

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**NİTRİK OKSİT DONÖRÜ DETA-NO'NUN TEK BAŞINA VE
BAZI ANTİBİYOTİKLERLE KOMBİNASYONUNUN
SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM
İZOLATLARINA ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO
ARAŞTIRILMASI**

118428

DOKTORA TEZİ

Ahmet Yılmaz ÇOBAN

118428

Danışman: Prof. Dr. Belma DURUPINAR

Samsun

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
Ocak-2002**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından.....*Mikrobiyoloji*.....Programında
.....*Doktora*.....tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: *Prof. Dr. Emel TÜNBAY*.....
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) *Ege Üniv. Tıp Fak. Mikrob. ve Klin Mik. AD İzmir*

Üye: *Prof. Dr. Belma DURUKANAR*.....
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) *OMÜ Tıp Fak. Mikrob. ve Klin Mik AD Samsun*

Üye: *Prof. Dr. Murat FERTÜRK*.....
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) *OMÜ Tıp Fak. Mikrob. ve Klin Mik AD Samsun*

Üye: *Prof. Dr. Erdal AÇAR*.....
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) *OMÜ Tıp Fak. Fizyoloji AD Samsun*

Üye: *Y. Doç. Dr. Aruman BİCİNCİ*.....
(Ünvanı, Adı Soyadı) (Üniversite) *OMÜ Tıp Fak. Mikrob. ve Klin Mik AD Samsun*

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Sait Bilgiç
Prof. Dr. Sait BİLGİÇ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisans Üstü eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Belma DURUPINAR'a ve Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Murat ERTÜRK'e, Tez İzleme Komitesi üyesi olan ve önerileri ile bizlere katkıda bulunan sayın Prof. Dr. Erdal AĞAR'a, tez çalışmalarım için gerekli DETA-NO'yu bizlere hediye eden sayın Prof. Dr. Joseph A. Hrabie ve sayın Prof. Dr. Lary KEEFER'a, Anabilim Dalımız öğretim görevlisi sayın Y. Doç. Dr. Asuman BİRİNCİ'ye, sayın Araş. Gör. Bora EKİNCİ'ye, adlarını saymadığım ve çalışmalarına destek ve yardımlarını esirgemeyen dostlarıma sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim boyunca manevi destek ve sabrını bana bütün samimiyeti ile gösteren ve her zaman yanımda olduğunu hissettiren eşim sayın Dr. Deniz TURGUT ÇOBAN'a minnettarlığımı sunmaktan mutluluk duyuyorum.

ÖZET

**NİTRİK OKSİT DONÖRÜ DETA-NO'NUN TEK BAŞINA VE BAZI
ANTİBİYOTİKLERLE KOMBİNASYONUNUN *SALMONELLA ENTERICA*
SEROVAR TYPHIMURIUM İZOLATLARINA ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO
ARAŞTIRILMASI**

Ahmet Yılmaz ÇOBAN, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Ocak-2002.

Salmonella enterica serovar Typhimurium'da kinolon veya çoklu antibiyotik direnci ile ilişkili iki regulon vardır. Bunlar soxRS ve marRAB'dır. Bu regulonlar nitrik oksit (NO) veya paraquat ile aktive olurlar ve acrAB'nin kodladığı efflux pompasını aktif hale getirirler. Bu çalışmada, NO'nun tek başına ve ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin, ampisilin ve ampisilin/sulbaktam ile kombinasyonunun *S. enterica* serovar Typhimurium klinik izolatlarına in vitro etkisini araştırdık. Çalışmada, aditif veya indiferan ve antagonist etki gözlenirken, sinerjistik bir etki gözlenmedi. Ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin, ampisilin ve ampisilin/sulbaktam gibi bazı antibiyotiklerin etkinliğinin *S. enterica* serovar Typhimurium'da NO tarafından soxRS ve marRAB regulonlarının aktivasyonu yoluyla azaldığı düşünülmektedir. Daha ileri çalışmaların salmonella genleri ve çoklu antibiyotik direnci ile NO etkileşimini aydınlatmak açısından gerekli olduğu görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Nitrik oksit, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, diazeniumdialate.

