, *M.tuberculosisin* kültürde üretilmesidir. Tüberküloz tanısı için, balgam, bronş lavajı, BAL, plevra ve BOS sıvısı, mide lavajı, kan, idrar, gaita, bronkoskopik iğne aspirasyonu gibi klinik örnekler incelenebilir. Kemik tüberkülozu şüphesinde kemik biyopsisi, gastrointestinal sistem tüberkülozunda bağırsak biyopsisi, cilt tüberkülozunda cilt biyopsi örnekleri kullanılabilir. Peritonal ve perikardiyal tüberkülozda tanı için genellikle laparoskopik veya biyopsi gibi invaziv girişimler gerekir. Kan gibi koagüle olma özelliğindeki örnekler (kemik iliği, sinoviyal sıvı, plevral, perikardiyal, peritoneal sıvılar) sülfatlanmış polisakkaritli antikoagülanlı tüplerle taşınırlar.<sup>6,40</sup> Balgam ve gastrik aspirat gibi materyal sabah vakitlerinde alınmalıdır. Alınan klinik örnekler Ziehl-Neelsen (ZN) boyası ile boyanarak, aside dirençli basil aranır. Gönderilen örneğin yaymasında basil görülebilmesi için örneğin mililitresinde 5.000-10.000 basil bulunması gerekmektedir. Örnekler, basilin görülme ve üreme olasılığını artırmak için en az 3 kez gönderilmelidir. Karbolfuksin ile

boyanan basiller kırmızı olarak görülürler. Ancak kesin tanı kültürle konmaktadır. Rutin olarak laboratuvarlarda kullanılan Löwenstein-Jensen besiyerinde patojen mikobakterilerin üremesi yaklaşık 6-8 hafta zaman almaktadır.<sup>6,7,40,41</sup> MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) metodunda floresanlı tüp ile yapılan kültür yönteminde ortalama 10 günde basiller üretilmektedir.<sup>42,43</sup> BACTEC kültür sisteminde sıvı besiyerinde bulunan radyoizotop <sup>14</sup>C işaretli palmitik asitin mikobakteriler tarafından metabolize edilmesi sonucu şişenin üst kısmında oluşan radyoaktif işaretli CO<sub>2</sub> gazının dedektör tarafından ölçülmesiyle üreme yaklaşık 2 haftada saptanabilmektedir.<sup>42,44</sup>

Diğer bir hızlı kültür yöntemi mikobakteriyofajların kullanımınıdır. Klinik örnekte mikobakterilerin bulunması durumunda lusiferaz enzimi üreten mikobakteriyofajlarla enfekte olmakta ve 2-3 gün gibi kısa bir süre içinde örnekte mikobakteri olduğu anlaşılabilir.<sup>25</sup> Bunların dışında PZR, RFLP gibi moleküler yöntemler yada serolojik yöntemlerde tanı kullanılmaktadır. Ancak mikobakteriyofaj ve PZR gibi hızlı tanı sağlayan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllük düzeyleri altın standart kabul edilen kültür yönteminin yerini almak için yeterli değildir.<sup>5,40,45,46,47</sup>

### **2.11.1. Uygun Örnek Alma Esasları**

Tanıda balgam, gastrik aspirasyon sıvısı, BAL, akciğer dokusu, plevral sıvı ve biyopsi örneği, lenf nodu, kemik iliği, karaciğer, peritoneal sıvı, idrar, dışkı, BOS gibi çeşitli örnekler kullanılabilir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda, özellikle AIDS'li hastalarda mikobakteriyemi olabileceğinden kan kültürü önem taşımaktadır. Örneklerin steril ağız kapaklı kaplara uygun koşullarda alınması ve en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılması doğru tanı için önem taşıyan ilk

basamaktır. Balgam örneği üç ardışık gün sabah alınmalıdır. Balgam çıkaramayan hastalarda aerosol hipertonic salin inhalasyonu yaptırılarak hastanın örnek vermesine yardımcı olunmalıdır. Renal tüberkülozun mikrobiyolojik tanısı için 5-6 ardışık sabah idrar örneği alınmalıdır. Tüberküloz menenjitli olgularda ise 5-10 ml BOS örneğinde inceleme yapılması tüberküloz basilini saptama şansını artırır. Plevra periton ve perikard sıvısı antikoagülan içeren steril tüplere alınmalıdır. Miliyer tüberkülozlu olgularda kemik iliği, akciğer ve karaciğer biyopsisi tanı için uygun örneklerdir. Örneklerin mümkün olan en kısa sürede gerekli işlemlerden geçirilerek incelenmesi gerekir ve çalışmalar ayrı bir odada güvenlik kabinlerinde yapılmalıdır. Aside dirençli bakterilerin görülme şansının azalması nedeniyle balgam gibi flora bakterilerini içeren örneklerin dekontaminasyon, homojenizasyon ve konsantrasyon işlemlerinden geçirilmesi gerekmektedir. BOS ve diğer vücut sıvıları flora bakterileri içermediğinden bu örneklerle dekontaminasyon işlemi yapılması gerekmemektedir.<sup>41,45,46,48</sup>

### **2.11.2. Örneklerin işlenmesi**

Klinik örneklerde mikobakterilerin varlığını göstermek için yapılan kültür ortamında, mikobakterilerin yanı sıra, kontaminasyona neden olan diğer bakteri ve mantarlar da bulunabilir. Bu nedenle mikobakterilerin üremesini baskılayacak olan mikroorganizmalardan ve kalıntılardan kurtulmak için klinik örneklerle homojenizasyon, dekontaminasyon ve yoğunlaştırma işlemi uygulanır. Rutin mikobakteriyoloji laboratuvarlarında bu amaçla N-asetil-L-sistein (NALC)+sodyum hidroksit (NaOH) yöntemi uygulanmaktadır. İncelenecek klinik örneğe, örneğin miktarı kadar NALC-NaOH solüsyonu ilave edilerek oda ısısında 15 dakika bekletilir. Daha sonra üzerine 0,067 M fosfat tamponu (pH 6.8) eklenir. Bu karışım 3000 rpm'de 15-20 dakika santrifüj edilir. Sedimente 1-2 ml steril fosfat tamponu (pH; 6.8) veya %0.2'lik sığır

albumin fraksiyon ilave edilir. BOS, vücut sıvıları gibi örneklere dekontaminasyon yapılmaz ve bu örnekler direkt olarak veya santrifüjde çevrildikten sonra sedimentten besiyerlerine ekilirler.<sup>41,45,48</sup>

### 2.11.3. Mikroskopik İnceleme

Balgam incelemesi tanısal değeri oldukça yüksek bir o kadar da ucuz bir yöntemdir. Balgam ve diğer klinik örneklerden yayma ile ARB aranması ve bunun kültür ile doğrulanması tüberküloz teşhisinde altın standarttır. Hazırlanan yaymaların aside dirençli boyalarla boyanmasında EZN (Ehrlich-Ziehl-Neelsen), Kinyoun ve Auramin-rhodamine gibi boyalar kullanılmaktadır. Preparatlar Ziehl Neelsen ile boyamadan sonra ışık mikroskopunda immersiyon objektifinde incelenmektedir. Basiller mavi zeminde pembe basiller şeklinde görülmektedir. Boyalı preparatta ARB pozitif bulunan hastalar bulaştıracılığı en fazla olan hastalardır. Değerlendirme yaparken rodokok, nokardiya, bazı korineform bakteriler ve *Legionella micdadei*'in ARB tarzında görülebileceği unutulmamalıdır.<sup>49,50,51</sup>

### 2.11.4. Kültür

Mikobakterilerin tanısında altın standart kültürdür. En önemli dezavantajı uzun bir inkübasyon süresi gerektirmesidir. Mikobakterilerin izolasyonunda kullanılmakta olan bir çok besiyeri vardır. Mikobakterilerin üremesi için seçici (diğer bakteri ve mantarların üremesini inhibe eden) ve seçici olmayan sıvı, katı besiyerleri mevcuttur. Katı besiyerleri, yumurta bazlı ve agar bazlı besiyerleri diye ikiye ayrılırlar. Yumurta bazlı olanlara penisilin, sikloheksimid, nalidiksik asit ve linkomisin eklenerek, agar bazlı olanlara ise karbenisillin, polimiksin B, trimetoprim laktat, amfoterisin B eklenerek seçici besiyerleri elde edilir. Yumurta bazlı besiyerleri, taze homojenize tam

yumurta ya da yumurta sarısı, patates, gliserol, malaşit yeşili ve tuzların karışımından oluşmaktadır. İlk izolasyonu sağlamak için yumurta bazlı Löwenstein-Jensen (LJ), Petragnani, Trudeau, Dorset besiyerleri kullanılır, Antibiyotik direncinin belirlenmesinde ise Dubos, Kirschner, Middlebrook besiyerleri gibi agarlı besiyerleri kullanılır. İnkübasyon süresi yaklaşık 5 haftadır. Ancak özellikle son yıllarda ortaya çıkan ÇİD TB sorunu tanıya çok hızlı gidilmesini gerektirmektedir. Bu nedenle tüberküloz tanısında son yıllarda kullanılan geleneksel bakteriyolojik yöntemler yerine daha hızlı, daha duyarlı yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesi üzerinde çalışılmaktadır.<sup>5,7</sup>

Bifazik besiyerleri, Septi-check AFB (BD Biosciences, Sparks MD); %25 CO<sub>2</sub>'li ortamda 7H9 sıvı besiyeri içeren yatık çikolata agar, Middlebrook 7H11 agar ve modifiye LJ besiyeri gibi üç farklı katı besiyeri bulunmaktadır. İnokülasyondan önce kültür şişesine glikoz, pridoksal HCL, katalaz, bovin albümün, oleik asit (OADC) ve antibiyotikler PANTA (polimixinB, amfoterisinB, nalidiksik asit, trimetoprim, azlosilin) adı verilen bir supplement eklenir. MGIT ve MB Redox gibi basit sistemler yanında yarı otomatize sistemlerde kullanılmaktadır. Otomatize kültür yöntemleri MGIT 960 sistemi, BACTEC 460 TB sistemi, BACTEC 9000 MB sistemi, MB/ BACT Myco ESP2 sistemleride kültür amacıyla kullanılan ve daha hızlı sonuç veren sistemlerdir.<sup>7,8,22,43,44</sup>

### Besiyerine Ekim ve İnkübasyonu

Örnekler steril veya kontamine olmalarına göre farklı ön işlemlerden geçerler. Steril vücut sıvılarında 3500 g'de 30 dakika sürede santrifügasyon sonucunda elde edilen çökelti doğrudan kullanılabilir. Santrifüjleme işleminden sonra elde edilen sediment, 0,5 ml olarak seçilen

katı besiyerlerinin yüzeyine veya sıvı besiyerlerine ekilerek homojen yayılımı sağlanır. İlk izolasyon için genellikle bir yumurta bazlı besiyerine, bir agar bazlı besiyerine olmak üzere iki katı besiyerine, ya da yumurtalı besiyerine ek olarak bir sıvı besiyerine olmak üzere en az iki besiyerine ekim yapılması önerilmektedir. Kültürün inkübasyonu CO<sub>2</sub>'li ortamda yapılmalıdır. Mikobakteriler geniş bir üreme sıcaklık aralığına sahiptir. Özellikle MTB kompleksi en iyi 35–37 °C'de ürer. Ekim alanının yüzeyi yukarı gelecek şekilde materyalin besiyerine adsorbe olabilmesi için bekletilmesi gereklidir. Tüplerin vidalı kapakları atmosferden oksijen ve CO<sub>2</sub> alımı için gevşek kapatılmalıdır.<sup>6,7,50</sup>

#### Kültürlerin Değerlendirilmesi

Kültürler ilk 5 gün içinde hızla üreyen mikobakteriler açısından ve bakteri kontaminasyonu açısından değerlendirilmelidir. Sonraki haftalarda ise her hafta iki gün üremenin kontrolü açısından değerlendirme yapılmalıdır. Kültürlerin sonucunun negatif olarak kabul edilmesi için 8 haftalık inkübasyon süresi gerekmektedir.<sup>7,36,41</sup> ARB pozitif ise yaklaşık 3 hafta içinde üreme görülür. Fakat üreme görülmez ise yaklaşık 3-4 hafta daha bekletilmelidir. Kültürde üreyen bakteri ARB ile boyanmalı ve mikroskopik olarak değerlendirilmelidir. Ayrıca biyokimyasal ve fenotipik testlerde yapılarak değerlendirme tamamlanmalıdır.<sup>7,50</sup> Bactec kültür sistemi radyometrik bir yöntemdir. Bu yöntemde Middlebrook 7H12 gibi bir sıvı besiyerine radyoaktif karbon (C<sup>14</sup>) katılmakta ve ortamda üreyen mikobakterilerin oluşturduğu C<sup>14</sup> içeren CO<sub>2</sub>'in ölçümü ile 14 gün gibi kısa bir sürede sonuç alınabilmektedir. Yapılan çalışmalara göre yayma pozitif olgularda Bactec yöntemi ile ortalama 8, geleneksel kültür yöntemleri ile ortalama 19.4 günde, yayma negatif olgularda Bactec yöntemi ile ortalama 13.7, geleneksel kültür yöntemleri ile ortalama 26.3 günde pozitif sonuç alınmaktadır.<sup>42,44</sup>

MGIT (Mycobacteria Growth Incubator Tube) yönteminde Middlebrook 7H9 besiyerine oksijene bağlı rutenyum'lu floresans bir madde eklenir. Besiyerine ekilen örnekte mikobakteri varsa oksijenli bileşiği kullanır ve oksijenin azalmasıyla rutenyum ultraviyole ışıkta parlak renk verir. Mikobakterilerin MGIT sistemi ile ortalama 11, BACTEC yöntemiyle 8 günde izolasyonu yapılabilmektedir.<sup>42,43,44,52</sup>

### **2.11.5. Moleküler Biyolojik Tanı Yöntemleri**

#### **1-Nükleik asit probları**

Mikobakteriye spesifik DNA ve RNA probları tanımlamada kullanılmaktadır. DNA'nın laboratuvar koşullarında dissosiyeye olup iki tek sarmal haline geldikten sonra ortama konulan işaretli probun DNA ile hibridize olması sonucunda organizma varlığı tespit edilebilmektedir. RNA probları ile tanıya gidilmesi için ise örnekteki basil sayısının çok olması gerektiğinden bu yöntem kullanılmamaktadır.<sup>34,47</sup>

#### **2-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

Bu yöntem mikobakterilerin klinik örnekteki varlığını, basilin DNA'sını göstererek ortaya koyar. PZR, balgam, BAL, BOS, plevra sıvısı veya kan gibi bir çok biyolojik örnekte tek bir mikroorganizmayı saptayabilecek duyarlılıktadır ve özgüllüğü de oldukça yüksektir. PCR ile klinik örneklerde 10 kadar basilin saptanabilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu teknikte pozitif sonuç için örnek en az 10 mikobakteriyi içermelidir. Ancak bu yöntemin azda olsa yalancı pozitif sonuç vermesi önemli bir dezavantajdır. Ayrıca kültür sistemine göre daha pahalı bir yöntemdir.<sup>5,34,40,47,53</sup>



### 3.Fragman Uzunluk Polimorfizmi Restriksiyon Analizi (RFLP)

DNA restriksiyon endonükleazları DNA molekülünü keserler. Parçalar agaroz jel ile elektroforezde bantlar oluşturur. Sonrasında DNA'nın jelden membrana transferi yapılır. Son olarak basilin varlığı spesifik DNA probu ile gösterilir.<sup>34</sup>

### 4-DNA Dizi Analizi

Bu yöntemde bakterilerin korunmuş gen bölgelerine uygun primerler kullanılarak analiz gerçekleştirilir. Klinik materyallerden ve kültür örneklerinden nükleik asit (DNA; RNA) izolasyonu yapılır. Elde edilen nükleik asitler amplifiye edilir. Ürünler işaretlenir ve lazer yardımıyla okunur. Bilgisayarda anlamlı DNA dizilerine dönüştürülür. Daha sonra uluslararası gen bankalarındaki dizilerle karşılaştırılarak değerlendirilir.<sup>54</sup> Ayrıca farklı laboratuarlarda Gen-probe Amplified Mycobacterium Direct Test, Strand Displacement Amplification (SDA), DNA Microarray, Ligase Chain Reaction (LCR) gibi yöntemlerde tanı amacıyla kullanılabilir.<sup>34,40,47</sup>

### Lusiferaz testi

Klinik örneklerde lusiferaz enzim genini taşıyan haberci mikobakteriyofaj ile infekte edilen basiller lusiferin eklendiğinde ışık oluşturarak görünür hale gelirler. Örnekte 500-5000 kadar bakteri bulunması durumunda bile dört saat gibi bir süre tanı için yeterli olabilmektedir. Bu yöntemle ayrıca antitüberküloz ilaç duyarlılık testleri de yapılabilir.<sup>55</sup>

### 2.11.6. Mikobakterilerin İdentifikasyonunda Kullanılan Fenotipik Özellikler

Mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında koloni morfolojileri, boyanma özellikleri ve biyokimyasal özellikleri kullanılmaktadır. Kullanılan biyokimyasal testler arasında arilsülfataz, katalaz, niasin akümülyasyon, (*M.tuberculosis* pozitif), nitrat redüksiyonu, pirazinamidaz, sodyum klorür tolerans testi, tiofen-2-karboksilik asit hidrazit (T2H) ile üremenin inhibe edilmesi testi, tellürit redüksiyonu testi, Tween 80 hidrolizi testi, üreaz testi, demir tutulumu testi ve NAP Testi (Nitro- $\alpha$ -Acetylamino- $\beta$ -Hydroxypropriophenone) gibi bazı testler kullanılmaktadır. NAP ve PNB (paranitro benzoik asit) *M.tuberculosis*'ın gelişimini seçici olarak inhibe ederler. NTM'ler ise NAP ve PNB varlığında üremektedir. Mikolik asit esterlerinin HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography) yöntemi çoğu mikobakteri türlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır.<sup>40,48,55</sup>

Laboratuvarda üretilmiş mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılan konvansiyonel testler zor, zaman alıcı ve çalışanlar için tehlikeli olabilmektedir. Bu nedenle son zamanlarda bakterilerin tür düzeyinde tanımlanmasında Line Probe Assay (LPA) gibi moleküler tanı yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemle aynı zamanda bakterilerin antitüberküloz ilaçlara direnç profilide tanımlanabilmektedir.<sup>24,56</sup>

### 2.11.7. Tüberkülin Deri Testi

Bu test, enfeksiyon yoluyla veya BCG aşısı yoluyla basille daha önceden karşılaşan kişilerde gelişen aşırı duyarlılık reaksiyonunun derecesini göstermek için kullanılır. Yani pozitif test kişinin tüberküloz basili ile daha önceden karşılaştığını ve enfekte olduğunu gösterir.

Bu testte sıvı besiyerlerinde üretilen *M.tuberculosis* basillerinin çöktürülmesiyle elde edilen old tüberkülin veya saflaştırılmış Purified Protein Derivate (PPD) kullanılmaktadır. 0.1ml solüsyonda bulunan 5 TU dozundaki PPD günümüzde en yaygın uygulanan ve en iyi yorumlanan tüberkülin test materyalini oluşturmaktadır. Bir TU (tüberkülin ünitesi) 0.00002mg PPD proteinine eşdeğerdir. Tüberkülin testinde 0.1 ml PPD solüsyonu deri içerisine enjekte edilir ve enjeksiyon yerinde 6-10 mm çapında bir kabarcık oluşur. Test 48-72 saat sonra değerlendirilir. Tüberkülin testinde (Mantoux Testi) test bölgesindeki endürasyon çapı ölçülür. Genel olarak endürasyon çapının 10mm ve üzerinde olması pozitif, 5-6 mm olması şüpheli, 5mm'den az olması negatif olarak kabul edilir. Tüberkülin testi BCG aşısına bağlı olarak pozitif olabilir. Bu nedenle ülkemizde PPD değerlendirilirken; BCG aşısı olmayanlarda pozitiflik sınırı 10 mm, BCG aşısı olanlarda pozitiflik sınırı 15 mm olarak kabul edilmektedir. BCG'ye bağlı pozitiflik genellikle 3-5 yıl sürmekte ve 10 yılda tamamen kaybolmaktadır. Daha önce tüberküloz enfeksiyonu geçirenlerde zamanla PPD pozitifliği azalabilir ve PPD testi negatif çıkabilir. Bunlara test bir hafta sonra tekrarlanırsa, 10 mm'den büyük veya ilk testten 6 mm daha büyük PPD endürasyonu tespit edilir. Bu olaya booster reaksiyonu denilir. İmmün sistemi baskılanmış olanlarda ve HIV (+) olanlarda 5 mm ve üzeri pozitif olarak kabul edilir.<sup>7,23,57</sup>

### 2.11.8. Mikobakteri Enfeksiyonlarında Serolojik Tanı

Bu testler solunum yolları örneği veremeyen, direkt mikroskopik inceleme sonucu negatif olan hastalarda faydalı olmaktadır. ELISA ve immunokromatografik yöntemler günümüzde en sık kullanılan serolojik testlerdir. Antijen veya antikor kullanılarak vücut örneklerinde spesifik antijen yada antikor gösterilmesine dayanan çeşitli testler geliştirilmiştir. Bu testler iki grupta incelenebilir.

#### 1-Antijen göstermek için kullanılan serolojik testler

Mikobakterilerin hücre duvarında glikolipid yapısında antijenler bulunmaktadır. Bunlar, **PGL** antijen (fenol glikolipit), **DAT**, **TAT**, **CF** (cord factor veya trehaloz-6,6-dimikolat) gibi antijenlerdir. Antijen 5, Lipoarabinomannan (LAM) gibi antijenler mikobakterilerin plazma membranında ve duvar yapısında bulunan antijenlerdendir. Bu tip antijenler çeşitli serolojik test kitlerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır.

Özellikle İdrar, balgam ve serumda lipoarabinomannan (LAM) tespiti ile tüberküloz tanısı konulabilmektedir. İdrar örneklerinde bulunan tüberküloz basillerini tespit etmek için LAM kantitatif olarak tespit edilebilmektedir. Akciğer ve akciğer dışı örneklerde LAM'ı tespit etmek amacıyla testler geliştirilmiştir. Vücut sıvılarında ve BOS'taki antijenlerin tespiti için sandviç ELISA, inhibisyon ELISA, lateks aglütinasyon ve pasif hemaglütinasyona dayanan yöntemler kullanılmaktadır.<sup>57,58,59</sup>

#### 2-Antikor göstermek için kullanılan serolojik testler

Bu serolojik testlerde diaçil trehaloz, LAM, PGP, PPD, ısı şok proteinleri ve A65, A60, A38, A14 gibi antijenik proteinler ve benzerleri antijen olarak kullanılmaktadır. Akciğer tüberkülozu tanısında

kullanılan antikor tespit temeline dayanan ticari testler, MycoDot (LAM / Dot-blot testi), Detect-TB (Rekombinant protein peptit / ELISA), Pathozyme Myco (LAM / ELISA), Pathozyme TB plus (ELISA), Antigen A60 (Antijen-60 / Membran) ve ICT tuberculosis (rekombinant / Membran) gibi testlerdir. Tüberküloz hastalarının kan, plazma veya serumlarında bulunan antikorları tespit etmek amacıyla immunokromotografik yöntemine dayanan hızlı invitro testler (InstaTest TB, TB STAT-PAK ve ICT diagnostics, Bio-Analytics TB gibi) geliştirilmiştir.<sup>57,60</sup> BOS'da anti-PPD IgG antikorları kantitatif olarak ELISA ile gösterilebilmektedir. Ancak serolojik tanıda kullanılan hiçbir test mikroskopik incelemenin yerini alacak yeterlilikte değildir. DSÖ'ye göre tüberküloz tanısında kullanılacak serolojik testin duyarlılığı %80'in özgüllüğü ise %95'in üzerinde olmalıdır. Bu nedenle serolojik testler tüberküloz tanısında tarama amaçlı kullanılmaktadır.<sup>57</sup>

Bunların yanı sıra latent tüberkülozun ayırımında immünolojik temelli testlerde kullanılmaktadır. Bunlardan özellikle interferon gamma(IFN $\gamma$ ) üretiminin ölçülmesi ile latent enfeksiyon belirlenebilmektedir. Invitro şartlarda uyarılıp, duyarlılaşan T lenfositlerden salınan interferon gamma (IFN $\gamma$ ) üretiminin ELISA ile ölçümü esasına dayanır. Tüberküloz tanısında kullanılan diğer bir tanı testide "Yama Testi"dir. Yama Testi, aktif tüberküloz vakalarını belirlemenin yanında tedavinin izlenmesinde de yararlıdır. Yama testinde 72 saat sonra pozitif sonuç alınır ve pozitiflik bir hafta kadar sürer.<sup>5,61,62</sup> Tüberküloz olduğundan şüphelenilen ve BCG aşısı olan kişilerin PPD testinin pozitif sonuç vermesi bu konuda yorumu zorlaştırmaktadır. Bu nedenle hastadan elde edilen lenfositlerin RD1 gen ürününe tepkisi ölçülerek bu pozitifliğin aşı yada hastalıkla ilişkili olduğu anlaşılabilir. Çünkü RD1 antijeni *M.tuberculosis complex* üyeleri tarafından üretilirken, BCG aşısı suşu tarafından üretilmemektedir.<sup>63</sup>

## 2.12.Tüberkülozun Tedavisi

Tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar ikiye ayrılırlar:

- 1) Kabul edilebilir düzeydeki toksisite profili ile birlikte en efektif olan majör antitüberküloz yada birinci sıra ilaçlar
- 2) Genellikle daha az etkili, daha pahalı ve daha çok toksisitesi olan minör antitüberküloz yada ikinci sıra ilaçlar.<sup>7,8,64</sup>

### 1-Major Antitüberküloz İlaçlar (Sınıf I)

İzoniazid (INH), rifampisin (RİF), pirazinamid (PZA), streptomisin(SM) ve etambutol (EMB)'dur. Etambutol hariç hepsi bakterisidaldir. Tek doz uygulanan ve daha az toksik olan ilaçlardır. Streptomisin (SM), açık kaviterlerde ekstrasellüler olarak hızlı üreyen bakterilere etkilidir. İzoniazid (INH) ve rifampisin (RİF ) bütün mikobakterilere etkilidir. Rifampisin (RİF), kazeöz lezyonlarda bulunan yavaş üreyen basillere en etkili ilaçtır. Pirazinamid (PZA), asidik ortamda aktifleşen bir ilaç olduğundan yalnızca makrofajların içindeki basillere etkilidir.

### 2-Minör Antitüberküloz İlaçlar (Sınıf II)

Sikloserin, etionamid, tiasetazon, amikasin, kanamisin, kapreomisin, PAS, rifabütin ve florokinolonlar'dır.<sup>64,65</sup>

### 2.12.1. Tüberküloz Tedavisinde Uyulması Gereken Kurallar

En etkili, en güvenli ve en kısa süreli tedavi seçilmelidir. Basillerin duyarlı olduğu ilaçlar kombine kullanılmalıdır. İlaçlar düzenli ve yeterli süre kullanılmalıdır. Tedavinin başlangıcında basil sayısı en yüksek düzeyde olduğundan dirençli suşların oluşma olasılığı çok yüksektir. Ülkemizde olduğu gibi izoniyazid direncinin yüksek olduğu yerlerde

hastalığın başlangıcında dört ilaç kullanılmalıdır. İdame fazında en az iki ilaç kullanılmalıdır.

Günümüzde tüberkülozda temel sorun, hastaların düzenli ve yeterli bir süre ilaçlarını kullanmalarının sağlanamamasıdır. Bunun sonucu olarak dirençli vakalar oluşmakta ve bu direnç kazanan basiller hasta olmayan kişileri de enfekte etmektedir. Bu nedenle DSÖ, hastaların mümkünse ilk 2-3 aylık başlangıç tedavilerinin hastahane ya da başka bir sağlık biriminde yapılmasını önermektedir.

Başarısız bir tedavi kombinasyonunda ilaç eklenmemeli, tedavi tekrar uzmanlarca düzenlenmelidir.<sup>64,66</sup>

### **2.12.2. Tüberküloz Tedavi Sürecinin Takibi**

Tüberküloz hastasının tedavisini düzenli olarak sürdürmek ve tamamlamak tüberkülozun kontrolünde en önemli görevlerden birisidir. Tüberküloz tedavisi kesilmeden önce tedavinin 6. ve 8. aylarında balgam yaymaları incelenmelidir. Tedavinin 2. ve 3. aylarında balgam yayması negatifleşmelidir. Tedavi sonunda yayma pozitifliği devam ediyorsa 4'lü ilaçla tedavi süresi uzatılmalıdır. Bu tedavinin 5. ayında hala balgam yayması pozitif ise bu hastalar genellikle çoklu ilaç dirençli tüberküloz (ÇİD-TB) hastalarıdır. Bunların yanında hasta tedavi takibi eksiksiz olmalıdır. Hastanede yatan her TB hastasına mutlaka yattığı sürece ilaçları gözetim altında içirilmelidir. Bu mutlak zorunlu bir işlemdir. Ayaktan tedavide ise, İlaçlar sağlık personelinin doğrudan gözetimi altında kullanılmalıdır. Ancak buna imkan yoksa bu sorumluluk hastanın bir yakınına verilmelidir.<sup>64,66</sup>

### 2.12.3. Tüberkülozda İlaç Direnci

Antitüberküloz ilaçlara direnç primer veya sekonder olmak üzere iki şekilde olabilir. Primer direnç, ilaca dirençli tüberkülozlu hastayla temas veya dirençli olguların yüksek olduğu bölgede yaşama sonucu oluşabilir. Sekonder ilaç direnci ise, tedavi almış hastalarda gelişen dirençtir. Tüberküloz tedavisinde birden fazla ilaç kullanılması direnci önleyici en önemli faktörlerden birisidir. *M.tuberculosis*'te en sık gözlenen direnç mekanizması, mutasyonlar sonucu ilaçların aktivasyonunu sağlayan veya ilaçların hedefi olan enzimlerde değişimdir. Tek başına kullanılan antitüberküloz ilaçlarla tedaviye yanıt alınmasına rağmen ilaç direnci oluşumuna neden olmaktadır. Aynı zamanda yanlış ilaç kombinasyonları ve dozlardaki yetersizlik gibi nedenlerle de ilaçlara direnç gelişmektedir.

Çoklu ilaca dirençli tüberküloz (ÇİD - TB), izoniyazid (INH) ve rifampisin (RIF)'e birlikte direnç durumudur. Yaygın ilaç dirençli tüberküloz (extensively drug-resistant=XDR) (YİD-TB) ise izoniyazid ve rifampisine dirence ek olarak bir kinolon ve amikasin, kanamisin gibi ilaçlara birlikte direnç halidir. Spontan bir şekilde oluşan mutasyonların birikimi sonucu ÇİD-TB enfeksiyonları oluşmaktadır. Bu hastaların tedavisi çok daha güçtür ve tedavi edilemez hastalar ortaya çıkabilir. Dünyada bir yılda 500.000 ÇİD-TB ve 40.000 YİD-TB ortaya çıktığı tahmin edilmektedir.<sup>67,68,69,70,71</sup>



### 2.13. Tüberkülozdan Korunma

Bireylerin korunmasında BCG aşısı kullanılmaktadır. Enfeksiyon riski altındaki bireylere ilaçla (kemoprofilaksi) koruma uygulanmaktadır. Toplumsal korunma ise toplum içinde aktif tüberkülozlu hastaların izlenmesi ve etkili bir şekilde tedavi edilerek tüberküloz bulaşının engellenmesi yoluyla gerçekleştirilir.

#### 1-BCG aşısı ile korunma

Calmette ve Guerin, 1921 de Fransa'da *M. tuberculosis bovis*'i (bovin tipi tbc basili) uzun bir süre sığır safralı ve gliserinli patatesli besiyerinde defalarca üreterek ve yeni besiyerine pasajlayarak (Bacille-Calmette-Guerin (BCG) aşısını üretmişlerdir. Geliştirilen bu aşı suşunun insanlarda hastalık yapmadığı, ancak tüberküloz basiline karşı insana bir bağışıklık kazandırdığı anlaşılmıştır. Koruyuculuğu 5-6 yıl kadardır. Aşı suşu, ısıya ve ışığa dayanıksızdır. Aşı yapılmadan önce tüberkülin testi yapılmalıdır. Test sonucu pozitif ise aşı yapılmaz. Ülkemizde ilk BCG aşısı doğumdan sonra 2. ayını bitiren bebeklere Aile Sağlığı Merkezleri, Verem Savaşı Dispanserleri ve Sağlık Ocaklarında yapılmaktadır. Bundan sonra ilkokul 1. sınıfta bir aşı daha uygulanmaktadır. Aşı zamanı kaçırılmışsa önce tüberkülin cilt testi (PPD) yapılması koşulu ile aşı yapılabilir.<sup>66,72</sup>

#### 2- İlaçla koruma

Bulaşıcı tüberküloz hastasıyla teması olan 35 yaşından daha genç olanlara, 15 yaşından küçük hasta çocuklara, akciğer filminde tüberküloz lezyonu olanlara, bağışıklığı baskılanmış ve PPD pozitif kişilere uygulanmalıdır. Koruyucu ilaç tedavisinde amaç, enfekte olmayan sağlam kişileri tüberküloz enfeksiyonundan korumaktır. Enfekte olan ancak hasta olmamış kişilerde ise aktif tüberküloz hastalığı gelişme ihtimalini en aza düşürmek için de uygulanan bir koruyucu tedavidir. İlaçla koruma tedavisinde genellikle izoniyazid kullanılır. Toplam koruma tedavi süresi 6

aydır. Tüberküloz basili ile karşılaşmış olan herkese koruyucu ilaç tedavisi verilmesi olanaksızdır. INH ucuz, oral yolla kullanılabilen, bakterisid etkisi olan bir ilaçtır. Primer kemoprofilaksi, tüberkülozlu hasta ile yakın temasta bulunan ve tüberkülin testi (-) olan bireylerin INH ile korunmaya alınmasıdır.

Sekonder kemoprofilaksi, tüberkülin testi pozitif olan bireylerde yapılan koruma tedavisidir. ARB (+) bir kişi ile yakın temasta bulunan ve 15 yaşın altında PPD (-) bireylere koruma amaçlı tedavinin başlanması, 3 ay sonra PPD'nin tekrarlanması ve eğer yine (-) ise BCG yapılarak korumanın bitirilmesi önerilmektedir. Ancak eğer (+) ise tedavinin 6 aya tamamlanması gerekmektedir. Yaşları 0-6 arasında olan çocuklar aktif tüberkülozlu bir hasta ile yakın teması olsun veya olmasın PPD pozitifliği saptandığı takdirde koruma tedavisine alınırlar. INH'e direnç söz konusu olduğu durumlarda rifampisin verilir. Çoklu ilaç direnci söz konusu ise etambutol ve pirazinamid verilebilir.<sup>66,72</sup>

## 2.14. Lipidler

Lipidler, yapılarında C, H, O bulunan, yapı taşları yağ asitleri olan ve yağ asitleriyle esterleşebilen organik bileşiklerdir. Lipidler, suda çözünmeyen, apolar veya hidrofob bileşiklerdir. Ancak yapılarında hidroksil (-OH) ve karboksil (-COOH) grupları gibi hidrofilik grupları fazla olan lipidler suda nispeten çözünebilirler. Lipidlerin enerji değerleri yüksek olup, insanda depo ve yapısal fonksiyonu önemlidir. Lipidler, kloroform, benzen, eter, aseton, sıcak alkol gibi organik çözücülerde çözünebilirler. Trigliseridler, yedek enerji depolarıdır. Fosfolipidler, glikolipidler ve kolesterol, hücre membranı gibi bazı önemli organellerin yapısına giren lipidlerdir.<sup>73</sup>

### 2.14.1. Lipidlerin Sınıflandırılmaları

Lipidler biyolojik fonksiyonlarına göre 3'e ayrılmaktadırlar. Bunlar, Yağ asiti türevleri, Bileşik lipidler, İzopren lipidler'dir.

#### Yağ Asiti Türevleri

1- Doymuş Yağ Asitleri 2- Doymamış Yağ Asitleri 3- Yağ Asiti türevleri

#### Bileşik Lipidler

1- Nötral Yağlar; (Triaçilgliserol, trigliserit)

2- Fosfolipidler; (Serebrosit, Gangliosit)

3- Glikolipidler; (Gliserofosfolipid, Sfingofosfolipid (sfingomiyelin))

#### İzopren lipidler

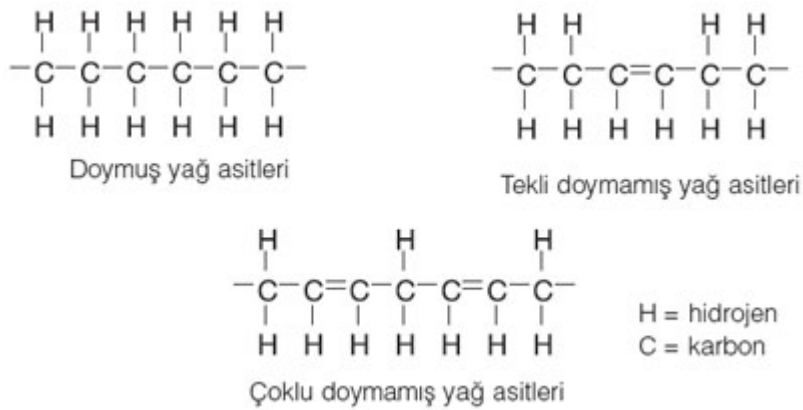
1-Steroidler

2-Karotenoidler

Bunlardan nötral yağlar yağ asitlerinin gliserolle yaptığı esterlerdir. Mumlar ise yağ asitlerinin alkollerle yaptığı esterlerdir. Kolesterol esterleri, yağ asitlerinin kolesterol ile yaptığı esterler, vitamin A esterleri, yağ asitlerinin vitamin A ile yaptığı esterler, vitamin D esterleri ise yağ asitlerinin vitamin D ile yaptığı esterlerdir.<sup>73,74,75</sup>

### 2.14.2. Yağ asitleri

Yağ asitleri, 4-36 karbonlu hidrokarbon zinciri bulunan monokarboksilik organik asitlerdir. Hidrokarbon zincirindeki -COOH karbonuna komşu ilk karbon atomuna  $\alpha$ -karbon, ikinciye  $\beta$ -karbon, üçüncüye  $\gamma$ -karbon denilmektedir. Metil grubunun karbonu ise  $\omega$ -karbon'dur. Yağ asitlerinin genel yapısı Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4: Yağ asitlerinin genel formülleri



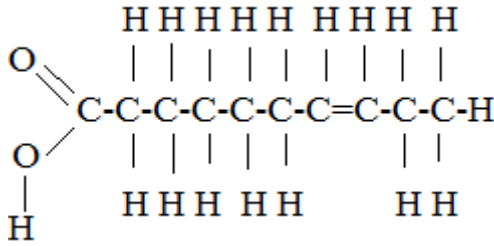
Tablo 1: Doymuş yağ asitleri genel formülleri ve isimleri<sup>73</sup>

Formülü	Doymuş yağ asitleri	Karbon iskeleti
CH <sub>3</sub> COOH	Asetik asit	2: 0
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH	Propiyonik asit	3: 0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	Butirik asit	4: 0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Kaproik asit	6: 0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	Kaprilik asit	8: 0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	Kaprik asit	10: 0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	Laurik asit	12: 0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH	Miristik asit	14: 0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	Palmitik asit	16: 0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	Stearik asit	18: 0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> COOH	Araşidik asit	20: 0
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>24</sub> COOH	Serotik asit	26: 0

Asetik asit, propiyonik asit ve butirik aside **uçucu yağ asitleri** denir. Bunlardan asetik asit 2 karbonlu en basit doymuş yağ asididir. Karbon sayısı 10'dan fazla olan yağ asitleri suda çözünmezler. Doymuş yağ asitlerinin 2-6 karbonluları kısa zincirli, 8-12 karbonluları orta zincirli, daha fazla karbonluları uzun zincirli olarak tanımlanırlar. Doymuş yağ asitlerinin karbon sayısı 10 ve daha az olanları oda sıcaklığında sıvı ve uçucudurlar, diğerleri katı yağlar olarak tanımlanırlar. Hayvansal yağlarda en çok bulunan yağ asitleri, 16 karbonlu palmitik asit ile 18 karbonlu stearik asittir.<sup>73,76</sup>

## 2) Doymamış Yağ Asitleri

Hidrokarbon zincirinde bir veya daha fazla çift bağ bulunduran yağ asitleridir (Şekil 6). Linoleik, linolenik ve araşidonik asit birer doymamış yağ asitidir.<sup>76</sup>



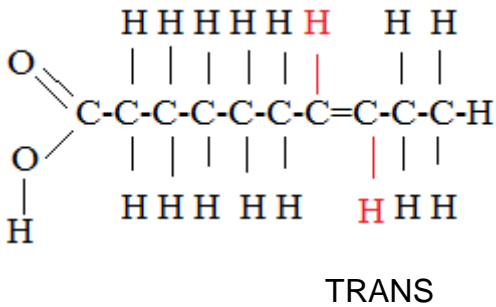
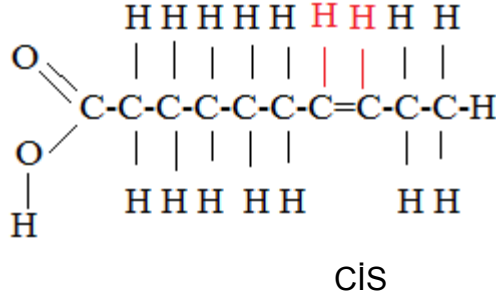
Şekil 6: Doymamış yağ asidinin yapı formülü

Doymamış yağ asitleri, hidrokarbon zincirinde içerdikleri çift bağ sayısına göre gruplara ayrılırlar. Bir çift bağ içerenler **monoansatüre (monoenoik)** yağ asitleridir, iki yada daha fazla çift bağ içerenler **poliansatüre** yağ asitleridir. Poliansatüre yağ asitleri, **dienoik**, **trienoik**, **tetraenoik** yağ asitleri olarak adlandırılırlar. Yağ asitlerinin karbon zincirlerindeki karbonların numaralandırılma işlemi, metil karbonundan itibaren yapılmaktadır.<sup>76</sup>

Hayvansal yağlarda en çok bulunan doymamış yağ asitleri palmitoleik asit, oleik asit, linoleik asit, araşidonik asittir. Doğada en çok bulunan yağ asidi, oleik asittir. Oleik asitten sonra yağlarda en çok bulunan yağ asidi, palmitik asittir. Suda yaşayan hayvanlarda ise en fazla palmitoleik asit bulunur. Meyvalardan elde edilen yağlarda en çok palmitik ve oleik asitler, az miktarlarda da linolenik asit bulunmuştur. Tohum yağları, palmitik asit yönünden zengindirler. İnsan vücudunda en fazla bulunan yağ asitleri; %45-50 oranında oleik asit, %25-27 palmitik asit, %7 palmitoleik asit, %8 linoleik asit ve linolenik asit, % 6 stearik asit, % 2 oranında araşidonik asittir. Linoleik asit, linolenik asit ve araşidonik asit,

insan vücudunda sentezlenemezler. Linoleik asit, pamuk yağı, yer fıstığı, mısır yağı ve soya fasülyesi yağı gibi tohum yağlarında bulunur. Linolenik asit ayrıca keten tohumu yağında, araşidonik asit ise yer fıstığı yağında çok miktarda bulunmaktadır.<sup>73,74,76</sup>

Doymamış yağ asitlerinde çift bağlarda oluşan değişiklikler izomerleri oluşturur. Yaygın izomer tipi **cis-** ve **trans-** izomer şekilleridir. Bu izomer formları Şekil 7’de gösterilmiştir. Çift bağın çevresindeki atom grupları aynı tarafta ise **cis-izomer**, zıt taraflarda ise **trans-izomer** olarak kabul edilir. Doymamış yağ asitleri oda ısısında sıvıdırlar, uçucu değildirler, suda çözünmezler.<sup>75</sup>



Şekil 7: Doymamış yağ asitlerinin cis-trans izomerleri



## Yağ Asitlerinin Genel Özellikleri

Yağ asitlerinin karboksil grupları ile alkollerin hidroksil grupları arasından su çıkışı ile birlikte iki molekülün birbirine ester bağıyla bağlanması sonucu esterler oluşur. Vücutta yağ asitleri, serbest veya daha büyük moleküller içinde yağ asidi esterleri şeklinde bulunurlar. Vücuttaki toplam yağ asidi, %45'i trigliserit, %35'i fosfolipid, %15'i kolesterol esteri ve %5'i serbest yağ asidi olarak bulunur. Yağ asitleri, metallerle tuzları oluştururlar. Karbon sayısı 6'dan fazla olan yağ asitlerinin metallerle oluşturduğu tuzlara **sabun** denir. Sodyum ve potasyum sabunları, suda çözüldüğü halde, diğer metal sabunları suda çözünmezler, bu nedenle sodyum ve potasyum sabunları temizleyici özelliğe sahip olmalarına rağmen diğerleri temizleyici özellik göstermezler. Doymamış yağ asitlerinde bulunan etilen bağı fluor, klor, brom, iyot gibi halojenlerden biri ile doyurulabilir. Bu olaya **halojenlenme** denilmektedir. Doymamış yağ asitleri oksitlenir ve farklı yapıda ürünler meydana gelmektedirler.<sup>75,76</sup> Doymamış yağ asitlerinin oksijen (O<sub>2</sub>) ile oksitlenmeleriyle **peroksit, enodiol, epoksit, ketohidroksit** gibi çeşitli gruplar ortaya çıkar. Yağ asitlerinin çoğu sıcak alkol, eter, benzol ve kloroform da çözünürler. Karbon sayısı 10 ve düşük olan doymuş yağ asitleri, oda sıcaklığında sıvı ve uçucudur. Karbon sayısı arttıkça katılaşırlar. Zincir uzunluğu arttıkça uçuculuk azalır, erime noktası yükselir.

Karbon sayısı 10'dan fazla olan yağ asitleri suda çözünmezler. Uzun zincirli yağ asitlerinde hidrokarbon zincirinin hidrofobik özelliği daha fazla olduğundan uzun zincirli yağ asitleri suda çözünmezler. Doymamış yağ asitleri oda sıcaklığında sıvıdır, uçucu değildir, suda çözünmezler.<sup>74,75,76</sup>

### 2.14.3. Bakterilerde Lipid Biyosentezi

Lipidler, çeşitli bileşikler halinde, mikroorganizmaların hücre duvarında, sitoplazmik membranında ve besin deposu olarak da hücre içinde bulunurlar. Mikobakterilerde de hücre duvarında çok fazla miktarda lipid bulunmaktadır. Mikroorganizmalarda bulunan hidrolitik enzimler yağları esas bileşenlerine ayırır. Lipidler, hidrolize olunca, yağ asitleri ve gliserin oluşur. Mikroorganizmaların bazıları, karbon kaynağı açısından zengin ortamda ürediklerinde özellikle mikobakteriler yeterli lipid sentezleyerek asido-rezistans özellik oluştururlar. Uzun zincirli yağ asitlerinin monomerik prekürsörleri Acetyl-CoA ile malonyl-CoA'dır. Malonyl-CoA, CO<sub>2</sub> ve acetyl-CoA'dan biotin gerektiren bir reaksiyon sonucu meydana gelir.<sup>62</sup> Lipid sentezi bakterilerde de diğer canlılardaki gibi karmaşık biyokimyasal reaksiyonlar sonucu yapılmaktadır. Örneğin palmitik asidin sentezi şu şekilde gerçekleşmektedir.

Asetil CoA'dan palmitik asit sentezi

1-Asetil CoA + Asetil CoA karboksilaz + ATP + CO<sub>2</sub> ----- Malonil CoA  
(+ HOOCCH<sub>2</sub> COSCoA) + ADP+P (Asetil CoA karboksilaz koenzimi biotin'dir.)

2-Malonil CoA + YA sentaz kompleksi ----- Asetoasetil + CoA

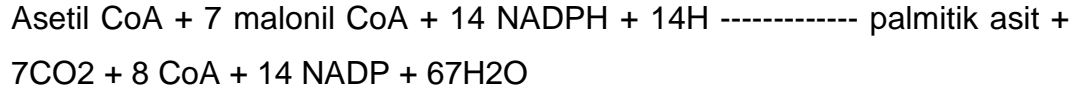
3-Asetoasetil + NADPH + YA sentaz kompleksi ----- Beta-hidroksil butiril + NADP

4-Beta-hidroksil butiril + YA sentaz kompleksi ----- Krotonil + H<sub>2</sub>O

5-Krotonil + NADPH + YA sentaz kompleksi ----- Butiril + NADP

6- Butiril ----- Palmitat

Yağ asitlerinin sentezi için gerekli enerji ATP'den sağlanır. Önce acetyl-CoA, asetilasyona uğrayarak malonyl-CoA oluşur. Bu molekülden bir palmitik asit oluşmaktadır. Tüm reaksiyonların özeti aşağıda gösterilmiştir.



Birçok bakteri lipidleri hücre içinde depolayabilmektedir. Bazı mikroorganizmalar (mikobakteri, korinebakteri, nokardia) lipidleri, 30-90 karbon atomlu yağ asitleri halinde depolarlar. Gram negatif bakterilerde bulunan lipopolisakkaridler ve gram pozitif bakterilerde bulunan ribitol veya gliserol ve teikoik asit mikroorganizmaların antijenik özelliklerini verir. Enterobakterilerde lipid, antijenik özellik gösteren polisakkaridlere bağlanır. Lipid A adı verilen bu yapı, glukoz amin, 3 deoxy-D-mannooctulonic asit, yağ asitleri ve fosfattan oluşmaktadır. Gram pozitif bakterilerde bulunan teikoik asitler ise ribitol veya gliserol ihtiva eden polimerlerdir.<sup>22,77</sup>

## 2.15. *Pistacia eurycarpa*

*Pistacia* cinsi 11 veya daha fazla türün dahil olduğu *Anacardiaceae* familyasının bir üyesidir. Taksonomideki yeri aşağıda gösterilmiştir.

*P. eurycarpa*'nın taksonomik yeri.<sup>78</sup>

Alem : *Plantae*

Altalem : *Tracheobiota*

Bölüm : *Magnoliophyta*

Sınıf : *Magnoliopsida*

Altsınıf : *Rosidae*

Takım : *Sapindales*

Aile : *Anacardiaceae*

Cins : *Pistacia*

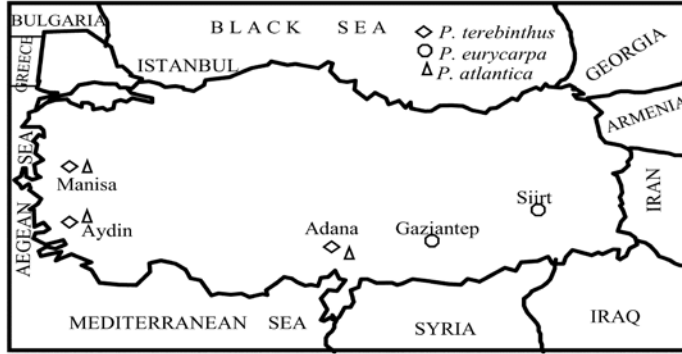
Türkiye'de yaklaşık 66 milyon yabancı *Pistacia* ağacı bulunmaktadır. Türkiye'de en fazla rastlanılan başlıca yabancı *Pistacia* türleri; *P. terebinthus*, *P. eurycarpa*, *P. khinjuk*, *P. palaestina*, *P. atlantica* ve *P. lentiscus*'dur. *Anacardiaceae* familyasına giren *Pistacia*'nın farklı türleri, Akdeniz'in kuzeyinde yer alan ülkelerden; Kıbrıs, Fransa, Yunanistan, İtalya, İspanya ve Türkiye'de, Kuzey Afrika ülkelerinden; Tunus, Fas ve Cezayir'de, Ortadoğu ülkelerinden; Afganistan, İran, Irak, Pakistan, Suriye ve Hindistan'ın kuzeyindeki bazı yerlerde doğal olarak yer bulmaktadır. Afganistan, İran ve Türkiye türler açısından en zengin

ülkelerdir.<sup>78</sup> Pistacia türlerinin ülkelere göre dağılımı Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Farklı ülkelerdeki *Pistacia* türleri<sup>78</sup>

	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>	<i>P. terebinthus</i>	<i>P. khinjuk</i>	<i>P. palaestina</i>	<i>P. vera</i>	<i>P. mutica</i>	<i>P. eurycarpa</i>	<i>P. chinensis</i>	<i>P. saportae</i>
Türkiye	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>	<i>P. terebinthus</i>	<i>P. khinjuk</i>		<i>P. vera</i>		<i>P. eurycarpa</i>		
Suriye	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>		<i>P. khinjuk</i>	<i>P. palaestina</i>	<i>P. vera</i>				
Irak		<i>P. atlantica</i>		<i>P. khinjuk</i>		<i>P. vera</i>			<i>P. chinensis</i>	
İran				<i>P. khinjuk</i>		<i>P. vera</i>	<i>P. mutica</i>			
Lübnan	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>			<i>P. palaestina</i>	<i>P. vera</i>				
Mısır	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>		<i>P. khinjuk</i>						
Tunus	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>	<i>P. terebinthus</i>							
Fas	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>	<i>P. terebinthus</i>			<i>P. vera</i>				
İspanya	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>	<i>P. terebinthus</i>							
İtalya	<i>P. lentiscus</i>		<i>P. terebinthus</i>			<i>P. vera</i>				
Yunanistan	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>	<i>P. terebinthus</i>		<i>P. palaestina</i>					
İsrail										
Ürdün	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>	<i>P. terebinthus</i>	<i>P. khinjuk</i>						
Filistin	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>		<i>P. khinjuk</i>	<i>P. palaestina</i>					<i>P. saportae</i>
Avrupa Florası	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>	<i>P. terebinthus</i>			<i>P. vera</i>				
Suriye Florası	<i>P. lentiscus</i>		<i>P. terebinthus</i>		<i>P. palaestina</i>	<i>P. vera</i>	<i>P. mutica</i>			
Pakistan		<i>P. atlantica</i>		<i>P. khinjuk</i>					<i>P. chinensis</i>	
Kıbrıs	<i>P. lentiscus</i>	<i>P. atlantica</i>	<i>P. terebinthus</i>			<i>P. vera</i>				

Bu ülkelerde farklı *Pistacia* türleri doğal ormanlar halinde bulunmaktadır. *Pistacia eurycarpa* 32 °C’den fazla, 5 °C’ den az uzun süreli sıcaklık gösteren iklimlerde yetişmemektedir. *Pistacia* ağaçları dinlenme döneminde normal olarak dona dayanıklıdır. Ülkemizde -30 °C’ ye, İran’da ise -20 °C’ ye gösterdiği tolerans *Pistacia*’nın ne kadar dayanıklı olduğunu gösterir. Ülkemizde yabancı *Pistacia* türleri en çok Siirt, Gaziantep, Manisa, Adana ve Aydın illerinde bulunmaktadır. Yabancı *Pistacia* türlerinin ülkemizdeki dağılımı Şekil 8’de gösterilmiştir.<sup>79</sup>