ABSTRACT

THE IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NITRIC OXIDE DONOR
DETA-NO ALONE AND IN COMBINATION WITH SOME ANTIBIOTICS AGAINST
SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM ISOLATES

Ahmet Yılmaz ÇOBAN, Ph.D. Thesis

University of Ondokuz Mayıs, Samsun, January-2002

Two regulons, soxRS and marRAB, are associated with resistance to quinolones or multiple antibiotics in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. These regulons are activated by nitric oxide (NO) and paraquat and, cause on activation of the acrAB-encoded efflux pump. In this study, the effect of NO was investigated alone and in combination with ofloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin, ampicillin and ampicillin/sulbactam against *S. enterica* serovar Typhimurium clinical isolates in vitro. Synergistic effect was not observed while additive or indifference and antagonistic effect were found. It can be supposed that the efficiencies of some antibiotics, including ofloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin, ampicillin and ampicillin/sulbactam, are decreased via activation of soxRS and marRAB regulons by NO in *S. enterica* serovar Typhimurium. Further studies are need to be done to establish the interaction of NO with the genes of salmonella and, with multiple antibiotic resistance.

Key words: Nitric oxide, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, diazeniumdiolate.

İÇİNDEKİLER

I.	GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II.	GENEL BİLGİLER.....	3
A.	NİTRİK OKSİT (NO).....	3
1.	NO'nun fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	4
2.	NO'nun biyosentezi.....	6
1)	Yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS).....	9
a)	eNOS.....	9
b)	nNOS.....	9
11)	Makrofajlarda NO sentezleyen indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS).....	11
3.	NO'nun biyokimyasal fonksiyonları.....	12
4.	NO'nun hastalıklardaki patofizyolojik rolü.....	14
1)	NO'nun ilişkili olduğu hastalıklar.....	14
11)	NO'nun sitostatik ve sitotoksik rolü.....	15
a)	Makrofajlar ve nötrofiller.....	15
b)	İmmünite ve inflamasyonda NO'nun rolü.....	15
B.	MONONÜKLEER FAGOSİTLER.....	16
1.	Makrofajların antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri.....	18
1)	Oksijen-bağımlı öldürme mekanizmaları.....	18
11)	Oksijen-bağımsız öldürme mekanizmaları.....	19
2.	Antimikrobiklerin makrofajlardan NO salınımı üzerine etkileri....	20
3.	Makrofaj içi dirençli patojenler.....	20
C.	<i>SALMONELLA ENTERICA</i> SEROVAR TYPHIMURIUM (<i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i>).....	21
1.	Tarihçesi.....	21
2.	Genel özellikleri.....	21
3.	Sınıflandırma ve taksonomileri.....	22
4.	Fagositler içerisinde canlılıkları.....	22
5.	Patogenez.....	23
a)	Bakteriyel faktörler.....	23
b)	Konak faktörleri.....	24

6. Salmonellozlar.....	25
a) Tifoidal salmonelloz.....	25
b) Nontifoidal salmonelloz.....	25
7. Nontifoidal salmonellozisin tedavisi.....	27
8. <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium'da kinolon direnç mekanizmaları.....	27
D. DIAZENIUMDIOTE'LER.....	29
III. MATERYAL VE METOD	
A. Bakteri izolatları.....	31
B. Bakteri inokülümünün hazırlanması.....	31
C. Antimikrobiyal ajanların hazırlanması.....	31
D. Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğinin saptanması.....	31
E. Sonuçların değerlendirilmesi.....	34
F. Dama tahtası (Checkerboard) yönteminin uygulanması.....	34
G. Dama tahtası (Checkerboard) kombinasyon testinin kontrolü.....	35
H. <i>Escherichia coli</i> için DETA-NO ile kinolon ve penisilin türevi antibiyotiklerin kombinasyon testinin uygulanması.....	35
IV. BULGULAR.....	39
V. TARTIŞMA.....	48
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	55
VII. KAYNAKLAR.....	56
VIII. ÖZGEÇMİŞ.....	72