Şekil 8: Yabani *Pistacia* türlerinin Türkiyede bulunduğu yerler.<sup>79</sup>

Türkiyede en yaygın yabancı *Pistacia* türleri olan *P.terebinthus*, *P.eurycarpa*, *P.atlantica* ve diğer türler özellikle yağ ve sabun üretiminde kullanılmaktadır. *P.eurycarpa*, Yaltırık ve arkadaşları tarafından 1967’de bir *Pistacia* türü olarak tanımlanmıştır. *P.eurycarpa* Türkiyede Güney Doğu Anadolu’da, özellikle Siirt, Bitlis, Mardin ve Hakkari’de yetişmektedir. Bu yabancı türler içinde *P.eurycarpa*, yaprak uzunluğu, yaprak ağırlığı, tohum uzunluğu, tohum ağırlığı en fazla olanıdır. Ancak diğer iki tür bu özellikler açısından birbirine oldukça yakındır. Yaprakları en açık renkli olan ise *P.eurycarpa*’dır.<sup>79,80</sup> *P.eurycarpa*’nın sakızında bulunan uçucu maddeler ve bu maddelerin antimikrobiyal aktiviteleri çeşitli yöntemlerle Demirci ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur. Yaptıkları çalışmada *P.eurycarpa* reçinesinde çok sayıda alken saptamış ve bu alkenlerin gram pozitif ve negatif bakteriler üzerinde değişik düzeylerde antibakteriyel aktiviteye sahip olduklarını göstermişlerdir.<sup>80</sup>

Kafkas ve ark. yaptıkları bir çalışmada iyon kromatografi yöntemini kullanarak *P.eurycarpa*’nın yapısında bulunan yağ asitlerini belirlemişlerdir.<sup>81</sup> Araştırmacılar bu çalışmada *P.eurycarpa*’da % 17.7 oranında methyl oleate, % 16.7 methyl palmitate, % 4.3 methyl stearate,

% 2 methyl palmitoleate, % 1.4 oranında 11-eicosenic acid methyl ester, % 1.3 oranında da heptadecene-(8)-carbonic acid belirlemiştir. Ayrıca aynı bitkide 1%'den daha az oranlarda da methyl ricinoleate, methyl arachidate, methyl myristate, methyl 9,10-methylene hexadecanoate, methyl behenate, methyl erucate, belirlemiştir. Ayrıca bitkide ticari miktarlarda methyl octanoate, methyl decanoate, methyl laurate ve methyl pentadecanoate'da tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak gaz kromatografisi yöntemi ile bu bitkide % 52.2 oranında oleik asit, % 17.7 oranında palmitik asit ve % 16.7 oranında da linoleik asit tespit etmişlerdir.<sup>81</sup>

*P.eurycarpa*, ilk kez 1967 yılında F.Yaltırık tarafından *Pistacia eurycarpa yalt.* olarak tanımlanmış ve literatürde ülkemize ait endemik bir bitki olarak yerini almıştır. Bu bitki Antep Fıstığı ile aşılansarak "Siirt Fıstığı" na dönüştürülmektedir. Son yıllarda ekonomik değeri nedeniyle tarımda yaygın olarak Siirt Fıstığı üretiminde yararlanılmaktadır. Bitim meyvasının yeşil kabuklarından çeşitli sabunlar üretilmektedir. Bitim Sabunu olarak bilinen bu sabunlar kozmetik amaçlarla yaygın bir kullanım alanı bulmuş ancak Siirt Fıstığı yetiştiriciliği nedeniyle üretimi son yıllarda azalmıştır.<sup>82,83</sup>

*P.eurycarpa*'nın yağ asitleri kompozisyonları belirlenmiş, bu bitkiden elde edilen yağ asitleri ve reçinesinde bulunan uçucu maddelerin antibakteriyel, antifungal ve insektisidal etkileri değişik araştırmalarla incelenmiş ve *Pistacia* türleri ile filogenetik ilişkileri araştırılmıştır.<sup>84,85,86,87,88,89,90</sup>

## 2.16. Vitaminler

Vitaminler, vücutta sentezlenemeyen, sağlıklı beslenme için küçük miktarlarda alınmaları zorunlu olan, herhangi birinin eksikliği spesifik bir bozukluk ve hastalık meydana getiren organik maddelerdir.

### Vitaminlerin sınıflandırılmaları

Vitaminler, suda çözünen vitaminler ve yağda çözünen vitaminler olmak üzere iki sınıfa ayrılarak incelenirler.<sup>91</sup>

### I-Suda çözünen vitaminler

Suda çözünen vitaminler, vitamin B<sub>1</sub> (tiamin), vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin), nikotinik asit (niasin), vitamin B<sub>5</sub> (pantotenik asit), vitamin B<sub>6</sub> (piridoksin), biotin (vitamin H), folik asit, vitamin B<sub>12</sub>, ve vitamin C (askorbik asit) dir. Suda çözünen vitaminlerin birbirinden çok farklı kimyasal yapıları vardır, fakat hepsi polar moleküllerdir. Bu nedenle suda çözünürler. Vitamin B<sub>12</sub> dışında kalan suda çözünen vitaminler bitkiler tarafından sentez edilebilmektedirler. Vitamin B<sub>12</sub> ve vitamin C (askorbik asit) hariç suda çözünen vitaminler vücutta depo edilemediklerinden diyetle devamlı olarak alınmak zorundadırlar. Kolin, karnitin, α-lipoik asit, PABA (p-aminobenzoat), inozitol, koenzim Q gibi bileşikler vitamin benzeri bileşikler olarak bilinirler. Vitamin benzeri bileşikler, suda çözünürler ve bazı kimyasal reaksiyonları katalize ederler. Ayrıca bunlarda vücutta sentezlenemezler bu nedenle dışarıdan alınmaları gereklidir.<sup>91,92</sup>



## II-Yağda çözünen vitaminler

Bunlar vitamin A, vitamin D, vitamin E, vitamin K'dir. Yağda çözünen vitaminlerin hepsi izopren türevi apolar moleküllerdir. Bağırsaklardan emilen yağda çözünen vitaminler, şilomikronlar içinde karaciğere taşınırlar. Vitamin A, vitamin D ve vitamin K karaciğerde depolanırken, vitamin E yağ dokusunda depolanır. Yağda çözünen vitaminler, kanda lipoproteinler veya spesifik bağlayıcı proteinler tarafından taşınırlar. Yağda çözünen vitaminler, safra yoluyla atılırlar ancak idrarla atılmazlar. Vitamin A ve vitamin D'nin yüksek dozlarda alınmaları toksik etkiler meydana getirir.<sup>91,92</sup>

### Vitamin A (retinol)

Vitamin A, dört izopren molekülünden oluşan retinolün biyolojik aktivesini gösteren bir bileşiktir. Suda çözünmez, lipidlerde ve organik çözücülerde çözünür. Isıya karşı duyarlıdır. UV ışınları tarafından yıkılır. Vitamin A molekülündeki çift bağlar ışıkta hava oksijeni tarafından kolaylıkla oksitlenebilir ve vitamin A aktivitesi kaybolur. Doğal besinlerdeki vitamin A, vitamin E gibi antioksidanlar tarafından korunur. Vitamin A, hayvanlarda retinolün uzun zincirli yağ asidi esterleri halinde, bitkilerde ise bir provitamin olan  $\beta$ -karotenler halinde bulunur. 1 IU vitamin A, 0,03  $\mu$ g vitamin A'ya veya 0,6  $\mu$ g  $\beta$ -karotene denktir. En yüksek vitamin A konsantrasyonu, deniz balıkları ve karaciğer yağında bulunur. Kolostrum, süt, tereyağı ve yumurta sarısı da önemli vitamin A kaynaklarıdır. Vitamin A'ya ait hedef hücrelerin büyük kısmı retinolü retinale ve retinoik aside metabolize etme yeteneğindedirler. Retinol, retinal ve retinoik asidin kendilerine özgü biyolojik fonksiyonları vardır. **Retinol**, bir hormon gibi işlev görür. **Retinal**, görme pigmenti rodopsinin gerekli ön maddesidir. **Retinoik asit** ve metabolitleri, epitel farklılaşması üzerinde etki gösterirler ve glikoproteinlerin sentezinde oligosakkarit taşıyıcıları olarak işlev görebilirler. Vitamin A bütün ektoderm için koruyucu bir maddedir. Vitamin

A, aynı zamanda bir büyüme faktörü olup, osteoblast aktivitesi ile osteoklast aktivitesini düzenler. Vitamin A eksikliğinin erken belirtilerinden biri, karanlığa karşı adaptasyon bozukluğu ile bilinen **gece körlüğüdür**. Günlük vitamin A gereksinimi 2-3 mg kadardır. Alınan günlük vitamin A miktarının normalin çok üstünde olması halinde **hipervitaminoz A** tablosu ortaya çıkar.<sup>92</sup>

### Vitamin D (Kalsiferoller)

Vitamin D<sub>1</sub> olarak adlandırılan madde, kalsiferollerin ve diğer sterollerin bir karışımıdır. Vitamin D<sub>2</sub> ve Vitamin D<sub>3</sub> eşit biyolojik güce sahiptirler. Bir IU vitamin D, 0,05 µg kalsiferole eşittir. Vitamin D, lipidlerde ve organik çözücülerde çözünür. Isı ve hava oksijenine dayanıklıdır. Vitamin D<sub>2</sub> mantar ve mayalarda fazla miktarda bulunur. Vitamin D<sub>3</sub> en çok balık karaciğer yağlarında, az miktarda yumurta sarısı, süt ve tereyağında bulunur. Diyetle alınan vitamin D<sub>2</sub> ve vitamin D<sub>3</sub> ince bağırsakta emilirler. Emilen vitamin D<sub>2</sub> ve vitamin D<sub>3</sub> spesifik bir globuline bağlı olarak kanla karaciğere taşınırlar. Vitamin D'nin genel etkisi, kalsiyum ve fosforun organizmaya alınışını ve organizmada tutulmasını artırmak, onların kullanılması ile kemik mineralizasyonunu sağlamaktır. Vitamin D eksikliğinin neden olduğu başlıca biyokimyasal anormallikler, hipokalsemi ve hipofosfatemidir. Vitamin D eksikliğinin neden olduğu en önemli hastalıklar, iskeletin gelişmesi döneminde **raşitizm**, iskelet gelişimi tamamlandıktan sonra ise **osteomalazi**'dir.<sup>91,92</sup>

### Vitamin E (Tokoferoller)

Vitamin E, doğal olarak oluşan yedi tokoferolü ifade eden jenerik bir isimdir. Tokoferoller sarımsı yağlardır, suda çözünmezler, yağda çözünürler. Oksitlenmeye karşı duyarlıdırlar.

Oksijensiz ısıya 200°C'ye kadar dayanırlar, UV ışınları karşısında yıkılırlar. Çeşitli tokoferollerin biyolojik etkinlikleri arasında farklar vardır. Bir vitamin olarak doğada en yaygın şekilde dağılmış olan ve en büyük biyolojik aktiviteye sahip olan tokoferol, **α-tokoferol**'dür.

Çimlenmekte olan tahıl tohumları tokoferol bakımından zengindir. Tokoferoller, yağda çözünen vitaminler olarak lipidlerle birlikte dışarıdan besinlerle alınırlar. α -tokoferol ince bağırsaktan kolayca emilir. Vitamin E'nin, doğanın en güçlü yağda çözünen antioksidanı olması ve selenyum metabolizmasında spesifik bir rol oynaması gibi en az iki metabolik rolü vardır. Vitamin E, vitamin A'yı, karotenleri, doymamış yağ asitlerini ve tiyol gruplarını oksitlenmeye karşı korur. Vitamin E'nin, sellüler ve subsellüler membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturduğu savunulmaktadır. Tokoferoller, fenolik bir hidrojeni, peroksidasyona uğramış bir poliansatüre yağ asidindeki serbest peroksit radikaline aktarabilmelerinin sonucu olarak serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırarak antioksidan gibi davranırlar.<sup>91,92</sup>

### Vitamin K (Naftokinonlar)

Vitamin K, poliizoprenoidlerle substitue olmuş naftokinonlar için jenerik bir isimdir. Çeşitli naftokinonlarda ortak etkili yapı, 2-metil-1,4-naftokinondur. Doğal olarak bulunan K grubuna dahil maddeler, bitkilerde bulunan ve 3 numaralı karbondaki bir yan zincir içeren **fillokinon (vitamin K<sub>1</sub>)** ile bağırsak bakterileri tarafından sentez edilen ve 3 numaralı karbondaki yine bir yan zinciri içeren **farnokinon (vitamin K<sub>2</sub>)**,

**menakinon)**'dur. Vitamin K serisinin ana ürünlerinden olan menadion (vitamin K<sub>3</sub>), sentetik bir maddedir. Doğal olarak bulunmamaktadır, organizmaya verildiğinde in vivo ortamda menakinonlardan birine alkile olmaktadır. Vitamin K yağda çözündüğü için emilimden sonra lipidlerle birlikte lenf kanalı sisteminde ve kanda bulunur.<sup>91,92</sup>

## **2.17. Bitkisel yağların ve diğer özütlerin elde edilmesi ve tanımlanması**

### **2.17.1. Ekstraksiyon**

Ekstraksiyon bir yapıda bulunan ve ayırt edilmesi istenen maddeyi ayrı bir faza aktararak diğer maddelerden ayırt etme işlemidir. Ekstraksiyon ya çözümlerde çözülmüş halde bulunan maddelerin ya da katı karışımlardaki maddelerin ayrılması amacı ile kullanılır. Asidik, bazik ve nötral organik bileşiklerin ayrılmasında ya da saflaştırılmasında aktif ekstraksiyon yöntemi kullanılır. Böylece birbirine uygun asidik bir madde ile bir bazik madde tepkimeye sokularak tuz oluşturulur ve su fazına çekilmesi sağlanır. Sonuç olarak nötr yapıdaki bileşik organik fazda kalacaktır.<sup>93,94</sup> Çeşitli ekstraksiyon yöntemleri aşağıda sıralanmıştır.

### **2.17.2. Ekstraksiyon Yöntemleri**

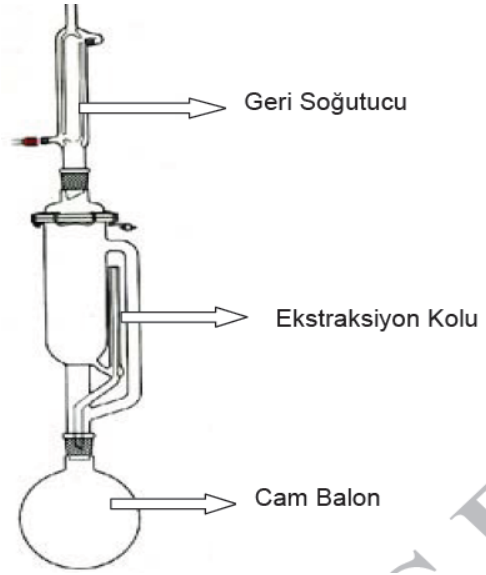
1. Katı faz ekstraksiyonu (SPE)
2. Süper kritik akışkan ekstraksiyonu (SFE)
3. Süper ısıtılmış su ile ekstraksiyon (SWE)
4. Katı-sıvı ekstraksiyonu
5. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu
6. Katı-gaz ekstraksiyonu
7. Sıvı-gaz ekstraksiyonu
8. Çözücü ekstraksiyonu
9. Basınçlı sıcak çözücü ekstraksiyonu (ASE)

### Katı-sıvı ekstraksiyonu

Katı-sıvı ekstraksiyonu ile katı içinde bulunan bir madde, bu maddeyi çözebilen bir sıvı yardımı ile alınır. Fazlar ayrıldıktan sonra sıvının herhangi bir yoldan uzaklaştırması ile katı içindeki madde ele geçer. Maddenin katı içinden diffüzenmesi yavaş bir işlem olduğu için katı örnek ince toz haline dönüştürüldükten sonra ekstrakte edilmelidir. Böylece maddenin çözücü ile daha fazla teması sağlanır. Çeşitli bitkilerdeki yağ hegzan ile ekstrakte edilerek çekilir. Katı-sıvı ekstraksiyonda ise Soxhlet Ekstraktörü denen bir cihazla yapılır. Ekstraksiyon 1 ile 72 saat arasında gerçekleşebilir. Ekstraksiyonda kullanılan çözücüler aseton, kloroform ve diklorometan gibi çözücülerdir.<sup>95,96</sup>

### Soxhlet Ekstraksiyon Cihazı

Soxhlet ekstraksiyon yöntemi bitkilerden çok miktarda, en basit ve en ucuz yolla essansiyal yağ elde etmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde öncelikle, katı materyal küçük parçalara ayrılır ve bu katı parçacıklar selülozdan yapılmış olan ekstraksiyon kartuşuna doldurulur. Bu kartuş da ekstraksiyon kolunun içine yerleştirilir. Cam balona solvent olarak kullanılacak kimyasal madde konulur ve ısıtıcı yardımıyla bu maddenin buharlaşması sağlanır. Buharlaşan çözgen ekstraksiyon kolundan geçerek geri soğutucuya ulaşır. Geri soğutucuda yoğunlaşan çözgen tekrar ekstraksiyon koluna gelerek kartuş içerisinde bulunan maddeyi çözer ve cam balona geri döner. Bu işlemin sürekli tekrarlanması ile ekstraksiyon gerçekleşir.<sup>96</sup> Soxhlet ekstraksiyon cihazı Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9: Soxhlet ekstraksiyon cihazı<sup>96</sup>

Soxhlet cihazı ile yapılan ekstraksiyon, az miktarda çözücü gerektirmesi, kısa sürede ekstraksiyonun tamamlanması ve etkin bir ekstraksiyon sağlanması nedeniyle tercih edilen bir ekstraksiyon yöntemidir. Sıcakta bozulan maddelere ise uygulanamaması dezavantajdır.

### Sıvı-sıvı ekstraksiyon

İki sıvının yoğunluk farkına dayanan bir ayırma işlemidir. Yöntem, yoğunluğu küçük olan sıvının üstte, büyük olanın ise altta toplanması esasına dayanır. Yoğunlukları birbirine yakın olan maddeler kolay ayrılmaz. Böylece su fazı NaCl ile doyurularak yoğunluğu artırılır. Suda çözülmüş olan bir organik madde, daha çok çözünebileceği ve su ile karışmayan eter ya da kloroform gibi organik sıvılarla ekstrakte edilir.

### Süperkritik (SC) akışkan ekstraksiyonu

Isıya, ışığa ve oksijene hassas olan ve kalıntı istenmeyen gıda bileşenlerinin ayrıştırılması için SC akışkanların kullanılması daha uygundur. Belirlenen basınç ve sıcaklıkta süper kritik akışkanda çözünen

karışım bir ayırıcıya alınır. Basıncının düşürülmesi ile çözme gücünü kaybeden akışkan üründen ayrılır. Süperkritik akışkanlar, sıkıştırılabilme, homojenlik ve sürekli değiştirilebilme özellikleri gibi önemli özellikler gösterir. Süperkritik akışkanlar, gaz ve sıvı arasında özelliklere sahiptirler, basınçla kontrol edilirler. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda CO<sub>2</sub>, amonyak, etilen ve toluen genel olarak amaca uygun olan çözücülerdir. Bunlar içinde en çok kullanılanı CO<sub>2</sub>'dir.

### Çözücü ekstraksiyonu

Birbiri içinde çözünmeyen, karışmayan, aynı kap içerisine konulduklarında dışardan bir etki yapılmadığı taktirde ayrı fazlar halinde kalan iki sıvı arasındaki kütle aktarımıdır. Birbiri ile karışmayan iki sıvı çalkalanarak moleküllerin birbiri ile temas etmeleri sağlanır ve böylece istenilen bileşenin çözücü fazına transfer olması sağlanır. Çözücü ekstraksiyonu, süzme, ayırma, yoğunlaştırma, evaporasyon, destilasyon gibi farklı işlemlerden oluşur.

### Katı faz ekstraksiyonu

Sıvıdaki hedef maddenin katı fazda tutulması, daha sonra ortama ilave edilen bir çözücü yardımı ile katı fazdan hedef maddenin geri alınmasıdır.

Katı faz ekstraksiyonunda üç ayrı yöntem kullanılabilir;

1. Ters faz (Reversed phase) SPE: Apolar moleküller tutulur.
2. Normal faz (Normal phase) SPE: Polar moleküller tutulur.
3. İyon değiştirme (Ion Exchange) SPE: Katyon değiştirme ve anyon değiştirme mekanizması olmak üzere iki çeşit iyon değiştirme mekanizması vardır.

### Süper ısıtılmış su ile ekstraksiyon

Süper ısıtılmış su ile ekstraksiyon, basınç altında 100-350 °C sıcaklık değerleri arasındaki şartlarda çalışır. Süper ısıtılmış su, 100-374°C arasındaki sıcaklık aralığında, basınç altındaki sıvı su demektir. Süper ısıtılmış su kullanmanın bir çok avantajlı yönleri vardır. Bu avantajlar arasında, çevre dostu, ucuz ve kolay bulunur olması, toksik olmaması ve organik atık bırakmaması gibi özellikler sayılabilir. Süper ısıtılmış su, oda sıcaklığındaki sudan çok daha az polardır. Sıcaklık yükseldikçe suyun polaritesi düşmektedir. Verilen şartlar altında polar veya düşük polarlıktaki birçok maddeyi ekstrakte edebilmektedir. Bu yöntem, bitkilerdeki değerli bileşiklerin ya da esans yağlarının ekstraksiyonunda kullanılabilir. Esans yağlarının ekstraksiyonu için sıcaklık 100 ile 200°C arasında olmalıdır. Bu yöntemlerin dışında sıvı-gaz ve katı-gaz ekstraksiyon yöntemleride kullanılmaktadır.<sup>93,94,95,96</sup>

Tıbbi önemi olan bitkilerdeki biyolojik aktif maddelerin ekstraksiyonunda masreasyon, infuzyon, sindirim, dekoksasyon ve perkolasyon gibi basit yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada incelenecek bitkinin suda çözünür özütleri modifiye edilen perkolasyon yöntemiyle elde edilmiştir.

Perkolasyon yöntemi: Perkolatör denen konik tabanlı bir kap içine konan öğütülmüş katı madde üzerine su eklenir. Kabin üstü kapatılır ve katı maddenin su ile karışması sağlanır. Yirmi dört saat ekstraksiyondan sonra konik uçtan yavaşça suyun alt kaba geçmesi sağlanır. Daha sonra süzüntü filtrasyondan geçirilir. Gerekli görülmesi durumunda bu süzüntünün suyu buharlaştırılarak kuruması sağlanır.



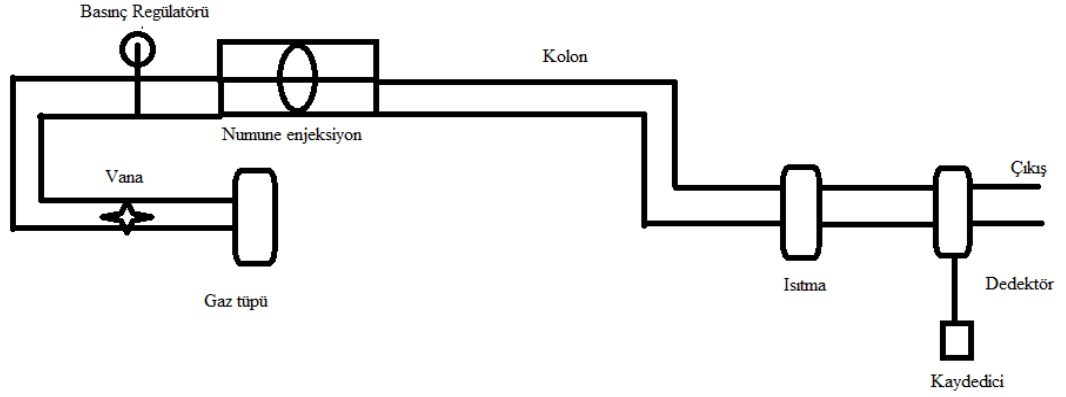
## 2.18. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde, karışımdaki maddelerin ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Hareketli bir çözücü etkisiyle, bileşenlerin farklı hareketleri sonucu birbirinden ayrılması esasına dayanır. Hareket eden faza hareketli faz, gözenekli ortama ise sabit faz denir. Kromatografi, maddelerin sıvılardaki çözünürlüklerinden ya da katı maddelerin yüzeylerine tutunma farklılıklarından yararlanarak ayrılmasını sağlar. Kromatografi, laboratuarlarda pek çok organik ve anorganik maddenin tayininde (karbonhidrat, lipit, yağ asitleri, aminoasitler, proteinler ve türevleri, vitaminler) kullanılır. Bütün kromatografik metotlar numune içerisindeki maddelerin sabit ve hareketli fazla etkileşimi sonucu ayrışmaları esasına dayanır. Sabit faz, bir katı veya bir katı destek üzerine emdirilmiş bir sıvı tabakasından oluşur. Hareketli faz ise daima bir sıvı veya gazdan oluşur.<sup>97</sup>

Gaz kromatografisi, kimyada, özellikle de petrol ve eczacılık alanlarında kullanılır. Plastik, besin, mayalama, çevre, biyotıp, tıp ve adli tıp alanlarındaki kullanılmaktadır. Gaz kromatografisi hem bir ayırma, hem de bir ölçü tekniği olduğu için öteki yöntemlerden üstündür.<sup>97</sup>

### 2.18.1. Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisi yöntemi, bir karışımda gaz halinde bulunan yada hızlı buharlaştırılabilen bileşenlerin birbirinden ayrılması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, bileşenlerin farklı katı yüzeylerdeki farklı adsorpsiyon ilgilerine göre ayrılması esasına dayanır. Numunede bulunan bileşenlerin cihaz yardımı ile spektrumları oluşturulur ve spektrumdaki her pik ayrı bileşeni ifade eder.<sup>97</sup> Gaz kromatografisinin basit uygulama şeması Şekil.10'da gösterilmiştir.