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Makrofajlar bağışık yanıt oluşmasında çeşitli uyaranlar ile aktive olarak reaktif nitrojen ara maddeleri (RNIs) ve reaktif oksijen ara maddeleri (ROIs) üretirler. Bu ara maddeler antimikrobiyal ve sitotoksik etkiye sahiptirler. Makrofajların IFN-gama ile birlikte bakteriyel hücre duvarı lipopolisakkariti (LPS) veya muramil dipeptid (MDP) ile aktive olmaları yüksek oranda nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin ekspresse edilmesine neden olur. Bu enzim, L-arjinini oksitleyerek sitrüllin ve bir RNI olan nitrik oksit (NO) üretimini sağlar. NO, kendi kendine etkili bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olmasının yanında, süperoksit anyonları ile kombine olarak daha etkili antimikrobiyal maddeler de oluşturabilir. Makrofajların antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili son bulgular bakterilere, mantarlara, helmintlere ve protozoal patojenlere karşı etkinliklerinde NO ve ondan derive maddelerin önemli ölçüde rol oynadığını göstermektedir. Ancak mevcut bilgiler NO'nun mikroorganizmaları öldürme mekanizmasını açıklamakta yetersiz kalmaktadır; NO muhtemelen, hedef hücrelerdeki respiratuvar siklus ve DNA sentezinin anahtar enzimlerindeki demir-içeren bölgelerle etkileşerek sitotoksiteyi indüklemektedir (Kuby, 1997).

Çoğu mikroorganizma makrofajlar tarafından fagosite edildikten sonra fagozomlardan salınan lizozomal içerik tarafından öldürülür. Ancak, bazı mikroorganizmalar makrofaj içerisinde canlılık ve çoğalmalarını sürdürebilirler. Bunlar; *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella typhimurium*), *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus* ve *Candida albicans*'dır (Kuby, 1997). *S. enterica* serovar Typhimurium'un makrofaj içinde canlılığını sürdürebildiği iyi bilinmektedir. Hücre içi yerleşimi ve hücre içinde canlılığını sürdürebilmesi virulans ile ilişkilidir. Salmonellaların virulans ile ilgili en az 60 tane geni bulunduğu ve bu genlerin iyi tanımlanmış olması hücre içi model olarak çalışmalarda kullanılmasını kolaylaştırmaktadır (Buchmeier ve Heffron, 1989; Collazo ve ark., 1995; Hueck ve ark., 1995; McCormick ve ark., 1995; Mills ve ark., 1995; Pegues ve ark., 1995; Shea ve ark., 1996; Groisman ve Ochman, 1997; Mandell ve ark., 2000).

S. enterica serovar Typhimurium gibi hücre içi yerleşimli bir patojenin tedavisinde hücre içi penetrasyonu iyi olan bir antibiyotiğin seçimi kadar, antibakteriyel etkinliğin makrofajlar tarafından üretilen defans molekülleri ile artırılması da önemli görülmektedir. Kinolon grubu (ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin vb) antibiyotiklerle β -laktam (ampisilin, ampisilin/sulbaktam vb) antibiyotiklerin hücre içine geçerek yüksek

konsantrasyonlara ulaşabildikleri bilinmektedir (Balland ve ark., 1996; Schüler ve ark., 1997).