Şekil 10: Gaz Kromatografisi uygulama şeması.<sup>97</sup>

Öncelikle katı örneklerin gaz halindeki ürünlere dönüştürülmesi için bir piroliz bölmesi vardır. Kolon, sıcaklığı ayarlanabilen veya programlanabilen bir fırına yerleştirilir. Sıvı örnekler, bir enjektör yardımıyla cihazın giriş kısmına verilir. Kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektörle izlenen sinyal, gerektiğinde uygun bir dedektörle entegre edilir. Yöntemde en yaygın olarak kullanılan dedektör türü, ısısız gaz iletkenliği ilkesinden yararlanılarak geliştirilen ısısız iletkenlik dedektörüdür. Daha duyarlı dedektörlerde ortaya çıkmıştır. Bu tür dedektörlerden birisi olan elektron yakalama dedektöründe kolondan çıkan gazlar beta ışınlarına maruz bırakılır. Beta tanecikleri ile yani yüksek enerjili elektronlarla çarpışan moleküller iyonlaşırlar ve bir elektron akımı oluştururlar. Alev iyonlaşma dedektörü adıyla bilinen bir başka tür dedektörde ise kolondan çıkan gazlar, hidrojen- oksijen gazları ile karıştırılır ve yakılır. Oluşan pozitif yüklü iyonlar daha negatif bir elektroda doğru çekilerek elektrik akımı oluştururlar. Bu dedektörle hemen hemen aynı ilkeye dayanarak çalışan ve özellikle kükürt ve fosfor atomları içeren moleküllere karşı duyarlı olan alev fotometresi dedektöründe, kükürtün 394 nm'de, fosforun ise 526 nm'de yaydığı ışımaya ölçülür. En çok kullanılan türevlendirme teknikleri, hidrür oluşturma ve alkilasyondur. Hidrür oluşturma tekniği, yalnızca As, Sb, Bi, Sn, Pb, Se, Te ve Ge gibi hidrür

oluşturan elementlere uygulanır. Alkilleme genellikle, di ve trialkilkurşun, mono-, di- ve trialkilalay gibi iyonik organometalik türlere uygulanır. Bütün bu türevlendime teknikleri, orjinal metal-karbon bağlarının bütünlüğünü değiştirmeksizin, yalnızca bileşiklerin uçuculuğunu değiştirir. Son zamanlarda GC için uçucu metalik hidrürlerin elde edilmesinde, yeni kolon üzeri türevlendirme tekniği geliştirilmiştir. Bu yöntem, NaBH<sub>4</sub> değiştiren fraksiyon içeren GC dolgulu kolonlarında veya gaz kromatografinin enjeksiyon bölmesinin içine yerleştirilmiş, NaBH<sub>4</sub> içeren mini bir reaktör içinde, organik ve inorganik metallerin hidrür türevlerinin oluşumunu kapsamaktadır.<sup>97,98,99</sup>

### GC-MS'nin Bölümleri

Gazlar: 3 adet gaz kullanılır. Helyum taşıyıcı gazdır. Hidrojen ve kuru hava belirli oranlarda birleşerek alev iyonlaştırmalı dedektörde (FID) oluşacak pilot alevin yanması için gerekli ortamı sağlarlar.

Enjeksiyon Bloğu: SPLİT (bölmeli) tip enjeksiyon bloğunda gaz fazına gelen örnek kolona geçer. Burada molekül ağırlığı yani karbon zinciri uzunluğu önemlidir ve düşük molekülü bileşikler ağır molekülülere göre kolonu daha çabuk terk eder.

Dedektör: Kolonu terk eden bileşikler dedektöre gelir ve dedektörde yanan pilot alevde iyonlarına ayrışarak bir çeşit elektrik sinyali oluştururlar. Bu sinyalde bir kaydedici tarafından kaydedilip zamana karşı sinyal büyüklüğü olacak şekilde pikler oluşturur. Yani kabuk ve meyva için ayrı ayrı kromatogramlar ortaya çıkmıştır. Miktarı fazla olan yağ asitleri daha büyük pikler oluştururlar ve piklerin geliş zamanları standartlarla karşılaştırılarak yağ asitleri çeşidi tayin edilir. Dedektörde pilot alevin yanması için H ve kuru hava belirli bir oranda (genelde 1:10) birleşirler.<sup>97,99</sup>

Gaz kromatografisinde hareketli faz gazdır. Adını da bundan almıştır. Sabit fazın yapısına göre gaz kromatografisi ikiye ayrılır.

1) Sabit fazı katı olan gaz-katı kromatografisi

2) Sabit fazı sıvı olan gaz –sıvı kromatografisi

Hareketli faz olarak helyum, azot veya argon gibi inert bir gaz kullanılır ve bu gaza taşıyıcı gaz adı verilir. Kolon içinde kullanılan sabit faz; silika, alumina veya karbon gibi bir katı ise yöntem, gaz-katı kromatografisi adını alır. Eğer sabit faz kieselguhr gibi inert katı bir dolgu maddesi üzerine tutturulmuş uçucu olmayan bir sıvı film ise yöntem gaz-sıvı kromatografisi adını alır. Gaz kromatografisinde, ilk olarak örneğin buharlaştırılması için ısıtılan bir bölme vardır. Hemen ardından sıcaklığı programlanabilen bir fırın içine yerleştirilmiş olan kolon gelmektedir. Sıvı örnekler bir şırıngayla bir septumdan giriş kısmına enjekte edilirler. Kolon çıkışına yerleştirilen bir dedektörden sinyal izlenir ve bir integratör ile kaydedilir. Gaz kromatografisi yönteminde incelenebilen maddeler için belli sıcaklıktaki alıkonma sürelerinin birbirinden farklı olmasından yararlanarak nitel analiz yapılabilir. Ancak, birçok bileşen için tek bir kolonla birbirine yakın alıkonulma süreleri elde edilebileceğinden, sonuçların güvenilir olması için birkaç değişik kolon kullanmakta yarar vardır. Bir maddenin alıkonulma süresi, belli bir kolon için, belli sıcaklıkta ve belli taşıyıcı gaz akış hızında sabit bir değerdir. Bu sebeple de, bir iç standart maddesinin analiz örneğine eklenmesi ve sonuçların bu maddeye bağlı olarak belirtilmesi daha çok tercih edilen bir yoldur. Gaz kromatografisi yönteminde nicel analiz ise kromatogramdaki piklerin altlarında kalan alanların hesaplanması ile veya pik yüksekliğinin ölçülmesi ile yapılır. Bir bileşen kolondan ne kadar erken çıkarsa, o bileşene ait pik de o kadar keskin elde edilirken, kolondan geç çıkan bileşenlere ait pikler ise geniş ve yayvan olarak elde edilmektedir. Bu ise istenmeyen bir durumdur. Bu

durumu önlemek için sıcaklık programlaması yöntemi uygulanır. Başlangıçta kolon sıcaklığı düşük tutulur ve zamanla doğrusal bir biçimde artırılır.<sup>97,98,99,100</sup>

### **2.18.2. Sıvı Kromatografisi**

Sıvı kromatografisi 4 farklı yöntemle uygulanmaktadır. Bu yöntemler şunlardır<sup>97</sup>;

- 1- Adsorpsiyon kromatografisi (sıvı-katı)
- 2- Partisyon kromatografisi
- 3- İyon Değişimi kromatografisi (sıvı-sıvı)
- 4- Jel filtrasyon kromatografisi

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Gereçler**

##### Laboratuar Gereçleri

Löwenstein Jensen Besiyeri (Biomerieux)

Middle Brook Agar ( Seven H11 Agar Base - Becton Dickinson)

Otoklav (Hirayama HV85), Pastör fırını (Memmert), Etüv (Nüve N-500)

Gaz kromatografi sistemi (Agilent 6890N Network - 5975C VL MSD Network Mass Selective Detector)

Soxhlet ekstraktörü

BACTEC MGIT 960 sistemi (Becton Dickinson)

Otomatik pipet ve pipet uçları

Milipor (45µ)

Doku kültür test plakları ( Orange Scientific-12)

Yuvarlak ve iğne uçlu öze

Steril tek kullanımlık öze

Cam tüpler

Suporlar

Termometreli su banyosu

Biyogüvenlik kabini (Telstar-Class II)

Maske (3M)

Tek kullanımlık laboratuar önlüğü

##### Kimyasal Maddeler

Oleik asit

Albumin

Dekstroz

Katalaz

NaCl

Gliserol

Distile su

İzoamil alkol

Eter

### Test Maddeleri

*Pistacia eurycarpa* (meyva – kabuk)

Linoleik asit (Sigma L1376)

Eikosenoik asit (Sigma E6885)

Araşidik asit (Sigma A3631)

Linolenik asit (Sigma L2376)

Stearik asit (Sigma S4751)

Miristik asit (Sigma)

Palmitelik asit (Sigma P9417)

Omega 3 ( eikosapantenoik asit - dokozahekzaenoik asit) (Multinorm)

Vitamin A (Koçak Farma)

Vitamin D (Deva )

Vitamin E (Aksu Farma)

Vitamin K (Deva)

### Bakteriler

H37Rv *M.tuberculosis* standart suş (Ankara Hıfzısıhha Merk.)

H37Ra *M.tuberculosis* standart suş (Ankara Hıfzısıhha Merk.)

*M.tuberculosis* (38 klinik izolat)

### **3.2. Deneyde Kullanılan Bakteriler**

Bu çalışmada, 2009-2010 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında klinik örneklerden üretilmiş ve *M.tuberculosis* kompleks olarak tanımlanmış 20 suş ve Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Tüberküloz Laboratuvarında yine klinik örneklerden izole edilerek *M.tuberculosis* kompleks olduğu kesinleştirilmiş 18 bakteri suşu ve 2 adet standart bakteri suşu olmak üzere toplam 40 adet tüberküloz basili incelendi. Laboratuvara tüberküloz kültürü yapılmak üzere gönderilen klinik örneklerden balgam ve idrar gibi flora bakterileri ile kontamine olanları homojenizasyon, dekontaminasyon ve konsantrasyon işlemlerinden sonra pastör pipetiyle Löwenstein Jensen besiyerine 3'er

damla ve MGIT tüplerine enjektörle 0.5 ml olarak ekildiler. Steril sıvı örnekler ise 3000 rpm'de 20 dakika çöktürüldükten sonra Löwenstein Jensen besiyeri ve MGIT tüplerine aynı şekilde ekildiler. MGIT sisteminde pozitif uyarı alınan örneklerden hazırlanan preparatlar ARB ile boyanarak aside dirençli basil açısından incelendiler. Yine 3 günde bir değerlendirilen Löwenstein Jensen besiyerindeki kültürlerde şüpheli koloni görülünce aside dirençli bakteri üremesi açısından incelendiler. Pozitif bulunan örnekler Paranitro benzoik asit (PNB) testi ile MGIT sistemi ile tekrar kültüre alındılar. PNB varlığında üremeyip kontrol ekiminde üreyen bakteriler *M.tuberculosis* kompleks olarak değerlendirildiler.<sup>7,48</sup> Çalışmada yine Ankara Hıfzısıhha Merkezi'nden temin edilen H37Rv, H37Ra *M.tuberculosis* suşlarında standart kontrol suşları olarak kullanıldı.

Kontrol suşları ve test bakterileri 2 ayda bir yeni besiyerlerine pasajlanarak canlılıkları sürdürüldü. Her suşun Löwenstein Jensen besiyerindeki üreme zamanı belirlenerek kaydedildi. En geç üreyen suşun 28 günde ürediği belirlendiğinden, test edilecek maddenin etkinliğini ölçme tarihinden bir ay önce bütün bakterilerin subkültürü yapıldı. Yapılan subkültürlerde herhangi bir suşun ürememe sorunu yaşanmadı.

### **3.3. Etkisi İncelenen Bitki Meyvaları**

İncelenen bitki *Pistacia eurycarpa*, Güney Doğu Anadolu bölgesinde Siirt, Mardin ve Batman illeri civarında 800-1000 metre rakımda yetişen ve sadece ülkemizde bulunan endemik bir bitkidir. Bu bitki *Anacardiaceae* familyasında bulunan *Pistacia* cinsinin bir türüdür. Bitki bölgede "bıtım" veya "bıttım" adlarıyla bilinmektedir. Ekim ayında meyvaları toplanmaktadır. En dışında yenen bir yumuşak yeşil kabuğu, altında sert kahverengi bir kabuk ve içinde yenen bir iç meyva bulunmaktadır.



İç kısmının dışı sarı- kahverengi bir selülozik zarla çevrili Antep Fıstığı renginde ve tadında yeşilimsi bir yapıdan oluşmaktadır. Bu bitkinin meyveleri Resim 1’de görülmektedir. Deneyde kullanılan bitki meyvaları 2010 yılının Ekim ayında Siirt ili çevresinde yetişen ağaçlardan toplandı.



Resim 1: *P.eurycarpa*'nın meyvaları

### 3.4. Deneylerde kullanılan besiyerleri ve hazırlanışları

Löwenstein Jensen Besiyeri (Biomerieux) ticari olarak hazır temin edildi.

#### Middle Brook Agar ( BBL Seven H11 Agar Base) Hazırlanışı

900 ml distile su,

19 gr besiyeri ve

5 ml gliserol 1 litrelik balonjoje’de karıştırıldı ve su banyosunda iyice karışincaya kadar ısıtıldı. Daha sonra 121<sup>0</sup>C’de 20 dakika otoklavda sterilize edildi. Besiyeri 55 <sup>0</sup>C ye kadar soğuduktan sonra 100 ml OADC eklendi.

### Middle Brook OADC'nin Hazırlanışı

50 mg Oleik asit

5 gr Albumin

2 gr Dekstroz

4 mg Katalaz

850 mg NaCl

100 ml distile su içinde eritilerek hazırlandı ve 45 µm'lik milipor filtreden geçirilerek steril edildi.

OADC solüsyonu taze hazırlandı. Hemen kullanılmayacaksa +4 °C'de en fazla 1 hafta saklanabilir.

### **3.5. Elde edilen yağ asitleri**

Bu çalışmada *P.eurycarpa* meyva ve meyva kabuğu soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen yağlarda GC-MS yöntemiyle belirlenen yağ asitleri miristik asit (Sigma), palmitoleik asit (Sigma P9417), stearik asit (Sigma S4751), linoleik asit (Sigma L1376), linolenik asit (Sigma L2376), araşidik asit (Sigma A3631), metil cis-11 eikosenoik asit (Sigma E6885)) ayrıca Omega-3 (Multinorm, 60 mg DHA, 90 mg EPA) gibi yağ asitleri ticari olarak temin edilerek kullanıldı.

### **3.6. Deneyde kullanılan vitaminler**

Yağda eriyen vitaminler olan A (Koçak Farma), D (Deva ), E (Aksu Farma), ve K (Deva) vitaminleri ticari olarak temin edilerek etkileri incelenmek üzere kullanıldı.

### 3.7. Ham Kabuk ve Meyva özütünün hazırlanması

*Pistacia eurycarpa*'nın dış yumuşak yeşil kabuğu küçük bıçak ve bistüri yardımı ile soyulmuş ve steril bir kaptaki toplandı. Daha sonra sert kahverengi kabuk temiz ve sert bir zemin üzerinde çekiç yardımıyla genellikle bir darbede kırıldı ve içleri çıkarılarak yine steril bir kaptaki toplandı. Elde edilen bu yumuşak kabuk parçaları ve iç meyvalar ikiye bölündü. Bir kısmı tartılarak içerdikleri yağ asitleri bakımından incelenmek üzere ayrıldı. İkinci kısım ise suda çözünür özütlerinin ekstraksiyonu için kullanıldı.

### 3.8. Soxhlet Ekstraksiyonu (Katı sıvı ekstraksiyonu) ile sabit yağ miktarı tayini<sup>96</sup>

Devamlı Ekstraksiyon Yöntemi olarak bilinen bu ekstraksiyon *Pistacia eurycarpa* yeşil dış kabuğu ve iç meyva içerisindeki sabit yağları elde etmek ve miktarlarını tayin etmek amacıyla kullanıldı. Soxhlet ekstraksiyonu Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde Farmakognози Laboratuvarında Prof. Dr. İlkay Orhan'nın gözetiminde ve danışmanlığında gerçekleştirildi. Ekstraksiyon, solvent olarak hekzan kullanılarak 8 saat süre ile yapıldı.

Ekstraksiyon işlemi şu şekilde gerçekleştirildi; Sabit yağların ekstrakte edileceği örneğin nem oranının %10'un altında olması için önce örnek etüvde kurutuldu. Temizlenmiş öğütücüye bir miktar kuru örnek konularak öğütüldü. İncelenecek örnekte fazla su bulunması nedeniyle susuz sodyum sülfat ile ezildi. Böylece yağın ekstraksiyonu kolaylaşmıştır. Yağ ekstraksiyonu, öğütmeden sonra en geç 30 dakika içinde yapıldı. Özellikle ekstrakte edilecek yağın serbest yağ asitleri içerikleri tayin edileceğinden, bu durum daha da önem kazanmıştır. Daha önce etüvde kurutulmuş ve desikatörde soğutulmuş olan ve içinde iki tane cam boncuk

bulunan balon 1mg duyarlılıkta tartılarak darası alındı. Örnek, öğütüldükten sonra yaklaşık 1 mg duyarlılıkta tartıldı. Tartılan numune, çözücü ile ıslatılmış pamuk yardımı ile kartuşa yerleştirildi. Kullanılan pamuk tampon ile kartuş kapatıldı ve kartuş **Soxhlet** ekstraktörüne yerleştirildi. Balona yeterli miktarda çözücü yani hekzan ilave edildi. Balon, ekstraktör ve soğutucu birbirine bağlandı. Su banyosu üzerine yerleştirildi. Çözücü yavaş kaynayacak şekilde sıcaklık ayarı yapıldı. Geri damıtma hızı dakikada en az üç damla olacak şekilde ayarlandı. Sekiz saatlik süre sonunda ekstraksiyon durduruldu. Balonun içerisindeki çözücünün büyük bir kısmı damıtılarak uçması sağlandı. Bu işlem sırasında elde edilen yağ bir balon içerisinde toplandı. Yağın içinde kalan az miktardaki çözücünün uzaklaştırılması için cam balon yaklaşık 100 °C'ye ayarlı etüvde 1 gece bekletildi. Daha sonra soğutulan balon 1mg duyarlılıkta tartılarak ekstrakte edilmiş yağın miktarı ölçüldü. Balon tekrar aynı sıcaklıktaki etüve konularak 10 dakika beklendikten sonra soğutulup ikinci kez tartıldı. İki tartım arasındaki farkın 10 mg'dan fazla olmadığı görülerek çözücü uzaklaştırılması işlemine son verildi. Balonun son ağırlığı kaydedildikten sonra içindeki yağ miktarı % yağ olarak aşağıdaki formülden hesaplandı.<sup>96</sup>

$$\text{Sabit yağ yüzde miktarı} = (a-b)/P \times 100$$

a: yağ içeren balonun ağırlığı

b: boş balonun ağırlığı

P: numune miktarı

Soxhlet ekstraksiyon işlemi Resim 2, 3 de gösterilmiştir.



Resim 2 : Lipidlerin ekstraksiyon işlemi



Resim 3 : Soxhlet cihazı ve ekstraksiyon solventinin uzaklaştırılması

Hesaplamalar sonunda 39.42 gr meyvanın ekstraksiyon için kullanıldığı ve bundan 9.80 gr yağ elde edildiği, bunda % 24.86'lık bir orana tekabül ettiği anlaşıldı. Kullanılan meyvanın yaklaşık dörtte birinin sabit yağlardan oluştuğu görüldü.

Yumuşak meyva kabuğu 27.50 gr olarak kullanıldı ve bundan 14.99 gr sabit yağ elde edildi. Bu değer % 54.51'e karşılık olduğu ve kabuğun yarısından fazlasının yağlardan oluştuğu anlaşıldı. Meyva kabuğu ve meyvasından elde edilen yağlar buzdolabında deneylerde kullanılacakları güne kadar + 4 °C'de ve karanlıkta saklandı.

### 3.9. Yağların Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) ile Analizi <sup>97,99</sup>

Elde edilen yağlar *trans*-metil esterifikasyon reaksiyonuna tabi tutulduktan sonra, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde yağ asiti kompozisyonları gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ile analiz edildi. Çalışma Doç Dr. Yüksel Kan'ın denetim ve danışmanlığında gerçekleştirildi. GC-MS analizi, aşağıda verilen koşullar altında gerçekleştirildi.

**Cihaz:** Agilent 6890N Network GC system combined with Agilent 5975C VL MSD Network Mass Selective Detector

**Kolon:** DB Waxetr (60.0 m x 0.25 mm x 0.25µm)

**Sıcaklık programı:** Fırın sıcaklığı önce 60°C'ye ayarlanarak, enjeksiyondan 1 dakika sonra sıcaklık 1°C/dk aralıklarla 10 dakika boyunca artacak şekilde 185°C'ye çıkarıldı. Daha sonra sıcaklık 5°C/dk aralıklarla 200°C'ye yükseltildi.

**Enjektör sıcaklığı:** 250°C

**Taşıyıcı gaz:** Helyum

**Inlet basıncı:** 25.36 psi

**Lineer gaz velositesi:** 7 cm/sn

**Akış hızı:** 0.3 ml/dk

**Split oranı:** 30:1

Enjeksiyon hacmi: 1.0 µl

Yağlar 230°C'de ısıtıldıklarında polimerize olurlar. Bu olaya 'kuyruklanma' denir. Polimerize yağlar tayin cihazına zarar vereceğinden yağ asitleri formuna dönüştürülmelidir. Bunun için yağlara 'türevlendirme' yapıldı. Bu uygulama sonunda incelenecek yağlar tamamen uçucu hale getirildi. Böylece türevlendirme bir 'esterleştirme' işlemi olarak yağlara uygulandı.

### 3.9.1. Sabit yağların metilleme işlemi (Yağların *trans*-metil esterifikasyon reaksiyonu)

- 0.2 gr yağ numunesi tartımı alındı.
- Üzerine 5 ml 0.5 N metanollü NaOH ilave edildi<sup>a</sup>.
- 10 dakika kaynatıldı. Üzerine 5 ml BF<sub>3</sub>/MeOH ilave edilip 2 dakika daha kaynatıldı.
- 5 ml hekzan ilave edip 1 dakika daha kaynatıldı.
- Soğutulduktan sonra 25 ml'lik balonjojeye alınıp 25 ml'ye doymuş tuz çözeltisi<sup>b</sup> ile tamamlandı.
- Balonjoje kapağı sıkıca kapatıldıktan sonra 15-20 defa alt-üst yapılarak karışması sağlandı.
- Ayırma hunisine aktarıldı ve üst faz analiz için alındı.

a) 0.5 N metanollü NaOH hazırlamak için 2 g NaOH alındı ve 100 ml Metanolde (MeOH) çözüldü. Bunun 5 ml si kullanıldı.

b) 50 ml doymuş tuz çözeltisi hazırlamak için bir kaba 50 ml suya azar azar tuz (NaCl) ilave edilerek iyice karıştırıldı. Tuz ilavesine, ilave edilen tuz çözünmeden kalıncaya kadar devam edildi. Metilleme işleminde kullanılacağı zaman üstteki doymuş kısımdan gerekli olan miktar alındı.

#### Elde Edilen Metil Esterlerin GC-MS'ye Enjekte Edilmesi

Hazırlanan metil ester şırınga ile bir odacığa belirlenen oranda ( 1µl) enjekte edildi. Bu çalışmada incelenen lipidlerdeki yağ asitleri Alev iyonlaştırıcı dedektör (Flame ionizing dedector=FID) ile tesbit edilmiş ve yağ asitleri spektrumu pikler halinde ekrana yansıtılmış ve pik alanları hesaplanmıştır.<sup>97,99</sup>

### 3.10. *P.eurycarpa* kabuk ve meyvasının suda çözünen ekstraksiyon örneklerinin hazırlanması ve besiyerlerine eklenmesi

*P.eurycarpa* meyva ve meyva kabuğunun suda çözünen özütleri soğuk perkolasyon yöntemi ile elde edildiler.<sup>93,96</sup> Bu yöntemde göre *P.eurycarpa* meyvalarının dış yumuşak kabuğu bistüri yardımıyla soyuldu ve steril bir kaptaki toplandı. Ayrıca meyvanın sert kabuğu kırıldıktan sonra iç meyva kısmı çıkarıldı ve ayrı bir kaptaki her biri 30 gr olacak şekilde toplandı. *P.eurycarpa* meyvası, kabuktan soyulmuş hali, soyulan kabuklar ve meyvanın iç kısmı Resim 4'te gösterilmiştir.



Resim 4: *P.eurycarpa*'nın meyvası (yeşil), kabuğu soyulmuş hali (kahverengi) soyulmuş yeşil kabuğu ve iç meyva kısmı

Hem kabuk hem de meyva kısımları steril havanda ezildi. Daha sonra her birine 30'ar ml steril su ilave edilerek 1 saat daha ezme işlemine devam edildi. Elde edilen özüte eşit miktarda su katılarak homojenize edilmiş ve milipor filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Bu özütlerden 5 er µl alınarak bu özütlerin etkilerinin test edileceği MBA ve LJ



besiyerleri yüzeylerine eklendi. Mikobakteriler bu aşamadan sonra besiyerlerine ekildi.

### **3.11. *Mycobacterium tuberculosis*'ın üreme hızı üzerine etkisi incelenen farklı özütler ve vitaminlerin deneyde kullanılması**

#### *P.eurycarpa* meyve ve kabuğundan soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen total lipidlerin hazırlanması ve besiyerlerine eklenmesi

*Pistacia eurycarpa*'nın meyva dış yumuşak kabuğu ve meyva içinden soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen sabit yağ ekstraktları ayrı ayrı milipor filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Her iki yağ örneğinden tek kullanımlık kalibreli öze ile test edilecekleri MBA ve LJ besiyeri yüzeylerine 5'er µl yayıldı.

#### Besiyerine eklenen yağ asitleri dozları

Demirci ve arkadaşları<sup>80</sup> ile Alma ve arkadaşlarının<sup>85</sup> *P.eurycarpa*'da belirledikleri değişik yağ asitlerinin antibakteriyel etkilerini inceledikleri çalışmalarda 0.1 µg/ml ile 10 µg/ml arasında değişen miktarlarda yağ asidi kullanmışlardır. 1 µg/ml'den itibaren gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde etki saptamaları nedeniyle bu çalışmada bakterilere zarar vermemeleri için 0.5 µg/ml konsantrasyonunda yağ asitleri kullanılmıştır. Çalışmalara geçilmeden önce miristik asit, linoleik asit ve stearik asit'in bu konsantrasyonlarının LJ besiyerinde beş farklı *M.tuberculosis* suşu üzerinde etkileri incelenmiş ve mikobakteri üremesi üzerine olumsuz bir etkileri olmadığı saptanmıştır. Zaten mikobakteri üremesine olumlu etkileri nedeniyle oleik asit ve palmitik asit gibi bazı yağ asitlerinin besiyerlerine eklendiği bilinmektedir. Ayrıca MBA için supplement olarak kullanılan OADC solüsyonunda 1 ml besiyerinde 50 µl oleik asit

kullanılmaktadır. Bu yağ asidi bu konsantrasyonda bakteri üremesi üzerine olumlu etki yapmaktadır.

Linoleik asit, eikosenoik asit, araşidik asit, linolenik asit, stearik asit, ve palmiteloik asit sulandırım çalışmalarında önce izoamil alkol ile çözüldü. Miristik asit ise eter ile çözüldü. Final konsantrasyonları 0.5µg/ml olacak şekilde hazırlanan her yağ asidi test edilecekleri MBA ve LJ besiyerleri üzerine tek kullanımlık öze ile 5'er µl olarak yayıldılar. Yağ asitlerinin, toplam etkilerini incelemek için araşidik asit, eikosenoik asit, linoleik asit, stearik asit'ten 250 şer µl karıştırılarak A grubu karışımı, linolenik asit, miristik asit, palmiteloik asit ve omega 3 ( eikosapantenoik asit ve dokozahekzaenoik asit içeren form)'ten 250 şer µl karıştırılarak B grubu karışımı elde edildi. İleri sulandırımıları distile su ile gerçekleştirilen yağ asitleri özellikle MBA yüzeyinde yağsı granüller oluşturdu. Bu etki A ve B grubu yağ karışımlarının uygulandığı MBA yüzeylerinde daha belirgin görüldü.

#### Vitaminlerin hazırlanması ve besiyerlerine eklenmeleri

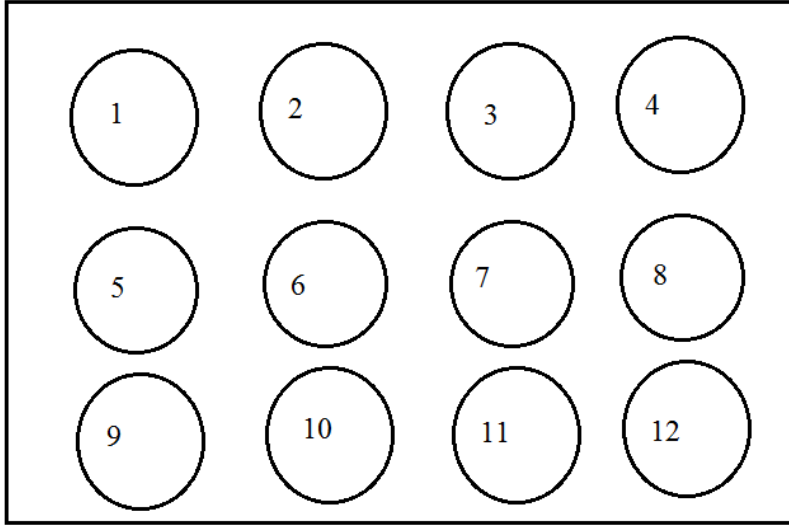
Middle Brook Agar (MBA) ve Löwenstein Jensen (LJ) besiyerine eklenen vitamin dozları Hayashi ve arkadaşlarının<sup>101</sup> değişik vitaminlerin mikroorganizma üremeleri üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında kullandıkları dozlara göre hesaplandı. Otoklavlanan ve 55 °C ye soğutulan MBA besiyerinin 1 litresine 1 µg olacak şekilde A,D,E ve K vitaminleri ayrı ayrı eklendi. Ayrıca 5 µl'sinde 0.01 µg vitamin olacak şekilde vitamin sulandırımıları hazırlandı ve hazır kullanılan 10 ml besiyeri içeren her LJ besiyerinin yüzeyine tek kullanımlık standart öze ile 5'er µl vitamin yayılarak eklendi. Ayrıca vitaminlerin toplam etkisini incelemek üzere konsantrasyonu ayarlanan her vitaminin 100 er µl'si karıştırılmış ve bu karışımdan da ilgili besiyerlerine 5 er µl eklendi.

### Bakterilerin besiyerine ekimi

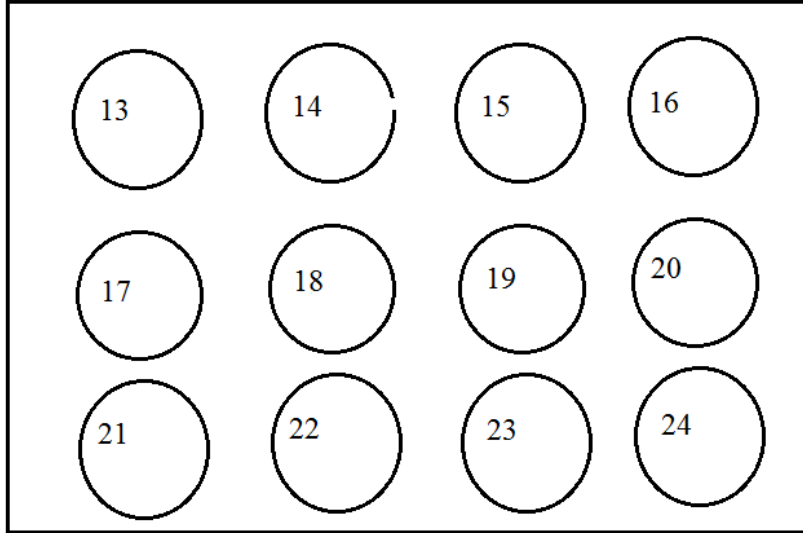
*M.tuberculosis* suşları ile yapılan bütün çalışmalarda laboratuvar bulaşı olmaması ve laboratuvarında oluşturulan kontaminasyonun çalışma sonrası ortadan kaldırılması için gereken bütün önlemler alındı. Çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan Tüberküloz Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma II. sınıf biyogüvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir. Her çalışma bitiminde bütün yüzeyler dezenfektanlarla silindi ve UV lambası sabaha kadar yakılarak hava ve yüzey dezenfeksiyonu sağlandı. Laboratuvar girişlerinde dezenfektanla ıslatılmış paspas bulunduruldu. Ayrıca laboratuvara galoş giyilerek girilmesi sağlandı. *M.tuberculosis* ile ilgili çalışmalarda bone, maske ve koruyucu gözlük takıldı. Tek kullanımlık önlükler ile çalışma gerçekleştirildi ve çalışma sonunda önlükler enfekte atık torbalarına atıldı. Çalışma sonunda imha edilmesi gereken bütün bulaşlı yada bulaş olasılığı olan malzemelerin otoklavlandıktan sonra atılması sağlandı.

Bu çalışmada incelenen 40 *M.tuberculosis* complex suşu çalışmadan 1 ay önce LJ besiyerlerine pasajlandı ve hepsinin çalışma öncesi ürediği kontrol edildi.

MBA besiyeri çalışma kolaylığı sağlamak üzere 12 çukurlu doku kültürü test plaklarına (Orange Scientific,USA) her çukura 5 ml olacak şekilde döküldü. Bir plaktaki çalışma planı şu şekilde oluşturuldu ve her bakteri iki plağa yani 24 ayrı besiyerine ekildi. Bir bakteri suşu için kullanılan 2 MBA plağı ve planı Şekil 11 ve 12'de gösterilmiştir.



Şekil 11: MBA besiyerinde test edilecek maddeler için 1. plak planı. \*



Şekil 12: MBA besiyerinde test edilecek maddeler için 2. plak planı. \*\*

MBA'da, etkisi incelenmek üzere konan maddeler çukur numaralarına göre yerleşim planı şu şekilde yapılmıştır.

\*: 12.çukur test maddesi eklenmeyen üreme kontrol çukurudur.

\*\* : 24.çukur test maddesi eklenmeyen üreme kontrol çukurudur.

### MBA 1.Plak Planı

1-Meyva kabuğunun suda çözünen özütü, 2-Meyva suda çözünen özütü, 3-Kabuk+meyva özütü, 4-Linoleik asit, 5-Stearik asit, 6-Omega -3, 7- Grup A yağ asitleri (araşidik asit, eikosenoik asit, linoleik asit, stearik asit), 8-Grup B yağ asitleri (Omega-3, linolenik asit, miristik asit, palmiteloik asit) 9-Tüm yağ asitleri, 10-ADEK vitaminleri, 11-ADEK + tüm yağ asitleri ve 12- 1. plak kontrol çukuru

### MBA 2.Plak Planı

13- Kabuk Lipid ekstraktı, 14-Meyva Lipid ekstraktı, 15- Kabuk ve meyva ekstraktı, 16-Linolenik asit, 17-Palmiteloik asit, 18- A vitamini, 19- Araşidik asit, 20- Eikosenoik asit, 21- D vitamini, 22- E vitamini, 23- K vitamini ve 24-2.plak kontrol çukuru

Kontrol suşları *M.tuberculosis* H37Rv ve H37Ra ile birlikte 38 hasta izolatu olmak üzere toplam 40 mikobakteri suşu test edildi. Her bakteri suşundan LJ besiyerinden öze ile birkaç kolonisi alınarak bir tüpte distile su ile ezilerek süspansiyonu yapıldı ve daha sonra vortekslenerek süspansiyon haline geçmesi sağlandı. *M.tuberculosis* suşlarının daha iyi çözülmesini sağlamak için kullanılan Tween 80, çalışma sonuçlarını etkileyebilir gerekçesiyle kullanılmadı. Daha sonra her bakteri suşu LJ ve MBA besiyerlerine tek kullanımlık kalibreli 5 µl'lik öze yardımıyla ekildi. Üreme hızına etkisi incelenecek her madde, her bakteri için 2 kez denenecek şekilde ekim yapıldı. Ekim yapılan ve etiketlenmiş MBA ve LJ besiyerleri % 5 CO<sub>2</sub> atmosferinde 37 °C de enkübe edildi.

### 3.12. İstatiksel Analiz

Besiyerleri her gün üreme açısından izlenmiş ve hangi bakteri suşunun hangi günde üredikleri not edildi. Her bakterinin, farklı maddeler varlığında 2 ayrı besiyerindeki üreme zamanı belirlendi ve iki üreme zamanının ortalaması alınarak kaydedildi.

Üreme takibi sonunda 28. günde kontrol besiyerlerinde test edilen bütün bakterilerin üremesi gerçekleştiği görülerek çalışma sonlandırıldı. Çalışma sonuçları bakterilerin test edilen değişkene göre bakterilerin üreme gün ortalamaları kontrol bakteri üreme gün ortalamaları ile karşılaştırıldı. Aradaki farkın istatistiksel açıdan önemlilik testinde Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanılarak ve 0.05 anlamlılık esas alınarak her maddenin etkisi değerlendirildi.

#### 4. BULGULAR

*Pistacia eurycarpa*'dan soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen total lipid miktarı şu şekilde belirlendi;

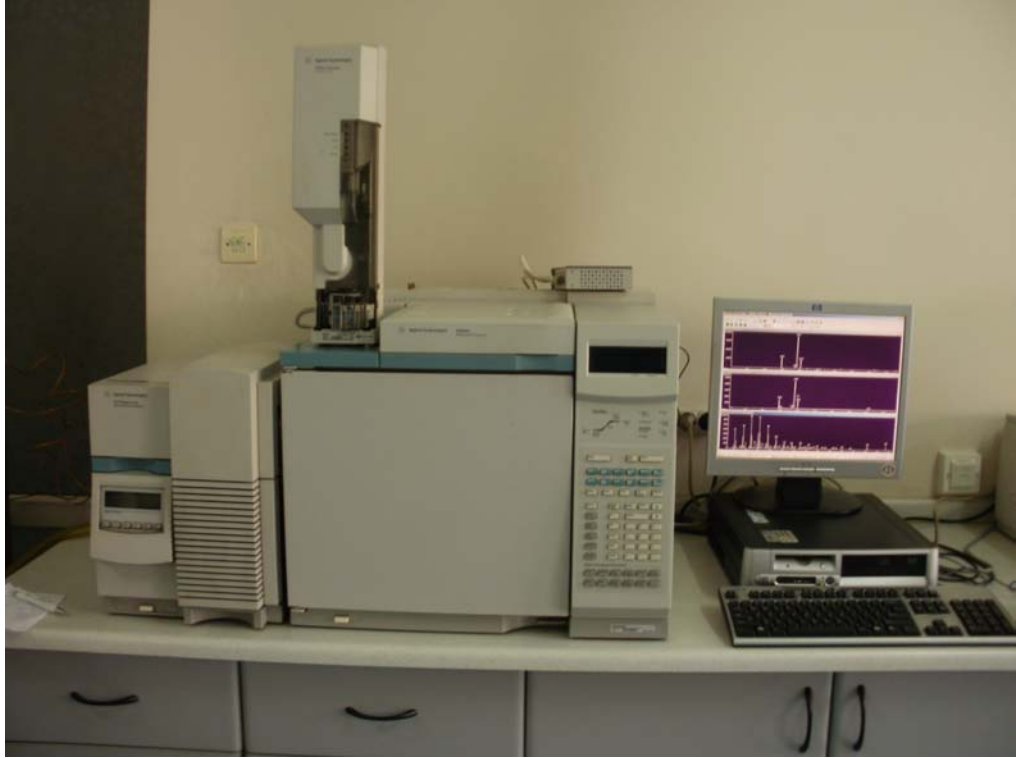
Ekstraksiyon için 39.42 gr meyva kullanıldı ve bundan 9.80 gr yağ elde edildi. Bu miktar kullanılan meyvanın %24.86'sı olarak hesaplandı. Bir başka deyişle kullanılan iç meyvanın yaklaşık dörtte birinin sabit yağlardan oluştuğu görüldü.

Yumuşak meyva kabuğu 27.50 gram olarak kullanıldı ve bundan 14.99 gr sabit yağ elde edildi. Bu değerın meyva kabuğunun % 54.51'ine karşılık olduğu ve kabuğun yarısından fazlasının yağlardan oluştuğu anlaşıldı.

#### 4.1. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi Yöntemiyle<sup>99,100</sup>

##### Meyva ve Kabuğunda Belirlenen Yağ Asitleri

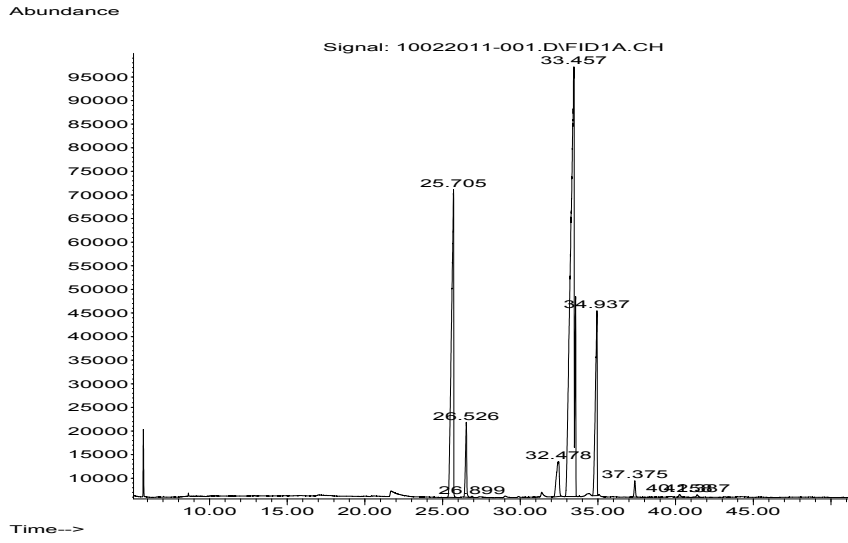
Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi yönteminin uygulandığı cihaz Resim 5’de gösterilmiştir.



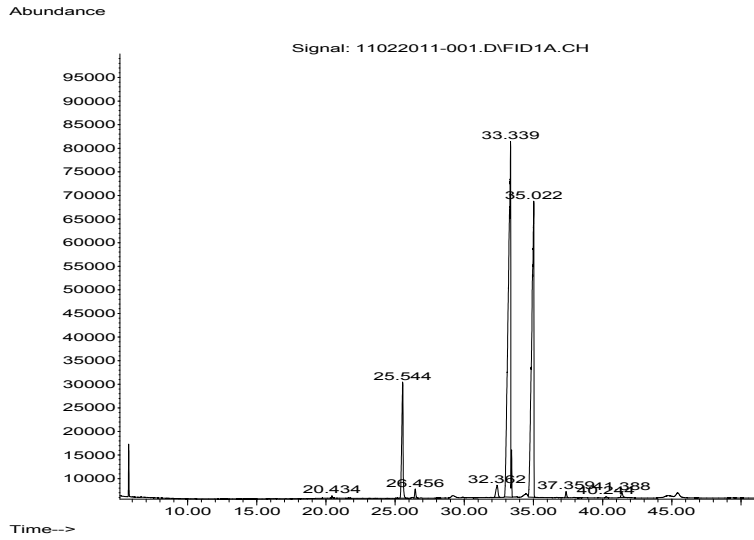
Resim 5: Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometri Sistemi

GC-MS Yöntemi ile meyva ve kabuğunda varlığı belirlenen yağ asitlerine ait kromatogram Grafik 1 ve Grafik 2’de, belirlenen yağ asitleri ve miktarları ise Tablo 3’te gösterilmiştir.





Grafik 1: *Pistacia eurycarpa* meyva kabuğundan ekstrakte edilmiş lipitlerin içerdiği yağ asitlerine ait kromatogram



Grafik 2: *Pistacia eurycarpa* meyvasından ekstrakte edilmiş lipitlerin içerdiği yağ asitlerine ait kromatogram

Tablo 3: *Pistacia eurycarpa* meyva ve meyva kabuğundan ekstrakte edilmiş lipitlerde GC-MS yöntemi ile belirlenen yağ asitleri, % oranları, karbon ve çift bağ sayıları

	Karbon ve çift bağ sayısı	P.eur.meyva kabuğu	P.eur. meyva
<b>Miristik asit</b>	C14:0	*	<b>0,09</b>
<b>Palmitik asit</b>	C16:0	22,85	<b>9,01</b>
<b>Palmiteloik as.</b>	C16:1	3,12	<b>0,59</b>
<b>Stearik asit</b>	C18:0	3,40	<b>1,40</b>
<b>Oleik asit</b>	C18:1	58,55	<b>50,99</b>
<b>Linoleik asit</b>	C18:2	11,03	<b>36,95</b>
<b>Linolenik asit</b>	C18:3	0,68	<b>0,38</b>
<b>Araşidik asit</b>	C20:0	0,17	<b>0,10</b>
<b>Eikosenoik as.</b>	C20:1	0,18	<b>0,45</b>
<b>Toplam</b>		<b>99,98</b>	<b>99,96</b>

\*:Tespit edilemedi

GC-MS yöntemiyle incelenen meyva kabuğu lipitlerinin yağ asitleri içeriği % 99.98 oranında, meyva lipitlerinin yağ asitleri içeriği ise % 99.96 oranında belirlendi. İncelenen meyva kabuğu lipit ekstraktında palmitik asit, palmitoleik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, linolenik asit, araşidik asit ve eikosenoik asit varlığına rastlandı. Tablo 3'de görüldüğü gibi meyva kabuğu lipit içeriğinin % 58.55'inin oleik asit, % 22.85'inin palmitik asit, % 11.03'ünün linoleik asit ve % 3.4'ünün stearik asitten oluştuğu belirlendi. Diğer yağ asitlerinin bulunma oranları % 1'den az olarak belirlenmiştir. Meyva lipit ekstraktında varlığı kanıtlanan miristik asidin meyva kabuğu lipitleri içinde bulunmadığı anlaşıldı. İncelenen meyva lipitlerinin yapısında ise meyva kabuğunda bulunan yağ asitlerinin tamamı ve ek olarak miristik asit varlığı da bulundu. Meyva lipitleri içinde % 50.99 oranında oleik asit bulundu.

Oleik asit, kabuk yağlarında olduğu gibi en yüksek oranda bulunan yağ asidi olmuştur. En yüksek oranda bulunan ikinci yağ asidi ise % 36.95 oranında belirlenen linoleik asittir. Halbuki bu yağ asidinin kabuk yağında bulunma oranı % 11.03 olarak belirlendi. Ayrıca bu yağ asidi miktar olarak kabuk lipitlerinde palmitik asitten sonra üçüncü sırada bulundu. Meyva lipitleri içinde palmitik asit % 9 oranında ve üçüncü sırada bulundu. Stearik asit % 1.40 oranında diğer yağ asitleri ise % 1'den az oranlarda belirlendi.

İncelenen iki standart ve 38 hasta örnek izolatu olmak üzere toplam 40 *M.tuberculosis* complex suşunun Löwenstein Jensen ve Middle Brook Agar'da üremeye etkisi incelenen çeşitli maddelerin varlığında kaçınıcı gün üredikleri Tablo 4,5,6 ve 7'de gösterilmişlerdir.

Tablo 4: 11 farklı değişken katkı maddesi varlığında Löwenstein Jensen besiyerinde *M.tuberculosis* complex suşlarının üreme zamanları (gün)

<i>M.tbc</i>	Besiyeri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 *
B1	LJ	4	5	5	7	7	6	7	7	6	12	6	7
B2	LJ	9	7	9	14	12	9	14	12	11	12	7	9
B3	LJ	6	11	7	15	17	9	15	17	17	12	12	7
B4	LJ	12	14	12	20	20	18	20	20	19	19	19	19
B5	LJ	9	6	8	12	17	15	12	17	12	12	12	12
B6	LJ	7	6	7	12	12	11	12	17	12	12	17	12
B7	LJ	12	12	13	22	22	23	22	22	24	17	17	23
B8	LJ	17	12	15	22	26	27	26	26	27	27	22	27
B9	LJ	12	15	12	17	12	12	17	17	17	14	15	12
B10	LJ	12	12	12	12	17	12	12	17	17	14	12	13
B11	LJ	14	14	15	22	23	27	22	23	28	27	27	28
B12	LJ	15	12	12	18	19	15	18	19	19	19	19	19
B13	LJ	7	12	10	22	21	23	19	21	22	17	19	24
B14	LJ	12	12	12	15	18	12	12	18	19	17	18	16
B15	LJ	6	10	7	16	14	14	16	18	17	12	17	14
B16	LJ	10	11	7	16	17	18	17	17	17	18	17	17
B17	LJ	12	9	9	15	14	13	15	17	18	17	17	14
B18	LJ	7	10	8	12	17	12	12	17	17	12	12	12
B19	LJ	6	12	9	17	22	20	17	22	21	17	17	21
B20	LJ	7	7	7	12	13	13	12	13	12	13	13	13
B21	LJ	6	11	7	15	17	7	15	17	17	12	12	7
B22	LJ	12	14	12	20	20	20	20	20	19	19	19	19
B23	LJ	7	12	10	19	21	23	19	21	22	17	19	24
B24	LJ	10	11	7	16	16	18	16	16	17	17	17	17
B25	LJ	6	10	7	16	18	14	16	18	17	12	17	14
B26	LJ	17	12	15	24	27	24	24	25	27	27	22	27
B27	LJ	12	12	12	17	18	16	12	18	19	17	18	16
B28	LJ	9	6	8	12	17	12	12	17	12	12	12	12
B29	LJ	12	15	12	14	13	12	17	17	17	14	15	12
B30	LJ	7	6	7	12	13	11	12	17	12	12	17	12
B31	LJ	12	12	13	22	22	23	22	22	24	17	17	23
B32	LJ	6	12	9	22	22	22	17	22	21	17	17	21
B33	LJ	12	12	12	13	13	13	12	17	17	14	12	13
B34	LJ	7	7	7	12	13	13	12	13	12	13	13	13
B35	LJ	14	14	15	25	26	27	22	23	28	27	27	28
B36	LJ	7	10	8	12	12	12	12	17	17	12	12	12
B37	LJ	12	9	9	15	14	12	15	17	18	17	17	14
B38	LJ	15	12	12	18	19	19	18	19	19	19	19	19
B39	LJ	4	5	5	7	7	6	7	7	6	12	6	7
B40	LJ	9	7	9	14	12	9	14	12	11	12	7	9
Ortalama	LJ	9.8	10.45	9.8	16.9	17.0	15.5	15.7	17.7	17.6	15.9	15.7	15.9

Tablo 5: 11 farklı değişken katkı maddesi varlığında Löwenstein Jensen besiyerinde *M.tuberculosis* complex suşlarının üreme zamanları (gün)

<i>M.tbc</i>	Besiyeri	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24*
B1	LJ	6	5	5	6	5	5	7	7	6	7	6	7
B2	LJ	9	9	9	9	7	9	9	9	10	9	7	9
B3	LJ	8	9	7	9	7	7	8	7	7	7	8	7
B4	LJ	19	19	19	18	20	18	20	20	19	19	19	19
B5	LJ	12	17	12	15	13	14	12	17	12	12	12	12
B6	LJ	12	17	17	11	11	11	12	12	12	12	17	12
B7	LJ	24	24	23	23	23	22	22	22	24	20	21	23
B8	LJ	17	18	17	27	25	26	27	27	27	27	22	27
B9	LJ	12	12	12	12	12	12	12	12	12	11	12	12
B10	LJ	13	12	13	12	12	12	12	14	13	14	12	13
B11	LJ	15	17	16	27	28	25	22	23	28	27	27	28
B12	LJ	17	17	17	15	12	12	18	19	19	19	19	19
B13	LJ	20	21	20	23	24	22	22	21	22	23	19	24
B14	LJ	12	17	12	12	16	15	15	18	19	17	18	16
B15	LJ	12	17	13	14	14	13	16	14	17	13	15	14
B16	LJ	17	17	17	18	17	17	18	17	16	16	17	17
B17	LJ	12	18	17	13	15	14	15	14	18	17	17	14
B18	LJ	12	12	12	12	13	11	12	17	17	12	12	12
B19	LJ	12	14	14	20	22	19	17	22	21	17	17	21
B20	LJ	8	9	8	13	12	14	12	13	12	13	13	13
B21	LJ	7	7	8	7	8	7	8	7	7	7	8	7
B22	LJ	19	19	19	20	18	21	20	20	19	19	19	19
B23	LJ	20	21	20	23	24	24	19	21	22	17	19	24
B24	LJ	17	17	17	18	16	17	17	17	16	16	17	17
B25	LJ	12	17	13	14	13	15	16	18	17	12	17	14
B26	LJ	17	16	17	24	26	25	27	26	27	27	27	27
B27	LJ	12	17	12	16	16	16	17	18	19	18	17	16
B28	LJ	12	17	12	12	11	15	12	17	12	12	12	12
B29	LJ	16	17	15	12	15	12	14	13	12	14	15	12
B30	LJ	12	17	17	11	11	12	12	13	12	12	13	12
B31	LJ	24	24	23	23	21	21	22	22	20	20	20	23
B32	LJ	12	14	14	22	12	9	22	22	21	21	23	21
B33	LJ	15	14	15	13	12	12	13	13	17	14	12	13
B34	LJ	8	9	8	13	13	14	12	13	12	13	13	13
B35	LJ	15	17	16	27	29	27	25	26	28	27	27	28
B36	LJ	12	12	12	12	12	13	12	12	17	12	12	12
B37	LJ	12	18	17	12	14	13	15	14	16	17	17	14
B38	LJ	17	17	17	19	17	17	18	19	19	19	19	19
B39	LJ	6	5	5	6	7	8	7	7	6	9	6	7
B40	LJ	9	10	9	9	7	9	9	10	9	10	9	9
Ortalama	LJ	13.6	15.0	14.1	15.5	15.2	15.1	16.4	16.6	16.5	15.7	15.7	15.9

Tablo 6: 11 farklı değişken katkı maddesi varlığında Middle Brook Agar besiyerinde *M.tuberculosis* complex suşlarının üreme zamanları

<i>M.tbc</i>	Besiyeri	1	2	3	4	5	6	7	8***	9***	10	11	12*
B1	MB	4	4	4	11	10	7	7	10	11	7	5	6
B2	MB	9	13	9	14	13	13	14	-	-	13	13	13
B3	MB	7	7	7	9	9	9	5	9	9	9	9	9
B4	MB	6	6	6	9	9	9	10	-	-	9	9	9
B5	MB	6	12	6	9	12	11	9	-	-	9	9	12
B6	MB	7	6	7	8	9	8	8	-	-	9	7	9
B7	MB	9	9	10	15	14	14	15	-	-	15	12	15
B8	MB	9	9	9	15	15	14	15	-	-	21	22	15
B9	MB	6	6	6	12	13	12	10	-	-	9	10	12
B10	MB	7	7	7	13	13	13	13	-	-	6	10	13
B11	MB	17	17	18	26	27	27	27	27	-	19	19	28
B12	MB	7	7	9	11	12	11	11	12	11	10	10	10
B13	MB	7	6	7	13	14	13	14	-	-	14	13	13
B14	MB	5	5	6	9	9	9	10	-	-	9	12	9
B15	MB	5	6	6	9	9	8	7	-	-	9	9	9
B16	MB	9	9	7	11	11	11	11	-	-	11	10	11
B17	MB	9	12	6	14	13	13	13	-	-	9	14	13
B18	MB	12	12	12	15	15	14	14	-	-	14	15	15
B19	MB	6	9	8	10	10	9	10	-	-	9	12	9
B20	MB	6	9	7	9	9	9	9	-	-	9	6	9
B21	MB	7	7	7	9	9	10	5	9	9	9	9	9
B22	MB	6	6	6	9	8	9	9	-	-	9	9	9
B23	MB	7	6	7	12	10	13	13	-	-	14	13	13
B24	MB	9	9	7	13	12	12	13	-	-	12	13	13
B25	MB	5	6	6	9	9	9	7	-	-	9	9	9
B26	MB	9	9	9	24	24	23	24	-	-	21	22	25
B27	MB	5	5	6	9	9	9	10	-	-	9	12	9
B28	MB	6	12	6	12	14	12	9	-	-	9	9	13
B29	MB	6	6	6	12	12	12	10	-	-	9	10	12
B30	MB	7	6	7	9	10	8	8	-	-	9	7	9
B31	MB	9	9	10	13	12	13	14	-	-	13	12	13
B32	MB	6	9	8	8	10	9	8	-	-	9	12	9
B33	MB	6	7	7	10	10	10	9	-	-	10	6	10
B34	MB	6	9	7	10	9	9	9	-	-	9	6	9
B35	MB	17	17	18	27	27	27	25	27	-	19	19	27
B36	MB	12	12	13	14	14	15	14	-	-	14	14	14
B37	MB	9	12	6	14	14	13	13	-	-	9	13	13
B38	MB	7	7	9	11	12	11	11	12	11	10	10	10
B39	MB	4	4	4	11	10	7	7	10	11	7	5	6
B40	MB	9	14	9	13	13	14	13	-	-	13	13	13
Ortalama	MB	7.65	8.5	7.8	12.2	12.1	11.9	11.6	14.5	10.3	10.9	11.3	12.3