NO'nun antibakteriyel etkinliğinin bildirilmesi ile infeksiyonların tedavisindeki yeri ve antimikrobiyal ajanlarla olan etkileşimleri konusundaki çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Ancak, NO'nun gaz yapısında serbest bir radikal olması nedeniyle çalışmalarda temini ve kullanımı zordur. Diazeniumdiolate $[N(O)NO^+]$ adı verilen kimyasal maddelerin ise sıvı ortamlarda birtakım bioregülatör maddeleri ve NO'yu salarak ayrıştıkları bilinmektedir. Bu maddeler, DETA-NO ((Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate), SPER-NO, DEA-NO, PROLI-NO, MAHMA-NO ve PAPA-NO'dur. DETA-NO yarı ömrünün diğerlerinden daha uzun (20 saat) olması nedeniyle in vitro çalışmalar için daha uygun bulunmuştur (McElhaney-Feser ve ark., 1998; Fitzhugh ve Keefer, 2000).

Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda; DETA-NO'nun tek başına ve kinolon (ofloksasin, siprofloksasin ve pefloksasin) ve β -laktam (ampisilin, ampisilin/sulbaktam) grubu antibiyotiklerle kombinasyonlarının *S. enterica* serovar Typhimurium izolatlarına etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

A. NİTRİK OKSİT (NO)

NO, önceleri çevreye ait bir zehir olarak bilinmekte ve yaklaşık 15 yıl öncesine kadar sadece kimyacılar ve atmosferin kirlenmesiyle ilgilenen çevrecilerin ilgisini çekmekteydi. Ancak, daha sonraki çalışmalarda memeli hücreleri tarafından üretildiği ve birçok biyolojik olayda rol aldığı gösterildiğinde her bilim dalının özenle ilgilendiği bir konu olmuştur (Koşay 1996; Marangoz, 1996; Gökçe, 1999).

NO atmosferik bir gaz olup, ortam havasında bulunur. Ayrıca kirli havada, eksoz gazında, sigara dumanında ve toprakta yoğun olarak bulunmaktadır. Bakteriler, asit yağmurları ve jetler bu yolla atmosferde çevre kirlenmesine neden olabilmektedirler. Çevre kirlenmesine neden olan reaktif nitrojen oksitlerinin karsinojenik etkileri rapor edilmektedir. Bununla birlikte nitratlar, uzun yıllardan beri tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Nitratların etki mekanizmaları ile ilgili çalışmalar 1970'lerden sonra hızla artmış ve daha sonraki yıllarda, NO konusunda edinilen yeni bilgiler, bu mekanizmanın açıklık kazanmasını sağlamıştır (Gibaldi, 1993; Koşay 1996; Gökçe, 1999; Bryk ve ark., 2000).

NO'nun bakterilerdeki varlığı uzun yıllardır bilinmekte ise de, memelilerdeki önemi yeni anlaşılmıştır. Furchgott ve arkadaşları 1980 yılında yaptıkları deneylerde tavşan aort şeritlerinde asetilkolinle gevşeme sağlanabilmesinin ancak endotel varlığında gerçekleştiğini, bu etkinin oluşumuna aracılık eden ve dayanıksız olan bir madde olasılığı üzerinde durmuşlardır. Araştırmacılar "endotel kaynaklı gevşetici faktör" (Endotelium Derived Relaxing Factor = EDRF) olarak adlandırılan bu maddenin arterler, venler, kılcal damarlar gibi çeşitli damar yapılarında bulunduğunu, farklı bazı vazodilatör maddeler uygulandığında da salındığını göstermişlerdir (Synder ve Bredt, 1992; Çakmakçı, 1999; Eroğlu, 1999; Gökçe, 1999).

Tannenboun ve öğrencileri 1981'de düşük nitrat diyeti ile beslenen sıçanların idrarında bol miktarda nitrat saptamışlar ve buna endojen bir kaynak aramışlardır. İnfeksiyöz diyareli bir hastanın idrarında da bol miktarda nitrat görülmesi inflamasyon-nitrat ilişkisini gündeme getirmiştir. Bakteriyel endotoksinin sıçanlara verilmesinin inflamasyona ve nitrat oluşumuna neden olması, genetik olarak makrofajsız farelerde nitrat atılımının azalması makrofaj-nitrat ilişkisini düşündürmüştür. Daha sonraları aynı gruptan Hibb, kültür ortamından arjininin kaldırılmasının nitrit-nitrat oluşumunu engellediğini, makrofajlarda spesifik bir enzimin arjinini ara bir ürüne dönüştürdüğünü, o ara ürünün de nitrit-nitrata oluşturduğunu ve sonuçta makrofajların, T hücreleri ya da endotoksin ile