Tablo 7: 11 farklı değişken katkı maddesi varlığında Middle Brook Agar besiyerinde *M.tuberculosis* complex suşlarının üreme zamanları

<i>M.tbc</i>	Besiyer	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24**
B1	MB	4	4	5	7	7	4	6	7	7	7	5.	6
B2	MB	13	14	14	13	13	12	13	14	13	14	13	13
B3	MB	8	9	8	9	9	7	9	9	9	9	9	9
B4	MB	8	10	7	9	10	8	9	9	9	9	10	9
B5	MB	12	12	13	11	12	13	12	12	12	11	12	12
B6	MB	7	8	9	8	9	7	8	9	9	9	7	9
B7	MB	9	9	9	14	15	15	15	15	15	14	12	15
B8	MB	13	14	13	14	15	15	15	14	15	17	16	15
B9	MB	8	9	8	12	12	13	12	13	12	12	10	12
B10	MB	12	9	9	13	12	11	13	14	14	13	10	13
B11	MB	19	20	20	27	27	28	27	27	27	28	27	28
B12	MB	9	9	9	11	12	11	11	12	11	10	10	10
B13	MB	13	14	13	13	13	12	12	13	12	14	13	13
B14	MB	8	7	8	9	9	10	9	9	9	9	11	9
B15	MB	7	7	7	8	9	8.	9	9	9	9	9	9
B16	MB	10	11	10	11	11	10	11	11	10	11	10	11
B17	MB	10	9	9	13	13	12	13	12	12	11	12	13
B18	MB	14	13	14	15	15	14	15	15	15	15	15	15
B19	MB	9	8	8	9	9	8	10	10	9	9	12	9
B20	MB	9	9	7	9	9	7	9	8	9	9	8	9
B21	MB	8	9	8	10	9	7	9	9	9	9	9	9
B22	MB	9	10	7	9	9	6	9	9	9	9	8	9
B23	MB	13	14	13	13	12	13	12	10	15	14	13	13
B24	MB	12	12	12	14	13	12	13	12	13	12	12	13
B25	MB	7	7	7	9	9	8	9	9	10	9	9	9
B26	MB	20	21	20	22	24	24	24	24	24	21	22	25
B27	MB	10	7	8	9	10	6	9	9	9	9	10	9
B28	MB	12	12	13	12	13	12	12	14	13	12	12	13
B29	MB	9	9	9	12	11	10	12	12	12	10	10	12
B30	MB	7	8	9	8	9	7	9	10	10	9	10	9
B31	MB	9	9	9	12	13	12	13	12	13	13	12	13
B32	MB	9	8	9	9	9	8	8	10	9	9	8	9
B33	MB	7	10	9	10	9	9	10	10	10	9	10	10
B34	MB	9	9	7	9	9	7	10	9	9	9	10	9
B35	MB	19	20	20	27	27	22	27	27	25	19	19	27
B36	MB	13	12	12	13	13	14	13	13	14	14	14	14
B37	MB	6	9	9	13	12	13	13	13	12	12	13	13
B38	MB	9	9	9	11	12	9	11	12	10	10	10	10
B39	MB	4	4	5	7	7	4	6	7	7	7	5	6
B40	MB	12	11	12	13	13	13	12	13	13	14	13	13
Orta.	MB	10.2	10	10	11	12.1	11.0	11.9	12.1	12.1	11.7	11.5	12.3

\*: 12. besiyeri katkı maddesi eklenmemiş üreme kontrol grubudur. \*\*: 24. besiyeri katkı maddesi eklenmemiş üreme kontrol grubudur. \*\*\*: İstatistiğe dahil edilmemiştir.

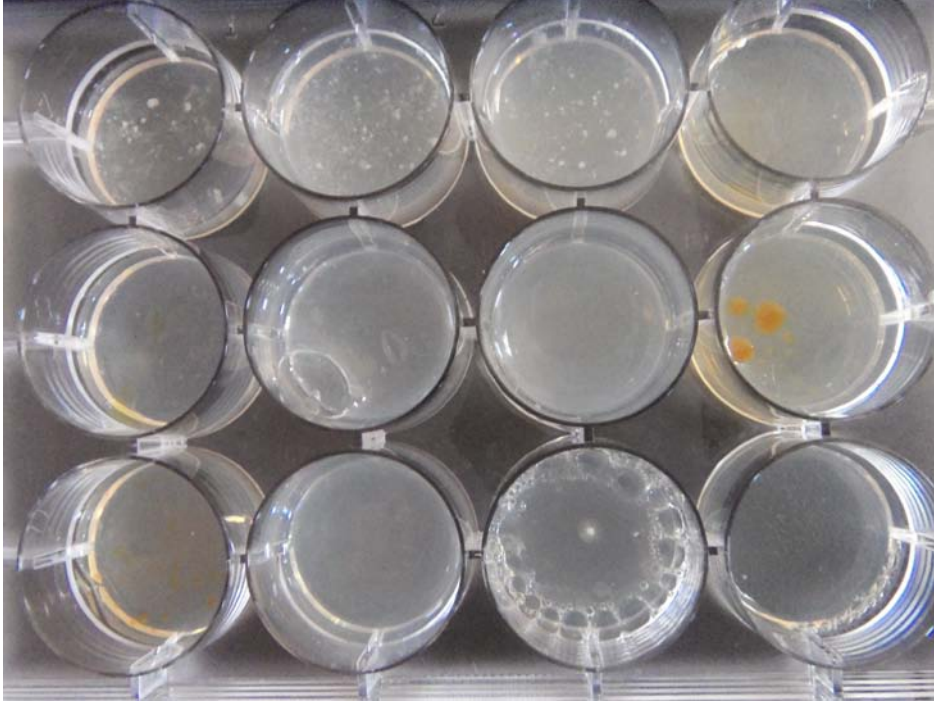
Löwenstein Jensen besiyerine, *Pistacia eurycarpa*'nın meyva ve kabuğundan ekstrakte edilen özüt, soxhlet ekstrakt lipitleri, bu lipitler içinde var olduğu kanıtlanan yağ asitleri, omega 3, yağda eriyen A, D, E ve K vitaminleri tek tek yada birlikte eklenerek *M.tuberculosis* üreme zamanı üzerine etkileri incelendi. Her bakteri için 24 tüpe ekim yapıldı. Bu tüplerden 12. ve 24. tüplere herhangi bir katkı maddesi eklenmedi. Bu tüplerdeki ekimler, bakteri suşunun normal üreme zamanının belirlenmesi ve etkisi incelenen maddelerin varlığında belirlenen üreme zamanlarıyla karşılaştırılması amacıyla kullanıldılar.

Middle Brook Agara yapılan ekimler için her bakteri için iki ayrı hücre kültür plağında 24 çukur kullanıldı. Bu çukurlardan 12. ve 24. çukurlar, katkı maddesi eklenmemiş üreme kontrol çukurları olarak kullanıldı. Diğer 22 çukura üreme zamanına etkileri incelenmek üzere materyal metod kısmında gösterilen plan çerçevesinde farklı maddeler eklendi.

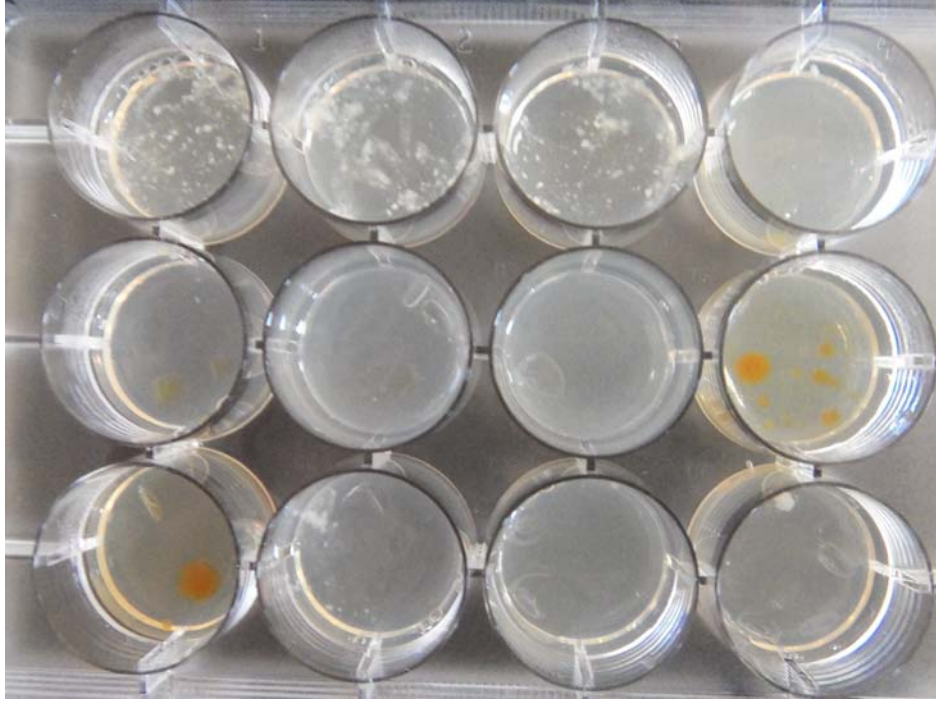
Her maddenin üreme zamanına etkisi incelenirken her değişken karşısında elde edilen tüm bakterilerin üreme gün ortalamaları ile kontrol üreme gün ortalamaları arasındaki fark Wilcoxon Signed Ranks Test (Wilcoxon işaretli sıralar testi) ile analiz edildi. Yapılan değerlendirmelere göre su ile perkolasyon yöntemiyle elde edilen meyva ve kabuk özütleri ayrıca meyva ve kabuk özütlerinin birlikte kullanılması bakteri üremesini anlamlı düzeylerde hızlandırdı. Bu maddeler varlığında saptanan üreme zamanı kontrol besiyerlerindeki üreme zamanına göre istatistiksel anlamda daha hızlı bulundu. ( $p<0.05$ ) Aynı zamanda bu maddelerin eklendiği besiyerlerinde daha iyi bir üreme geliştiği gözlemlendi.



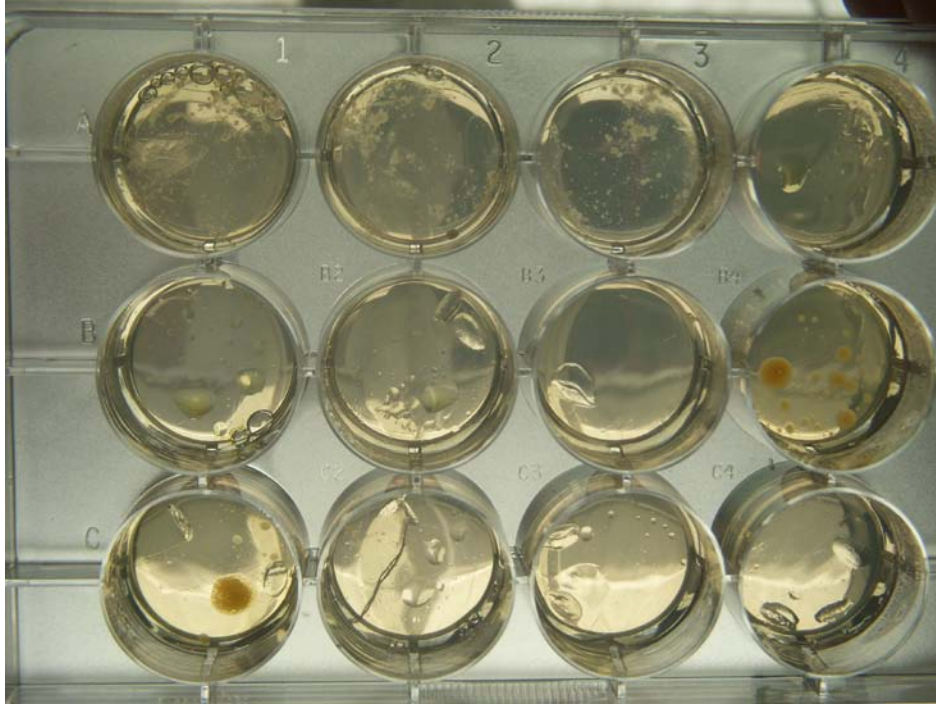
Üremenin 1, 2 ve 3. maddelerin eklendiği ortamlarda daha belirgin ve daha hızlı geliştiği Resim 6, 7, 8, 9 ve 10'de görülmektedir.



Resim 6: Bir *M.tuberculosis* suşunun *P.eurycarpa*'nın suda çözünen özütleri varlığında (en üstte ve başta 1,2 ve 3 nolu çukurlarda) 11.günde daha iyi ürediği, kontrol çukurunda (en altta sağ köşede 12 nolu çukur) daha zayıf ürediği görülmektedir.



Resim 7: Bir *M.tuberculosis* suşunun MBA'da *P.eurycarpa*'nın suda çözünen özütleri varlığında (en üstte ve başta 1,2 ve 3 nolu çukurlarda) 9.günde daha iyi ürediği, kontrol çukurunda (en altta sağ köşede 12 nolu çukur) daha zayıf ürediği görülmektedir.



Resim 8: Bir *M.tuberculosis* suşunun MBA'da *P.eurycarpa*'nın suda çözünen özütleri varlığında (en üstte ve başta 1, 2 ve 3 nolu çukurlarda) 7.günde ürediği, kontrol çukurunda (en altta sağ köşede 12 nolu çukur) ise henüz üremediği görülmektedir.



Resim 9: Bir *M.tuberculosis* suşunun LJ'de *P.eurycarpa*'nın suda çözünen meyva özütü varlığında 11.günde iyi ürediği, kontrol tüpünde ise henüz üremenin olmadığı görülmektedir.



Resim 10: Bir *M.tuberculosis* suşunun LJ'de *P.eurycarpa* meyvasının suda çözünmüş özütünde 14.günde çok iyi ürediği, kontrol tüpünde ise henüz zayıf bir üreme geliştiği görülmektedir.

Üreme zamanı üzerine etkisi incelenen maddelerden 1, 2 ve 3 nolu maddeler hem LJ hem de MBA besiyerinde *M.tuberculosis* suşlarının üremesini kontrollere göre hızlandırdığı görüldü. Diğer test edilen maddelerde üreme zamanı üzerinde belirgin bir fark görülmedi. Her eklenen maddenin varlığında 40 farklı bakteride belirlenen üreme günleri belirlenmiş ve ortalamaları alınmıştır. Kontrol tüplerindeki suşların üreme gün ortalamalarıyla karşılaştırılmaları yapılmış ve üreme zamanı arasındaki farkın istatistiksel değerde olup olmadığı incelenmiştir. Tablo 8'de LJ besiyerine 1'den 11.maddeye kadar eklenen maddelerin gün olarak üreme zamanlarının ortanca, minimum, maksimum değerleri ve kontrol grubuna göre önemlilik test sonuçları, Tablo 9'da ise 13'den 23'e kadar maddelerin aynı değerleri görülmektedir.



Tablo 8: LJ besiyerine 1'den 11.maddeye kadar eklenen maddelerin 40 bakteri suşu için gün olarak üreme zamanlarının ortanca, minimum, maksimum değerleri ve kontrol grubuna göre önemlilik test sonuçları

LJ besiyeri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12*
Ortanca	9,50	11,50	9,00	15,50	17,00	13,50	15,50	17,00	17,00	15,50	17,00	14,00
Minimum	4	5	5	7	7	6	7	7	6	12	6	7
Maksimum	17	15	15	25	27	27	26	26	28	27	27	28
Önemlilik(P*)	,0001	,0001	,0001	,960	,039	,059	,579	,002	,001	,818	,731	

Tablo 9: LJ besiyerine 13'den 23. maddeye kadar eklenen maddelerin 40 bakteri için gün olarak üreme zamanlarının ortanca, minimum, maksimum değerleri ve kontrol grubuna göre önemlilik test sonuçları

LJ besiyeri	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24*
Ortanca	12,00	17,00	14,50	13,50	13,50	14,00	15,00	17,00	17,00	15,00	17,00	14,00
Minimum	6	5	5	6	5	5	7	7	6	7	6	7
Maksimum	24	24	23	27	29	27	27	27	28	27	27	28
Önemlilik(P*)	,0001	,517	,016	,059	,020	,028	,520	,229	,097	,571	,785	

\*: Üreme kontrol tüpleri

Tablo 10'da MBA besiyerine 1'den 11.maddeye kadar eklenen maddelerin gün olarak üreme zamanlarının ortanca, minimum, maksimum değerleri ve kontrol grubuna göre önemlilik test sonuçları, Tablo 9'da ise 13'den 23'e kadar maddelerin aynı değerleri görülmektedir.

Tablo 10: MBA besiyerine 1'den 11.maddeye kadar eklenen maddelerin 40 bakteri için gün olarak üreme zamanlarının ortanca, minimum, maksimum değerleri ve kontrol grubuna göre önemlilik test sonuçları

MBA besiyeri	1	2	3	4	5	6	7	10	11	12*
Ortanca	7,00	8,00	7,00	11,00	12,00	11,00	10,00	9,00	10,00	11,50
Minumum	4	4	4	8	8	7	5	6	5	6
Maksimum	17	17	18	27	27	27	27	21	22	28
Önemlilik(P*)	,0001	,0001	,0001	,644	,210	,275	,035	,021	,053	

Tablo 11: MBA besiyerine 13'den 23.maddeye kadar eklenen maddelerin gün olarak üreme zamanlarının ortanca, minimum, maksimum değerleri ve kontrol grubuna göre önemlilik test sonuçları

MBA besiyeri	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24*
Ortanca	9,00	9,00	9,00	11,00	12,00	10,50	11,50	12,00	11,50	10,50	10,00	11,50
Minumum	4	4	5	7	7	4	6	7	7	7	5	6
Maksimum	20	21	20	27	27	28	27	27	27	28	27	28
Önemlilik(P*)	,0001	,0001	,0001	,180	,973	,0001	,166	,600	1,000	,246	,028	

Tüm bakteriler, herhangi bir madde eklenmeksizin üreme zamanının belirlenmesi ve diğer maddelerin üreme hızı üzerine etkisi ile oluşan üreme zamanları ile karşılaştırılmak üzere kontrol amacıyla LJ ve MBA besiyerlerine ekildi. Madde eklenmemiş bu iki besiyerindeki üreme zamanları gün olarak incelendiğinde MBA besiyerindeki üremenin LJ besiyerindeki üremeye göre daha hızlı gözlemlendiği ve üreme zamanı

arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. LJ ve MBA besiyerlerinde 40 farklı suşun üreme zamanları ortanca değerleri, standart sapmaları, minimum ve maksimum üreme zamanları ile üreme zamanı arasındaki farkın önemlilik test sonucu Tablo 12'de gösterilmiştir. İstatistik analizlerinde Wilcoxon Signed Ranks Test (Wilcoxon işaretli sıralar testi) uygulandı.

Tablo 12: LJ ve MBA besiyerlerinde 40 farklı suşun üreme zamanları istatistiksel değerler ve üreme zamanı arasındaki farkın önemlilik test sonucu

Kontroller	Ortanca	Standart sapma	Minimum	Maksimum	Önemlilik(P*)
MBA kontrol	11.50	4.808	6	28	.002
LJ kontrol	14.00	6.089	7	28	

LJ besiyerinde besiyerinin duruş pozisyonu gereği yüzeye eklenen maddeler besiyeri dibindeki kondensasyon sıvısına geçmişlerdir. Bu yüzden bazı lipoidal maddelerin bakteri üremesi üzerine fazla olumlu yada olumsuz bir etkisi olmamıştır. MBA besiyerinin dar çukurlarda test edilmesi nedeniyle bu besiyerinde Grup B yağ asitleri karışımının test edildiği 8. çukur ve bütün yağ asitlerinin birlikte test edildikleri 9. çukurda suşların çoğunun üreyemediği gözlenmiştir. Buna miristik asit'in çözülmesinde ve sulandırılmalarının hazırlanmasında yaşanan zorluklar neden olmuş olabilir. Çünkü özellikle bu çukurlarda besiyeri yüzeyinde lipitsi damlacıkların olduğu izlenmiştir. Bu nedenle bu çukurlardaki kültür üreme zamanları istatistiksel değerlendirme dışında tutuldu. Bu üremeyi engelleyici etki, yağ asitlerinin başarısız çözünmesi ile ilişkili olarak yüzey ile atmosfer arasında oluşan filmin bakterinin oksijen ihtiyacını karşılamasını engellemesi ya da yağ asitlerinin bu geniş yüzeyde bir şekilde oksitlenerek bakteriye toksik etki yapmış olmasına bağlı olabilir.



## 5. TARTIŞMA

Tüberküloz tarih boyunca insanlık için önemli bir halk sağlığı problemi olmuştur. Antitüberküloz ilaçların bulunmasından önce ülkemizde tüberküloza yakalananların % 58'inin öldüğü belirlenmiştir.<sup>102</sup> BCG aşısı ve antitüberküloz ilaçların bulunmasından önce tüm dünyada çok sayıda insanın ölümüne neden olan tüberküloz hastalığının önlenmesi için bütün dünyada yoğun bir savaş verilmiştir. Ülkemizde de Verem Savaş Daire Başkanlığının organizasyonunda ciddi başarılarla imza atılmış ve neredeyse aşılması gereken herkese ulaşılmıştır. Böylece hastalığın ülkemizdeki prevalans ve insidansında ciddi düşüşler kaydedilmiştir. Bu başarı her ülkede aynı seviyede olmasa da bütün dünyada sağlanmıştır.<sup>1,2,25</sup> Ancak diğer enfeksiyon etkenlerinde olduğu gibi tüberküloz basillerinde de antitüberküloz ilaçlara direnç sorunu ortaya çıkmış ve çoklu antitüberküloz ilaç dirençli olgular her gün artarak belirlenmeye başlamışlardır. Ayrıca HIV enfeksiyonlarının ortaya çıkması ve bütün dünyada yaygınlaşması fırsatçı mikobakteri enfeksiyon insidansında ciddi artışlara yol açmıştır.<sup>24,103,104</sup> Tıpta teknolojik devrimin ortaya çıkardığı tedavi olanaklarından bazıları hastayı yaşatma başarısını sağlarken tedavi sürecinde hastaların fırsatçı enfeksiyonlara yakalanma riskini de arttırmıştır. Bütün bunlara bağlı olarak artık toplumsal bir sorun olmaktan çıktığı sanılan tüberkülozun günümüzde en korkulan halk sağlığı problemlerinden biri olmaya devam ettiği anlaşılmıştır. Bu problemin MDR ve XDR denen antitüberküloz ilaçlara çoklu dirençli olan suşlara bağlı enfeksiyonların yaygınlaşması ile daha da başa çıkılmaz hale geleceği korkusu giderek artmaktadır.<sup>40,67,68,69,70,71</sup>

Çin ve Hindistan'da %57'yi aşan MDR oranları tüberkülozun tüm dünya için ne denli tehlikeli olmaya başladığının bir kanıtıdır.<sup>69,103,104</sup> XDR özelliği taşıyan tüberküloz basili 50 farklı ülkede görülmüştür. En sık

saptandığı ülke Hindistan'dır. Ancak bütün dünyaya giderek yayılma eğilimi sergilemektedir.<sup>69</sup>

Tüberkülozda erken tanının değeri çok büyüktür. Erken tanı spesifik tedavinin vakit geçirilmeden başlamasını sağlamaktadır. Böylece hastaya spesifik tedavi öncesi rastgele verilecek gereksiz antibiyotiklerin direnç gelişiminde rol oynamasını önleyecek ve hasta tedavisinde başarı oranını arttıracaktır. Daha da önemlisi hastanın tanısının erken konması hastayı bulaştırıcılığı esnasında toplumdan izole etmek ve hastalığın yayılmasını önlemek açısından da büyük önem taşımaktadır.

Günümüzde tüberkülozun erken tanısını sağlayacak moleküler teknikler geliştirilmiştir. Ancak bu tekniklerin her laboratuvarında uygulanma olasılıkları bulunmamaktadır. PCR ile akciğer tüberkülozunda kültür kadar özgül sonuç verememektedir. Buna karşılık diğer organ tüberkülozunda yüksek duyarlılık ve özgüllükte sonuç vermektedir. Ancak tüberküloz tanısı için en çok akciğer tüberkülozu örneklerinin incelendiği düşünülecek olursa PCR tekniğinin kültürün yerini alamayacağı görülmektedir.<sup>5,46,105</sup> Bu yüzden bu tanı yöntemlerinin günümüzde de altın standart tanı yöntemi sayılan tüberküloz basilinin kültür yöntemiyle hastadan izole edilerek tanımlanması yöntemi ile birlikte kullanılması gerekmektedir. Yine hasta örneklerinin Erlich Ziehl Neelsen boyama tekniği ile boyanarak ARB aranması da çabuk tanı koymayı sağlayan değerli ve basit bir tekniktir. Ancak bu boyama yönteminde incelenen örneğin 1 ml. sinde 5.000-10.000 basil bulunmaması durumunda pozitif sonuç alınması mümkün olmamaktadır. Ayrıca bu yöntem ile saprofit mikobakteriler ve bazı diğer bakterilerde ARB tarzında görüldüklerinden yanlış pozitif sonuçların alınması söz konusu olabilmektedir. ARB boyama yönteminin duyarlılığının düşük olması, özgüllüğünün balgam dışındaki örneklerde iyi olmaması nedeniyle bu yöntem ile alınan sonucun kültür yöntemi ile birlikte kullanılması zorunluluğu vardır. Özellikle balgamda

pozitif bulunan ARB sonucu, en yaygın olarak görülen akciğer tüberkülozunu % 95 olasılıkla doğru tanımlamaktadır. Ancak birden fazla örnekte yapılan ARB boyalı preparat incelemesiyle bile tüberküloz tanısı ancak hastaların yarısından azında konabilmektedir. Bu nedenle kültür ile tanı koymak tüberküloz tanısında altın standart olma özelliğini sürdürmektedir.<sup>49,50,51</sup> Tüberküloz tanısında değişik besiyerleri kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan besiyeri Löwenstein Jensen besiyeridir.

Son yıllarda kullanımı yaygınlaşan otomatik üreme kontrollü kültür ile tanı yöntemlerinde yaygın olarak Middle Brook Broth kullanılmaktadır. Her iki besiyerinin ortak özelliği tüberküloz besiyeri için seçici olmaları, tüberküloz basilinin diğer bakterilerden farklı olarak üremek istediği zengin organik madde karışımı içermeleri ve lipit içerikleridir. LJ besiyerine tam homojenize taze yumurta katılarak bakterinin lipit ve proteince zengin bir ortamda üremesine olanak sağlanırken, MB besiyerlerine oleik asit, albumin, dekstroz ve katalaz (OADC) eklenerek besiyeri zenginleştirilmektedir. Oleik asit bakterinin lipit ihtiyacını, albumin ve dekstroz organik madde ihtiyaçlarını karşılarken, katalaz bakteriyi okside toksik ürünlere karşı korumaktadır.<sup>7,57</sup>

Kültür yöntemi ile tüberküloz tanısındaki en büyük problem bakterinin geç üreme özelliğidir. Bazen bakterinin üremesi iki ay ve bazen daha uzun zaman alabilmektedir. Otomatik üreme kontrollü sistemlerde bakterinin üremesi, bakterinin metabolik faaliyetlerinin gözlenmesine bağlı olarak izlendiğinden LJ besiyerine göre daha hızlı belirlenmektedir.<sup>105,106,107</sup> MGIT, Bactec, BactAlert gibi sıvı besiyeri kullanılan otomatik üreme kontrollü besiyerlerinde LJ besiyerine göre daha süratli sonuç alınmaktadır.<sup>43,44,106</sup> Ancak bu tip sistemler de her

laboratuvarda bulunmamaktadır. Ayrıca MBA besiyeride şeffaf bir besiyeri olduğundan mikrokolonilerin daha erken gözlenmesine olanak sağlayabilmektedir.<sup>108</sup> Ancak uzun süre enkübasyon gerektiren bu kültür yönteminde besiyerlerinin küflerle kontaminasyonu ve besiyerinin nem kaybetme sorunları nedeniyle tüpte uygulanan LJ besiyerine alternatif oluşturulamamaktadır. Sonuç olarak bütün dünyada en yaygın kullanılan kültür yöntemi LJ ile üretme yöntemidir.

*M.tuberculosis*'in jenerasyon zamanı kültür yöntemiyle üretilen bütün bakterilerden daha uzundur. Jenerasyon zamanı 14-18 saat olabilen *M.tuberculosis*, ortalama 15-45 günde üremektedir. Ancak bu süre bazı suşlarda ve antitüberküloz ilaçlara dirençli suşlarda daha da artmaktadır<sup>7</sup>. Bu zaman kaybı ise tedavi gecikmesine neden olmaktadır. Vaktinde tedavisine başlanmamış hastaların hastalığı duyarlı insanlara bulaştırabilmeleri ise hastalığın yayılması açısından büyük önem taşımaktadır. *M.tuberculosis*'in daha erken üretilmesi için yoğun çabalar sarfedilmiş ve değişik besiyerleri geliştirilmiştir.<sup>108,109,110,111</sup> Ancak sorunu anlamlı düzeyde çözebilecek bir adım atılamamıştır.

Bu çalışmada, mikobakterilerin hücre yapısında bulunan kompleks lipit yapıları göz önüne alınarak, ortama farklı lipit kaynaklarının konulmasının üreme hızına bir etkisi olup olmayacağı incelenmek istenmiştir. Değişik çalışmalarda zengin lipit içeriği ortaya konulmuş olan *Pistacia eurycarpa* bitkisinin meyvasından elde edilen lipitler bu amaçla analiz edilmiş ve içerdikleri yağ asitlerinin böyle bir etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır.

*P.eurycarpa*, ülkemizde Güney Doğu Bölgesinde, Siirt, Mardin, Batman illeri yöresinde dar bir alanda yetişen ülkemize ait endemik bir bitkidir. Bu bitki 1967 yılında F. Yaltırık tarafından tanımlanmış ve literatürdeki yerini bulmuştur.<sup>82,83</sup> Bu bitkinin meyvasının yeşil kabuklarından kozmetik amaçlarla kullanılan sabunlar üretilmektedir. Ancak son yıllarda bu bitki aşıl原因arak ekonomik değeri yüksek olan Siirt fıstığına dönüştürülmektedir. Bu nedenle bölgedeki ağaç sayısında azalmalar yaşanmaktadır.

Değişik araştırmacılar bu bitki sakızının antibakteriyel etkisini göstermiş, ve bazı araştırmacılar ise bitkinin içerdiği yağ asitlerinin diğer fıstık türlerinden farklılığını saptamışlardır.<sup>84,85,86,87</sup>

Mikobakteri hücre duvarında hiçbir canlıda bulunmayan değişik lipit formları bulunmaktadır. Ayrıca bakteri hücre duvarının % 60'ı değişik lipitlerden oluşmakta ve bu lipitler bakteri kuru ağırlığının % 50'sinden fazlasını oluşturmaktadır. Bu lipitler bakteriye hidrofobisite özelliği kazandırmakta, bakteriyi antibiyotiklere dirençli kılmaktadır.<sup>7</sup> Ancak bu kompleks yapılu lipidlerin sentezi oldukça karmaşık ve zaman alıcı olduğundan bakterinin geç üremesinden de sorumlu faktörler olabilirler. Bu bilgiler ışığında, ortama konacak farklı yağ asitlerinin bakterinin sentezlediği lipitlerin öncülü olabileceği ve sentez zamanının bu yolla kısalabileceği düşünülerek bu çalışma yapılmıştır.

Bu amaçla meyva zamanı *P.eurycarpa* bitki meyvaları Siirt yöresindeki ağaçlardan toplanmış bitki meyvalarının dışında bulunan yeşil kabukları soyulmuş, daha sonra yeşil kabuk altındaki sert kabuk kırılarak iç

meyvalar elde edilmiştir. Hem yeşil kabuk hem de iç meyva ayrı ayrı incelemeye alınmışlardır.

Önce meyva ve kabuğunun lipit içeriği Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. Kullanılan meyvanın %24.86'sının, yine kullanılan yumuşak meyva kabuğunda % 54.51'inin lipitten oluştuğu görülmüştür. Daha sonra ekstrakte edilen bu lipitlerin içerdikleri yağ asitleri gaz kromatografisi kütle spektrofotometrisi ile analiz edilmişlerdir. Bu işlem sonunda meyva kabuğunda 8, meyvada ise 9 farklı yağ asidi varlığı gösterilmiştir. Meyvada varlığı gösterilen miristik asit, meyva kabuğunda bulunmamıştır. Buna karşılık hem meyvada hem de meyva kabuğunda palmitik asit, palmitoleik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, linolenik asit, araşidik asit ve eikosenoik asit olduğu saptanmıştır. Yağ asitlerinin bulunuş oranları değerlendirildiğinde hem meyva hem meyva kabuğunda en çok miktarda oleik asit bulunduğu ve bu yağ asidinin her iki test maddesinde lipitlerin yarısından fazlasını oluşturduğunu göstermektedir. MB besiyeri hazırlanırken bu besiyerine eklenen OADC süspansiyonunda oleik asit, üremeyi kolaylaştırıcı lipit kaynağı bir madde olarak ortama eklenmektedir. Bu açıdan düşünüldüğünde söz konusu bitki lipitlerinin hazır bir doğal kaynak olabileceği düşünülebilir. Oleik asit, kabuk lipitlerinin %58.55'i oranında, meyva lipitlerinin ise % 50.99'u oranında saptanmıştır. Ancak bu yağ asidi zeytin, ayçiçeği gibi bir çok bitkide yüksek oranda bulunmakta ve tüketilen yağlar içinde önemli bir yer tutmaktadır. Meyva kabuğunda en çok bulunan ikinci yağ asidi palmitik asittir. Kabukta % 23 oranında bulunan palmitik asit, meyvada % 9 oranında bulunmuştur. Palmitik asit BACTEC denen otomatize tüberküloz kültürü sisteminde C<sup>14</sup> ile işaretlenerek sıvı besiyeri sistemine bir besin kaynağı olarak eklenmektedir. Palmitik asit kullanımı sonucu ortama salınan CO<sub>2</sub>'te bulunan bu radyoizotop sayesinde okunan ışımaya erken üreme sinyali olarak sistem tarafından algılanmaktadır. Hem oleik asit, hem de palmitik asidin tüberküloz basilinin üretilmesinde besin kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Meyvada ikinci sırada en çok bulunan yağ asidi ise %37

oranıyla linoleik asittir. Bu yağ asidi meyva kabuğunda % 9 oranında bulunmuştur. Bu değerlerden anlaşılacağı gibi meyva kabuğu ve meyva'nın yağ asitleri kapsamı birbirinden farklılıklar göstermektedir. Meyva kabuğunda palmitoleik asit ve stearik asit % 3 civarlarında saptanmış diğer yağ asitleri ise hem meyva kabuğu hem de meyvada % 1 ve altındaki değerlerde benzer bulunmuştur. Bu çalışmalarda bulunan yağ asitleri kapsamı diğer çalışmalarda bulunan yağ asitleri kapsamı Kafkas ve arkadaşlarının bulduğu yağ asitleri kompozisyonuna uygun bulunmuştur. Ancak söz konusu çalışmada oleik asit *P.eurycarpa* meyvasında % 18 oranında belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada %1 den az oranda belirlenen heptadeonik asit bu çalışmada belirlenmemiştir.<sup>81</sup> Yağ asitleri tek tek ve birlikte besiyerlerine eklenerek üreme hızına bir etki yapıp yapmayacakları açısından incelenmişlerdir. Ancak ölçülen üreme zamanı bakımından hiçbir yağ asidinin tek başına yada birlikte kullanılması üreme zamanını kayda değer nitelikte etkilememiştir. Bu durum hipotezimizle bağdaşmamaktadır. Zira ortama konacak farklı yağ asitlerinin lipid sentezinde birer öncül madde olarak kabul edilerek bakteri tarafından alınacağı ve bakterinin lipid sentezinde zaman kazandırabileceği düşünülmüştü. Ancak testler sonunda bu beklentiyi karşılayacak bir sonuca ulaşılamamıştır.

Vitaminlerin metabolizmada yaptıkları önemli görevler nedeniyle ortama konmalarının üreme zamanına olumlu bir etki yapıp yapmayacakları da değerlendirilmek istenmiştir. Çalışmanın başında kurulan hipotezde bakteri üremesindeki gecikmenin lipid senteziyle ilişkili olduğu düşünüldüğünden ortama yağda eriyen ve lipitsi yapıda olan A, D, E ve K gibi vitaminlerin etkisi araştırılmak istenmiştir. Bu nedenle vitaminler tek tek ve birlikte, ayrıca yağ asitleri ile birlikte besiyerlerine eklenmiş ve etkileri incelenmiştir. Ancak vitaminlerinde tek tek yada birlikte besiyerlerine eklenmesinin bakteri üreme zamanına kayda değer olumlu

yada olumsuz bir etkileri olmamıştır. Ayrıca yağ asitleri ile birlikte sisteme eklenmeleri de üreme zamanı bakımından olumlu bir sonuç sağlamamıştır. Literatür araştırmasında bu konuda yapılmış çalışmalara rastlanmamıştır. Ancak vitamin A'nın tüberkülozda tedavi başarısını olumlu etkilediği ile ilgili bir çalışmaya rastlanmıştır.<sup>112</sup>

Çalışmada Soxhlet ekstraksiyonu ile meyva ve kabuğundan elde edilen lipitlerden her biri ayrı ayrı ve ayrıca ikisi birlikte besiyerlerine eklenerek üreme zamanı üzerine etkileri açısından incelenmişlerdir. Yapılan sonuç değerlendirmelerinde yağların bu şekilde kullanılmasının üreme zamanını anlamlı düzeylerde hızlandıramadığı tespit edilmiştir.

LJ besiyerinde yapılan çalışmalarda kontrol suşları da dahil olmak üzere test edilen 40 mikobakterinin ortalama üreme zamanı 15.9 gün olarak saptanmıştır. Kabuktan ekstrakte edilen yağın eklendiği besiyerlerinde bu üreme zamanı 13.6 gün olarak belirlenmiştir. Üreme zamanı açısından 2.3 günlük bir avantaj sağladığı ve üreme zamanı bakımından istatistiksel anlamda bir zaman kısalması olduğu gözlenmiştir. Ancak bu şartlarda kazanılan sürenin yeterli bir avantaj sağlayabileceği iddia edilemez. Her suşun farklı üreme zamanı olduğu düşünülecek olursa tüberküloz basilinin daha hızlı üretilmesi için tatmin edici bir zaman kazandırmamaktadır. Meyva yağlarının eklendiği besiyerlerindeki ortalama üreme zamanı 15 gün olarak belirlenmiştir. Bu fark (0.9 gün) önemli düzeyde görülmemiştir. Yine kabuk ve meyva yağının birlikte kullanılması ile üreme zamanı 14.1 güne kadar inmiştir. Fark önemli bulunmuş ancak 2 günden daha düşük görülen bu zaman kazancıda tatmin edici olarak değerlendirilmemiştir. Çünkü üreme zamanında elde edilmiş bu 2-3 günlük daha erken üremeler otomatize sistemlerde ve farklı besiyeri uygulamalarında sağlanabilmektedir.<sup>105,106,107, 108,110,111,113</sup>



Bazı araştışıcılar tüberkuloz besiyerlerine çeşitli maddeler koyarak mikobakterilerin üremesinin hızlandırıcı etkilerini incelemişlerdir. Örneğin Kotian ve arkadaşları besiyerine nikotin eklediklerinde mikobakterileri üremesinin azda olsa hızlandığını belirlemişlerdir.<sup>109</sup> Hedegcock ve arkadaşları ise besiyerine triton ekleyerek mikobakterilerin daha hızlı ve daha iyi üremesini sağlamışlardır. Triton bulanık yağ asitlerini çözerek ederek yağ asitlerinin toksik etkilerini azaltmaktadır.<sup>114</sup> Diğer bir çalışmada mikobakteri hücre duvar yapısında bulunan düşük moleköl ağırlıklı bir thiol olan mikotiol'ün sentezleyemeyen bakterilerin üreyemediğini belirlemişlerdir. Bu madde besiyerindeki okside edici ajanlar ve bazı antibakteriyel maddelerin etkisini azaltmaktadır.<sup>115</sup> Buna karşılık bir çok doğal peptid, alkaloid, terpen, alken gibi maddelerin besiyerlerinde mikobakterilerin üremesi üzerine olumsuz etkisi bulunmaktadır.<sup>116</sup> Bu çalışmada da etkisi incelenen karıştırılmış yağ asitlerinin özellikle MBA'da bakteri üremesini engellediği görölmüştür. Bu engelleme etkisinin geniş yüzeyli besiyeri yüzeyine konan yağ asitlerinin oksijene maruz kalmasıyla ve uzun süre besiyerinin 37 °C de tutulmasına bağlı olarak oksitlenmesi ve bakterilere toksik etki yapmasına bağlı olarak geliştiği düşünölmüştür. Ayrıca bu lipidler atmosfer ve besiyeri yüzeyi arasında bir film oluşturarak bakterinin oksijen ihtiyacını karşılamasını engellemiş olabilir. Böylece aerop bir bakteri olan mikobakteri ürememiş olabilir. İleride yapılacak çalışmalarda ortama triton eklenerek bu deneylerin tekrar edilmesi bu sakıncaları ortadan kaldırılabılır.<sup>114</sup>

Bu çalışmada mikobakterilerin üreme zamanı LJ ve MBA besiyerlerinde ayrı ayrı incelenmiştir. Hiç bir katkı maddesi eklenmemiş olan LJ ve MBA besiyerlerine incelenen 40 test bakterisi ekilmiş ve bunların üreme zamanı kontrol üreme zamanı olarak kaydedilmiştir. Etkisi incelenen maddelerin varlığındaki belirlenen üreme zamanı bu kontrol üreme zamanı ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

LJ ve MBA besiyerlerinde 40 test bakterisinin üreme zamanı gün olarak ayrı ayrı belirlenmiştir. LJ besiyerinde 40 suşun üreme zamanı ortalaması 15.9 gün olarak bulunurken MBA besiyerinde bu zaman 12.3 gün olarak bulunmuştur. MBA besiyerinde tüberküloz basilleri daha hızlı üremektedir. İki besiyerindeki üreme zamanı ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. MBA da mikobakterilerin daha erken üremesi sürpriz değildir. Çünkü bu besiyeri şeffaf bir besiyeridir. Bu nedenle mikobakteri kolonileri daha erken fark edilebilmektedirler. Plakta yapılan bu kültürlerin değerlendirilmesinde plağın altından verilen ışığın çıplak göz, büyüteç yada küçük büyütme ile mikroskopta incelenmesi ile mikrokolonilerin fark edilmesi mümkün olmaktadır. LJ besiyeri ise şeffaf olmayan mat bir besiyeri olduğundan, koloninin geliştiğinin anlaşılması için mutlaka besiyerinden sürüntü alınarak ARB ile boyanması ve incelenmesi gerekmektedir. Şeffaf besiyerlerinde üremenin daha erken belirlenebileceği bilirse de LJ besiyeri tüberküloz kültüründe MBA besiyerinden daha sık kullanılmaktadır. Çünkü MBA besiyeri kullanımında küf kontaminasyonu ve besiyeri kurumması gibi dezavantajlar söz konusu olabilmektedir.

*P.eurycarpa*'nın meyva ve meyva kabuğu ayrı ayrı parçalanarak havanda su ile ezilmişlerdir. Böylece suda çözünen maddelerin suya geçişi sağlanmıştır. Perkolasyon yöntemi denen bu ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen meyva ve meyva kabuğu sulu özütleri milipor filtrelerden geçirilerek steril hale getirilmişlerdir. Daha sonra elde edilen bu özütler tek tek ve birlikte LJ ve MBA besiyerlerine eklenmiş ve mikobakteri üremesi üzerine etkileri incelenmiştir. LJ besiyerinde 15.9 olan kontrol üreme zamanına karşılık, kabuk özütü varlığında 9.8 günde, meyva özütü varlığında 10.45 günde ve her ikisinin karışımı varlığında 9.8 günde üreme gerçekleşmiştir. Her üç koşulda da üreme zamanı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde hızlanmıştır. Bakterilerde

üreme zamanı yaklaşık 1/3 oranından daha fazla kısalmıştır. MBA besiyerinde kontrol üreme zamanı 12.3 gün olarak bulunmuşken, kabuk özütü varlığında bu zaman 7.6 güne, meyva özütü varlığında 8.5 gün ve iki özütün birlikte olduğu besiyerinde ise 7.8 güne düşmüştür. Yine yapılan istatistiksel değerlendirmelerde üreme zamanındaki bu kısalma her üç faktör içinde anlamlı bulunmuştur.

*P.eurycarpa* meyva ve kabuğunda bulunan ve suda çözünen maddeler mikobakterilerin daha hızlı üremesini sağlamıştır. Her iki besiyerinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Çalışma planlanırken *P.eurycarpa*'nın zengin lipit içeriğinin mikobakteri üremesi üzerine olumlu etki yapacağı beklentisi ile yola çıkılmıştır. Ancak bu bitkinin lipit maddeleri değil suda çözünen maddeleri bu etkiyi göstermiştir. Suda çözünen maddelerin geniş çeşitliliği düşünüldüğünde neyin bu etkiyi sağlayabildiğini söylemek oldukça zor görülmektedir. Zira suda proteinler, karbohidratlar, vitaminler, kısa zincirli yağ asitleri, mineraller kısacası polar bütün maddeler çözünmektedir. Bu anlamda elde edilen bu bulgu bir son değil bir başlangıç olmaktadır.

Bu çalışmada LJ besiyerinde tüberküloz basilinin ortalama üreme zamanı 15.9 gün olarak saptanmıştır. Anargyros ve arkadaşlarının<sup>44</sup> yaptığı çalışmada tüberküloz basillerinin üreme zamanı ortalama 25.5 gün olarak belirlenmiştir. Chien ve arkadaşları ise LJ besiyerinde tüberküloz basilinin ortalama zamanını 30.5 gün olarak belirlemişlerdir.<sup>106</sup> Bu farkın nedeni bu ve benzeri çalışmalarda mikobakterilerin hastadan ilk izolasyonundaki zamanı ölçülmekteyken bu çalışmada daha önceden üretilmiş bakterilerin kullanılmış olmasıdır. Çünkü ilk izolasyondan sonra pasajlarla bakteriler daha kısa zamanda üremektedirler.

Mikobakterilerin daha hızlı üretilmesinde amaca ulaşılmış gibi görülmektedir. *P.eurycarpa*'nın meyva ve kabuklarının suda çözünen ekstraktları alınarak ve besiyerlerine taze olarak eklenerek mikobakterilerin klasik besiyerlerinde daha hızlı üretilmesi sağlanabilir. Yada daha ileri çalışmalar ile bu bitkiye ait suda çözünen ekstraktlarının analizi yapılarak mikobakteri üremesini hızlandıran spesifik madde yada maddeler bulunabilir ve bu maddelerin besiyerlerine eklenmesi ile mikobakterilerin daha hızlı üretilmesi sağlanabilir.

Fotoğraflardan da anlaşılacağı gibi şeffaf bir besiyeri olan MBA da ki üremeler incelendiğinde *P.eurycarpa* meyva ve kabuk ekstraktları mikobakterilerin daha hızlı üremelerini sağladığı gibi bakteri kolonilerinin daha iyi gelişmelerini sağladığı da görülmektedir. Hemen hemen bütün suşların üremesinde saptanan bu özellik incelenen özütlerde mikobakteri için bir üreme faktörü olduğunun belirgin bir kanıtıdır. *P.eurycarpa* özütlerinin diğer bakterilerin üremesine bir etkisi olup olmadığı da incelenebilir.

Bu tip çalışmalar ile belki de geç ve güç üreyen diğer bakterilerin daha hızlı ve daha kolay üretilmesi sağlanabilecektir. Bu anlamda belki de besiyeri formüllerine eklenebilecek ekonomik değeri olan bir maddenin varlığının bulunmasında ilk adım atılmıştır.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmada ikisi standart suş olmak üzere 40 adet *M.tuberculosis* complex olarak tanımlanmış mikobakteri suşunun LJ ve MBA besiyerinde üreme hızları üzerine bazı maddelerin etkisi incelenmiştir. *P.eurycarpa*'da bulunan yağ asitleri, bazı vitaminlerin ve *P.eurycarpa* meyvasının çözünen özütlerinin incelenen mikobakterilerin üreme hızı üzerine etkileri incelenmiştir.

*P.eurycarpa* meyva kabuğunda 9 farklı yağ asidi, meyvasında ise 10 farklı yağ asidi varlığı saptanmıştır. Bu yağ asitlerinden oleik asit ve palmitik asit gibi klasik besiyerlerine eklenen yağ asitleri dışında kalan yağ asitleri tek başlarına veya birlikte besiyerlerine eklenmiş ve mikobakteri üreme hızlarına etkileri değerlendirilmiştir. Bu yağ asitlerinin besiyerine eklenmesi ile mikobakteri üretilme hızına anlamlı bir etki yapmadıkları gözlenmiştir.

Yine besiyerlerine yağda çözünen A,D, E ve K vitaminleri, tek başlarına ve yağ asitleri ile birlikte eklenmiş ve etkileri incelenmiştir. Ancak vitaminlerin de üremeyi hızlandırıcı bir etkilerine rastlanmamıştır.

*P.eurycarpa* meyva kabuğu ve meyvasının suda ezilerek filtrasyonla elde edilen iki farklı steril özütüde LJ ve MBA besiyerlerine eklenmiş ve bunlarında mikobakteri üreme hızı üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Her iki besiyerinde de kabuk özütü, meyva özütü ve ikisinden elde edilen özütlerin karışımının eklenmesiyle mikobakteri üremesini önemli ölçüde hızlandırdığı belirlenmiştir. Üreme zamanındaki kısalma özüt eklenmemiş kontrol grubundaki üreme zamanına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Başka bir deyişle bu bitkiden

elde edilen suda çözünen ekstraktların mikobakteri üremesini hızlandırıcı etkileri belirlenmiştir. Bu özütler varlığında bakteriler ortalama olarak en az % 35 oranında daha erken üremişlerdir.

Alınan bu sonuç, kültürle tüberküloz tanısının geç konulmasıyla ilgili sorunların çözümünde önemli bir adım olarak değerlendirilmiştir. Çalışma planlanırken, bakterinin karmaşık hücre duvar lipid yapıları göz önüne alınarak, *P.eurycarpa*'nın zengin yağ asitleri içeriğinin bakteriye üreme zamanı açısından bir avantaj sağlayabileceği düşünülmüştür. Ancak bitkide varlığı saptanan yağ asitlerinin ortama katılmasıyla böyle bir sonuç alınamamıştır. Yağ asitlerine destek sağlaması için eklenen vitaminlerin varlığında da mikobakteri üremesinde anlamlı bir hızlanma izlenmemiştir. Ancak bitkiden elde edilen suda çözünen özütlerin üremeyi hızlandırma etkisi güçlü bir şekilde izlenmiştir. Bu özütler hem üremeyi hızlandırmış hem de besiyerlerinde daha iyi bir üreme gelişmesini sağlamışlardır.

Alınan sonuç bu anlamda bir son değil bir başlangıç olarak değerlendirilmiştir. Çünkü beklendiği gibi farklı yağ asitlerinin varlığında üremeyi hızlandırıcı bir etki bulunmuş olsaydı, o yağ asidi yada yağ asitlerinin ortama eklenerek mikobakteri üremesinin hızlandırılabilirdi iddia edilebilecekti. Ancak suda çözünen özütler varlığında üremenin anlamlı ölçüde hızlandığı görülmüştür. Bu özütlerde bulunan hangi madde yada maddelerin mikobakteri üremesini olumlu etkilediği şu an için açıklanabilmiş değildir. Suda çözünen maddelerin dökümü yapılacak olursa çok geniş bir liste ortaya çıkmaktadır. Kısa zincirli yağ asitleri, proteinler, vitaminler, karbohidratlar, inorganik maddeler ve her türlü polaritesi olan maddeler suda çözünmektedirler. Bu nedenle bu çok değer

li etkiyi sağlayan madde yada maddelerin daha ileri çalışmalarla ortaya çıkarılmasını gerektiren bir sonuca ulaşılmıştır.

Sonuç olarak *P.eurycarpa* meyva ve kabuğunun suda çözünen özütleri mikobakteri üreme süresini yaklaşık 1/3 oranında kısaltmaktadır. Bu özütlerin içinde bulunan etkili maddelerin belirlenmesi ve mikobakteri üretme besiyerlerine eklenmesi tüberkülozun kültür yöntemiyle tanımlanmasındaki gecikmeler ile ilgili sorunun çözümünde önemli bir adım olacaktır. Bu bulgu mikobakteri mikrobiyolojisi konusunda bir ilk olma özelliğini taşımaktadır.

## 7. ÖZET

Anahtar kelimeler: Mycobacterium tuberculosis, Pistacia eurycarpa, Löwenstein Jensen, Middle Brook Agar, perkolasyon, soxhlet ekstraktörü, gaz kromatografisi - kütle spektrometrisi, üreme hızı, yağ asitleri, vitaminler.

### **M.tuberculosis'in üreme hızına Pistacia eurycarpa'dan elde edilen değişik özütler'in ve bazı vitaminleri'in etkisinin incelenmesi**

Bu çalışmada P.eurycarpa'dan soyutlanan farklı özütlerin ve bazı vitaminlerin M.tuberculosis üreme hızı üzerine etkileri incelenmiştir. P.eurycarpa meyva ve kabuğundaki lipidler soxhlet cihazı ile ekstrakte edilmiş ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi ile analizleri yapılmıştır. Meyva ve kabuğun % 50'den fazlasının lipidlerden oluştuğu anlaşılmıştır. gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemi ile kabuk ve meyvada 9 yağ asidi bulunmuştur. En çok saptanan yağ asitleri oleik asit, palmitik asit, ve linolenik asit olmuştur.

Löwenstein Jensen ve Middle Brook Agara meyva ve kabuktan soyutlanan su ile çözünen özütler, lipidler, A,D,E,K vitaminleri ayrıca gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yöntemi ile lipidlerde belirlenen yağ asitleri ayrı ayrı ve birlikte konularak 40 M.tuberculosis suşunun üreme hızına etkileri incelenmiştir.

LJ besiyerinde 40 suşun ortalama üreme zamanı 15.9 gün, suda çözünen meyva kabuk özütü varlığında 9.8, meyva özütünde 10.4 ve meyva ve kabuk özütleri varlığında 9.8 gün olarak bulunmuştur. Aynı değerler MBA besiyerinde 12.3, 7.6, 8.5 ve 7.8 gün olarak belirlenmiş ve iki besiyerinde de bu özütlerin bakteri üremesini istatistiksel açıdan anlamlı düzeylerde hızlandırdığı görülmüştür.



Diğer yağ asitlerinin, ayrıca A,D,E ve K vitaminlerinin tek tek ve karışımlarının üreme hızına değişik oranlarda olumlu yada olumsuz etki yaptıkları ancak tatmin edici bir zaman kazancı sağlamadıkları görülmüştür.

Sonuç olarak P.eurycarpa meyva ve meyva kabuğunun suda çözülmüş özütlerinin M.tuberculosis üreme zamanını en az üçte bir oranında kısalttığı bulunmuştur. Bu özütlerin içindeki etkili maddelerin araştırılması ve besiyerlerine eklenmesinin M. tuberculosis üreme zamanını kısaltacağı, tüberkülozun daha erken tanımlanmasını ve spesifik tedavisine daha hızlı başlanmasını sağlayacağı sonucuna varılmıştır.

## **8.SUMMARY**

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, *Pistacia eurycarpa*, Löwenstein Jensen, Middle Brook Agar, percolation, soxhlet extraction, Gas chromatography - mass spectrophotometry, growth time, fatty acids, vitamins.

### **The investigation of the effects of various extracts obtained from *Pistacia eurycarpa* nuts and certain vitamins on the growth time of *M.tuberculosis*.**

In this study various extracts obtained from *P.eurycarpa* and certain vitamins on the growth time of *M.tuberculosis* have been analysed.

The lipids in the nut and shell portions of *P.eurycarpa* have been extracted with a soxhlet device and the composition of the fatty acids in the extracted lipid substance was analysed with gas chromatography – mass spectrophotometry techniques . It has been observed that more than 50 % of the nut and its shell portions were made up of lipids. Nine different fatty acids were found in the nut and shell portions. The components identified in the nuts and its shell oil are as follows: the major compounds were identified as oleik acid, palmitic acid and linolenic acid. In addition, stearic acid, arachidonic acid, myristic acid, palmitoleik acid, linoleik acid and eicosenoic acid were detected in less amounts. , the effects of various extracts obtained.

The lipids and the water soluble extracts obtained from the nuts and its shells, the vitamins A, D, E and K and also the fatty acids that were found in these lipids determined by gas chromatography – mass spectrophotometry techniques were added separately and together on the

surfaces of the Löwenstein Jensen and Middle Brook Agar media. Their effects on the growth time of 40 *M. tuberculosis* strains were investigated.

We observed that the average growth time of the 40 strains in the LJ media in the presence of the nut shell soluble water extracts was 9.8 days, in the presence of the nut extracts 10.4 days, and in the presence of the combination of the nut and shell extracts 9.8 days. On the other hand, the average growth time of the 40 strains in the LJ media without any of these additives was 15.9 days.

We found that all of water soluble extracts accelerated the growth of the mycobacteria in a statistically significant manner in both media. It has been observed that the other lipids, the fatty acids, and also the vitamins A, D, E and K, individually or in combination, have various effects on the growth time of the *M.tuberculosis* strains, however these differences were not statistically significant.

In conclusion, we determined that the water soluble extracts of *P.eurycarpa* nut and its shell significantly accelerated the growth of *M.tuberculosis*. They shortened the growth time of *M. tuberculosis* at least by a third. It has been concluded that, investigation of the potent substances contained in these extracts and addition of these compounds to the media used for the cultivation of *M. tuberculosis* will accelerate the growth of these bacteria, and allow an earlier diagnosis and specific treatment of tuberculosis.

## 9. KAYNAKLAR

- 1- Global Tuberculosis Control. Epidemiology, strategy, financing : Who Report 2009.Geneva: World Health Organization; 2009.
- 2- T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı Türkiye’de Verem Savaşı 2009 Raporu. Ankara: Üçler Matbaası; 2009
- 3- Dündar D, Tamer GS. ve ark. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi izolatlarının primer antitüberküloz ilaçlara direnç oranları. Klimik Dergisi 2009; 22(2): 52-4.
- 4- Kaul K L. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis*: Impact on patient care. Clinical Chemistry 2001; 47(8): 1553–1558
- 5- Alp A.Tüberkülozun laboratuvar tanısında güncel durum. Hacettepe Tıp Dergisi 2011; 42 (1): 28-33
- 6- Özkuyumcu.C. Hacettepe Mikrobiyoloji serisi-1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı. Nobel Kitapevi, Ankara: 2009.s.76-93
- 7- Bilgehan H, Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 4. Basım. İzmir: Fakülteler Kitabevi; 2004.s. 571-594 .
- 8- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji. Albay A. (Çev). (Başustaoğlu AC (Çev.Ed). ). 6. baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık ; 2010.s. 277-90
- 9- Mikusova K, Slayden RA. Besra GS, Brennan PJ. Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. Antimicrob Agents Chemother 1995 ; 39 (11): 2484–2489
- 10- Brennan PJ. Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis 2003; 83 (3): 91-97
- 11- Umesiri FE, Sanki AK, Boucau J, Ronning DR, Sucheck SJ. Recent advances toward the inhibition of mAG and LAM synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Med Res Rev. 2010, 30(2): 290-326
- 12- Kremer L, Dover LG, Morehouse C, Hitchini P, Everett M. Morrisi HR, et al. Galactan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* identification of a bifunctional udp-galactofuranosyltransferase. J Biol Chem. 2001; 276(28): 430- 440

- 13-** Türk Klinik ve Mikrobiyoloji İnfeksiyon Hastalıkları Derneği. Köksal F, Yaman.A. Farklı bir bakteri topluluğu: Mikobakteriler de hücre duvarı yapısı. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı, Samsun: Aves yayıncılık.; 2003.s.36-47
- 14-** Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action, *Cur Op Chem Biol* 1997; 1: 579-568
- 15-** Takayama K, Wang C, Besra GS. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*, *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(1): 81–101
- 16-** Jayaprakash KN, Lu J, Fraser-Reid B. Synthesis of a lipomannan component of the cell-wall complex of *Mycobacterium tuberculosis* is based on Paulsen's concept of donor/acceptor "Match". *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005;44.p. 5894-98
- 17-** Kaur D, Guerin ME, Skovierova H, Brennan PJ, Jackson M: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*, *Adv Appl Microbiol.* 2009 ; 69: 23–78
- 18-** Jackson M, Raynaud C, Lane' Elle M A, Guilhot C, Winter L, Ensergueix D, Gicquel B, Daffe M. Inactivation of the antigen 85c gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol. Microbiol.* 1999; 31(5): 1573–87
- 19-** Wiker H.G. Harboe M. The antigen 85 complex: A major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Rev.* 1992; 56 (4): 648–661
- 20-** Portevin D, D'Auria CS, Montrozier H, Houssin C, Stella A, Laneelle MA, Bardou F, Christophe Guilhot C, Daffe M. The Acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing Acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth. *J Biol Chem* 2005; 280(10): 8862-74

- 21-** Yuan Y, Zhu YQ, Crane DD, Barry CE. Effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *M.tuberculosis*. *Molecular Microbiology* 1998; 29(6): 1949-58
- 22-** Jurtschuk P. Bacterial Metabolism. Chapter 4, Baron S (Ed). *Medical Microbiology*. 4nd ed. Galveston: 1996. p: 104-108
- 23-** Kılıçaslan Z. Dünyada ve Türkiye’de tüberküloz. *Ankem Derg* 2007;21(Ek 2):76-80
- 24-** CDC Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports 2010 ; 59
- 25-** T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Türkiye’de Verem Savaşı 2010 Raporu. Ankara: Başak Matbaacılık; 2010
- 26-** Dunlap NE, Bass CJ, Fujiwara P, Hopewell P, Horsburgh CR, Salfinger M, Simone PM. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(4): 1376–1395
- 27-** Özbal Y: Tüberküloz İmmünolojisi, *Erciyes Tıp Dergisi*, 2006, 28(1): 25-34
- 28-** Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004;120(4): 213-32
- 29-** Karaca Ö, Rota S. Tüberküloz İmmünolojisi. *Klimik Derg* 1995;8(2):59-62
- 30-** Nicod PL. Immunology of tuberculosis. *Swiss Med Wkly* 2007;137(25):357-62
- 31-** Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I (Ed.) *Immunology*, 7.th ed. (İmir T, (Çev. Ed), İmmunoloji. Ankara: Palme Yayıncılık; 2008. s.127-162
- 32-** Yeğin O: Tüberküloz immunitesi, *Çocuk Enf Derg*, 2007, 1(1):15-7
- 33-** McDonough K, Kress Y, Bloom BR. Pathogenesis of tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun*. 1993; 61(7): 2763-73
- 34-** Topçu A.W, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.s. 404-425

- 35-** Crevel R, Ottenhof THM, van der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(2): 294–309
- 36-** Kaufmann SH. In vitro analysis of the cellular mechanisms involved in immunity to tuberculosis. Rev. Infect. Dis 1989 ;2(2): 448-458
- 37-** Iseman MD. İmmünite ve patogenez. Klinisyenler İçin Tüberküloz Kılavuzu. Özkara Ş. (Çev). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.s. 63-96.
- 38-** Taşova Y, Saltoğlu N, Mıdıklı D, Kandemir Ö, Aksu HZS, Dünder İH. Erişkinde 98 ekstrapulmoner tüberküloz olgusunun değerlendirilmesi. Klimik Dergisi 2000; 13(1): 17-23
- 39-** Öngen G.(Ed), Gemicioğlu B.İ.Ü. Tıp Fak. Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Erişkinde tüberküloz kliniği ve tanısı, Erişkin ve Çocukta Tüberküloz Sempozyum Kitabı 1999; 13.s.21-37
- 40-** Wilson ML. Recent advances in the laboratory detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and drug resistance. Medical Microbiology. 2011; 52(1):1350-55
- 41-** Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği. Uzun M. Örneklerin İşlenmesi ve Kültür Yöntemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun: Aves yayıncılık; 2003.s. 285-290.
- 42-** Somosko A, Magyar PAL. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube with MB Redox, Löwenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 Media for Recovery of Mycobacteria in Clinical Specimens. J Clin Microbiol 1999;37(5):1366-69
- 43-** Lu D, Heeren B, Dunne WM. Comparison of the automated mycobacteria growth indicator tube system (BACTEC 960/MGIT) with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. Am J Clin Pathol 2002;118:542-45
- 44-** Anargyros P, Astill DSJ, Lim IS. Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens, J Clin Microbiol 1990; 28(6): 1288-91

- 45-** Saygan MB, Saniç A, Tarhan G. Tüberkülozda Bakteriyolojik Tanı. Ceyhan İ (Ed). Mikobakteriyoloji Laboratuvar Serisi. Ankara: RSHM Yayını; 2001.s. 56-86
- 46-** Washington State Department of Health, Washington State Tuberculosis services manual diagnosis of tuberculosis disease, 2011; Doh.p. 343-371
- 47-** Özyurt M. Tüberkülozun Laboratuvar Tanısında Kullanılan Moleküler Ticari Tanı Sistemleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun; 2003. s. 325-337
- 48-** Türk Klinik ve Mikrobiyoloji İnfeksiyon Hastalıkları Derneği. Sürücüoğlu S. Tüberküloz basilinin klasik yöntemlerle identifikasyonu, 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun: Aves Yayıncılık; 2003.s.300-310
- 49-** Türk Klinik ve Mikrobiyoloji İnfeksiyon Hastalıkları Derneği. Saniç A, Eroğlu C, Kizirgil A. Direk mikroskopi teknikleri ve değerlendirilmesi. VII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı. Bursa: Aves Yayıncılık; 2008.s. 76-88
- 50-** Levy H, Feldman C, Sacho H, Meeulen H, Kallenbach J, Koornhof HA Reevaluation of sputum microscopy and culture İn the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Chest 1989; 95(6): 1193-1197
- 51-** Türk Klinik ve Mikrobiyoloji İnfeksiyon Hastalıkları Derneği. Sarıüzel N. Direk mikroskopi teknikleri ve değerlendirilmesi VII. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Uygulamalı Kurs Kitabı. Bursa: Aves Yayıncılık; 2008.s.25-31.
- 52-** Pfyffer GE, Welscher Hm, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, Rüşch-Gerdes S. Comparison of the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. J Clin Microbiol 1997; 35(2):364–68



- 53-** Salian NV, Rish JA, Eisenach KD , Cave MD, Bates JH. Polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in histologic specimens. Am J Respir Crit Care Med 1998; 8(4): 1150–5
- 54-** Cheng VCC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005; 24: 711–720
- 55-** Jacobs WR, Barletta WF, Udani R, et al. Rapid assesment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase receptor phages . Science 1993;260(5109): 819-822
- 56-** Albert H, Bwanga F, Mukadda S, Nyesiga B, Ademun JP, Lukyamuzi G et al. Rapid screening of MDR-TB using molecular line probe assay is feasible in Uganda. BMC Infectious Diseases 2010;10:41
- 57-** Türk Klinik ve Mikrobiyoloji İnfeksiyon Hastalıkları Derneği. Nural K. Çocukluk çağı akciğer tüberkülozu. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun: Aves Yayıncılık; 2003.s.106-114
- 58-** Sedo E, Anguilair D, Torres M, Herrera T. Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis . J Clin Microbiol 1992; 30(9): 2415-2418
- 59-** Maekura R, Kohno H, Hiroyani A, Okuda Y, Ito M, Ogura T, Yano I. Prospective clinical evaluation of the serologic tuberculosis glycolipid test in combination with the nucleic acid amplification test. J Clin Microbiol 2003; 41(3): 1322–1325
- 60-** Delacourt C, Gobin J, Gaillard JI, De Blic J, Veron M. Value of elisa using antigen 60 for the diagnosis of tuberculosis in children. Chest 1993; 104(2): 393-8
- 61-** Çobanoğlu N, Özçelik U. Tüberküloz infeksiyonu tanısında interferon-gama testlerinin yeri. Hacettepe Tıp Dergisi 2007; 38:45-47
- 62-** Lighter J, Rigaud M, Eduardo R, Peng CH, Pollack H. Latent tuberculosis diagnosis in children by using the QuantiFERON-TB Gold in-tube test. Pediatrics 2009; 123(1): 30-37

- 63-** Lalvani A, Nagvenkar P, Uawadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. J Infect Dis 2001; 183(3): 469-77
- 64-** WHO. Treatment of tuberculosis: guidelines. 4th ed. 2009. 420
- 65-** Duncan K, Barry CE. Prospects for new antitubercular drugs . Curr Opin Microbiol 2004 ;7(5):460-5
- 66-** Türkiye Ulusal Verem Savaşı Dernekleri Federasyonu. Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı. Tüberküloz tedavisinin ilkeleri. Ankara: Rekmay Ltd. Şti; 2003.s.23-52
- 67-** Türk Klinik ve Mikrobiyoloji İnfeksiyon Hastalıkları Derneği. Kiraz N. Antitüberküloz ilaçlara direnç mekanizmaları ve yeni ilaçlar . 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kurs Kitabı. Samsun: Aves yayıncılık; 2003.s.173-176
- 68-** Marvar A, Shaker IA, Palawan H, Ranjit NMS, Shankar S. Extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB):A potential threat. J B Clin Pharm 2011; 2(1): 27-32
- 69-** World Health Organization . Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. WHO global report; 2010
- 70-** Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular perspectives. Emerging Infectious Diseases 1998; 4( 2): 195-209
- 71-** Zignol M, Hosseini MS, Wright A, Weezenbeek CL, Nunn P, Watt CJ, Williams BG, Dye C. Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. J Infect Dis 2006; 194:479–85
- 72-** Türkiye Ulusal Verem Savaşı Dernekleri Federasyonu. Türkiye’de Tüberkülozun Kontrolü İçin Başvuru Kitabı. Tüberkülozdan korunma. Ankara: Rekmay Ltd. Şti; 2003.s.58-64

- 73-** Scrimgeour C. Bailey's industrial oil and fat products. Shahidi F. (Ed). Chemistry of fatty acids . Inc.6 th. ed. Dundee: John Wiley and Sons; 2005.p.1-44
- 74-** Karaca E, Aytaç S. Yağ bitkilerinde yağ asitleri kompozisyonu üzerine etki eden faktörler. OMÜ Zir Fak Derg. 2007; 22(1):123-131
- 75-** Montgomery R, Conway TW, Spector AA, Chapell D. Biochemistry, A case oriented Approach. St Louis: Mosby ;1995.p. 295-325
- 76-** Baynes J(Ed), Dominizcak MH(Ed). Biochemistry (Dominizcak MH, Lipids and lipoproteins). London: Mosby Comp; 1999.p. 201-213
- 77-** Schujman GE, de Mendoza D. Transcriptional control of membrane lipid synthesis in bacteria. Curr Opin Microbiol. 2005; 8(2):149-53
- 78-** Özuslu E, İskender E, Tel A , İlçim A. Taxonomic situations of two subspecies of Pistacia (*P. terebinthus subsp. terebinthus* and *P. terebinthus subsp. palaestina*) by morphological and area remarks. Bio Di Con 2009; 2(2): 100-109
- 79-** Kafkas S, Kafkas E, Perl-Treves R. Morphological diversity and a germplasm survey of three wild pistacia species in Turkey. Genetic Resources And Crop Evolution 2002; 49: 261–270
- 80-** Demirci F, Baser KHC, Calis I, Gokhan E. Essential oil and antimicrobial evaluation of the *Pistacia eurycarpa*. Chemistry Of Natural Compounds 2001; 37(4):332-335
- 81-** Kafkas S, Kafkas E, Kürkcüoğlu M, Baser KHC . Analysis of the fatty oil of Pistacia eurycarpa nuts by gas chromatography/mass spectrofotometry. Chemistry Of Natural Compounds 2007; 43( 3):313-314
- 82-** Yaltirik F. Anacardiaceae. In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis P.H(Ed) Edinburgh University Pres, Edinburgh.1967
- 83-** Yaltirik F. Anacardiaceae. Contrubitions to the taxonomy of woody plants in Turkey. Notes R. Bot. Garden Edinburgh 1976; 28: 11-12
- 84-** Al-Saghir MG. Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* L.(Anacardiaceae) based on morphological data. Asian J Plant Sci 2010; 9(1): 28-35

- 85-** Alma MH, Nitz S, Kolmannspelger H, Digrak M, Efe FT, Yılmaz N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.) J. Agric. Food Chem. 2004; 52: 3911-14
- 86-** Kafkas S. Interspecific relationships in *Pistacia* based on RAPD fingerprinting. Hortscience 2002; 37(1):168–171
- 87-** Ghalem BR, Mohamed B. Essential oil from gum of *Pistacia atlantica* Desf.: Screening of antimicrobial activity African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2009; 3(3): 087-091
- 88-** Bachrouch O, Mediouni-Ben Jemâa J, Talou T, Marzouk B, Abderraba M. Fumigant toxicity of *Pistacia lentiscus* essential oil against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*. Bulletin of Insectology. 2010; 63 (1): 129-135
- 89-** Derwich E, Manar A , Benziane Z, Boukir A. GC/MS Analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *Pistacia lentiscus* growing in Morocco. World Applied Sciences Journal. 2010; 8 (10): 1267-76
- 90-** Kordali S, Çakir A, Zengin H, Duru ME. Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. Fitoterapia 2003; 74: 164–7
- 91-** Akkan G. Vitaminler. Eşkazan E. (Ed). Akılcı İlaç Kullanımı Sempozyum Kitabı, İstanbul: 1999;11.s. 45-57
- 92-** Rucker RB (Ed), Suttie JW (Ed), McCormick DB,(Ed) Machlin LJ.(Ed) Handbooks of Vitamins. 3.th ed. New York: Marcel Dekker Inc; 2001.p.1-188
- 93-** Tanker M, Tanker N. Farmakognozi. Ankara Ün. Eczacılık Fakültesi Yayınları Ankara:1991; 66
- 94-** Handa SS (Ed), Khamuja SPS (Ed), Longo G (Ed), Rakesh DD (Ed): Extractions Technologies for medicinal and aromatic plants. (Handa SS: A overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants). Trieste: ICS Unido; 2008.p.21-53

- 95-** Arısoy K, Şener A. Katı faz ekstraksiyonu. Çevre Dergisi 1994; 12(3):16-10
- 96-** Handa SS (Ed), Khamuja SPS (Ed), Longo G (Ed), Rakesh DD (Ed). Extractions Technologies for medicinal and aromatic plants, (Singh PJ: Maceration, percolation and infusion technics for the extraction of medicinal and aromatic plants Trieste: ICS Unido; 2008.p.67-82
- 97-** Settle F (Ed). Handbook of Instrumental Techniques for analytical Chemistry, (Hites RA: Gas Chromatography Mass Spectrometry). London: Prentice Hall Inc; 1997.p. 609-626
- 98-** Vendeuvre C, Bertoncini F, Duval L, Duplan JL, Thiebaut D, Hennion MC. Comparison of conventional gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography for the detailed analysis of petrochemical samples. J Chromatography 2004; 1056: 155-162
- 99-** Blomberg J, Schoenmakers PJ, Brinkman UA. Gas chromatographic methods for oil analysis. J Chromatogr A. 2002 ;972(2):137-73
- 100-** Tornabene TG, Gelpi E, Orq J. Identification of fatty acids and aliphatic hydrocarbons in *sarcina lutea* by gas chromatography and combined gas chromatography-mass spectrometry. J Bacteriol 1967; 94(2): 333-343
- 101-** Hayashi S, Suyama IK. Growth of *Cyanobacterium synechococcus leopoliensis* CCAP1405/1 on agar media in the presence of heterotrophic bacteria, Microbes Environ. 2011; 26(2):120-7
- 102-** Erdem H, Tetik A, Arun O, Besirbellioglu BA, Coskun O, Eyigun CP. War and infection in the pre-antibiotic era: The third Ottoman Army in 1915. Scand J Infect Dis. 2011; 8:1-6
- 103-** Rawat J, Sindhwani G, Jujal R, Dua R. Five – year trend of acquired antitubercular drug resistance in patients attending atertiary care hospital at Dehradun. Lung India 2010; 26(4): 106-108
- 104-** Nathanson E, Nunn P, Uplekar M, Floyd K, Jaramillo E, Lönnroth K, Weil D, Raviglione M. MDR Tuberculosis, critical steps for prevention and control. N Engl J Med 2010;363:1050-1058

- 105-** Negi SS, Khan SF, Gupta S, Pasha ST, Khare S, Lal S. Comparison of the conventional diagnostic modalities, bactec culture and polymerase chain reaction test for diagnosis of tuberculosis. *Indian J Med Microbiol* 2005; 8 (23):29-33
- 106-** Chien HP, Yu MC, Wu MH, Lin TP, Luh KT. Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000; 4(9):866–70
- 107-** Atafli E, Dursun B, Ceyhan İ, Güler M, Gümüflü F, Sertkaya D. Akciğer Tüberkülozunun erken tanısında Lowenstein-Jensen (LJ) besiyeri ile Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) yöntemlerinin karşılaştırılması. *Toraks Dergisi* 2003;4(2):138-142
- 108-** Satti L, İkrām A, Abbasi S, Malik N, Mirza IA, Martin A. Evaluation of thin-layer agar 7H11 for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14(10): 1354-56
- 109-** Kotian M, Shivananda PG, Rao KNA. Modified medium for the rapid growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Roy Soc Med* 1983; 76: 530-31
- 110-** Mathur ML, Solanski A. Study of rapid culture of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples. *Annual Report* 2007; 8: 20-23
- 111-** Mathur ML, Gaur J. Rapid culture of *Mycobacterium tuberculosis* on blood agar in resource limited setting. *Dan Med Bull* 2009;56:208-10
- 112-** Mathur ML. Role of vitamin A supplementation in the treatment of tuberculosis. *Natl Med J India.* 2007;20(1):16-21
- 113-** Ren J, He F, Yi S, Cui X. A new MSPQC for rapid growth and detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biosensors and Bioelectronics* 2008; 24: 403–9
- 114-** Hedegecock LW. Complexing of fatty acids by triton WR1339 in relation to growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 1970; 103(2): 520-522

**115-** Sareen D, Newton GL, Fahey RC, Buchmeier NA. Mycothiol is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* Erdman. J Bacteriol. 2003; 185(22): 6736-40

**116-** Copp BR, Pearce AN. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat. Prod. Rep. 2003; 20: 535–57

## 10. ÖZGEÇMİŞ

**Adı** : Merih  
**Soyadı** : ŞİMŞEK  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Ankara -11.11.1976

### **Eğitimi**

Doktora 2006-2011 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

Yüksek Lisans 2001-2004 Kırıkkale Üniversitesi Fen Fakültesi  
Biyoloji ABD (Biyoteknoloji)

Eğitimci Sertifikası 1998- 1999 Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri  
Fakültesi (öğr.eğt.)

Lisans Mezuniyet 1997 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi  
Biyoloji ABD (Moleküler Biyoloji)

Mustafa Kemal Lisesi - Ankara

**Yabancı Dili** : İngilizce

### **Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:**

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti



## **TEŐEKKÜR**

Tezimin hazırlanmasında ve doktora eğitimim boyunca emeği geçen ve her zaman desteğini esirgemeyen değerli danıőman hocam sayın Prof. Dr. Nedim Sultan'a, doktora eğitimim boyunca bilgilerinden yararlandığım hocalarım sayın Prof. Dr. Turgut İMİR'e, sayın Prof. Dr. Semra KUSTİMUR'a, sayın Prof. Dr. Seyyal ROTA'ya, sayın Prof. Dr. Meltem YALINAY ÇIRAK'a, sayın Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR'a, sayın Prof. Dr. Ayse KALKANCI'ya, sayın Doç. Dr. Gölendam BOZDAYI'ya, sayın Doç. Dr. Iőıl FİDAN'a, sayın Doç. Dr. Funda DOĞRUMAN AL'a, tez çalıőmamda teknik ve bilimsel yardımları için Prof. Dr. İlkay ORHAN'a, Doç. Dr. Yüksel KAN'a, Doç. Dr. Berrin ÖZÇELİK'e ayrıca doktora eğitimim süresince birlikte çalıőtıđım tüm doktora ve tıpta uzmanlık yapan arkadaşlarıma, zor günlerimde hep yanımda olan sevgili annem ve babama teőekkür ederim.

**Merih şİMŞEK**

2011-ANKARA