aktive olarak arjininden toksik bir madde oluşturup mantar, bakteri ve tümör hücrelerini öldürdüğünü öne sürerek makrofajlardaki NO işlevine ilk atfı yapmıştır. Bu arada Murad tarafından da organik nitratların etkinliklerini NO üzerinden oluşturdukları bildirilmiştir (Synder ve Bredt, 1992; Eroğlu, 1999).

NO'ya karşı bilimsel ilginin gittikçe artması sebebiyle dünyanın önde gelen bilimsel dergilerinde NO'ya ilişkin yıllık yayın sayısı 1981-1983 yıllarında 10'un altında iken, 1987'de 75'e, 1988'de 148'e, 1989'da 274'e, 1990'da 485'e, 1991'de 612'ye, 1992'de 1144'e, 1995'de 3178'e ve 2000 yılında 39072'ye ulaşmıştır. *Science* dergisi NO'yu Aralık 1992 sayısına kapak logosu yaparak bu molekülü yılın molekülü olarak seçmiştir (Editorial, 1992).

NO, iki atom içeren, 30 molekül ağırlığında, membranlardan kolayca diffüze olabilen, suda minimal çözünen fakat membran ve hücrelerin lipid fazında selektif olarak çözünen renksiz, kokusuz gaz yapısında bir serbest radikaldir. NO, yanan havadaki nitrojen moleküllerinin yüksek ısıdaki oksidasyonundan ya da maden kömürü ve ağır yağlar gibi önemli yakıtlarda bulunan nitrojen bileşiklerinin oksidasyonu sonucu yanma olaylarının bir ürünü olarak açığa çıkmaktadır (Synder ve Bredt, 1992; Bolanos ve ark., 1997; Moncado ve ark., 1997; Gökçe, 1999; Eroğlu, 1999;).

Bugünkü bilgilerimize göre NO; immün sistem ile sinir, sindirim, kardiyovasküler ve ürogenital sistemlerde bulunan çok önemli bir düzenleyici molekül, ikinci haberci ve transmitterdir. Normal fizyolojik fonksiyonları yanında septik şok, hipertansiyon, inme, epilepsi ve diğer nörodejeneratif hastalıklar gibi patofizyolojik durumlarla da yakından ilgilidir (Marangoz, 1996; Gökçe, 1999).

NO, potent bir vazodilatör olması yanında nörotransmitter, immunomodülatör, sitotoksik etkili ve doku hasarı oluşturmayan bir otakoid olarak da görülmektedir (Koşay, 1996; Gökçe, 1999).

1. NO'nun fiziksel ve kimyasal özellikleri

NO ($N=O$), azot monoksit veya nitrik oksit olarak adlandırılır. NO şeklinde gösterilirken kimyasal yapısının diğer adı *nitrosonium cation* (NO^+)'dur. En çok oksijen ile birleşerek *azot dioksit* meydana getirir, bununla birlikte süperoksit radikali ile birleşerek *peroksinitrit* oluşturur. NO ile ilişkili nitrojenin okside metabolitleri Tablo 1'de sunulmuştur (Erbaş, 1997; Gökçe, 1999).

NO, tek sayıda paylaşılmamış elektron taşır ve paramagnetiktir. Paylaşılmamış elektron nitrojen ve oksijen atomu üzerinde yer değiştirerek rezonans stabilitesini sağlar

(Synder ve Bredt, 1992; Kharitonov, 1994; Dawson ve Dawson, 1995; Kröncke ve ark., 1995; Eroğlu, 1999; Gökçe, 1999).

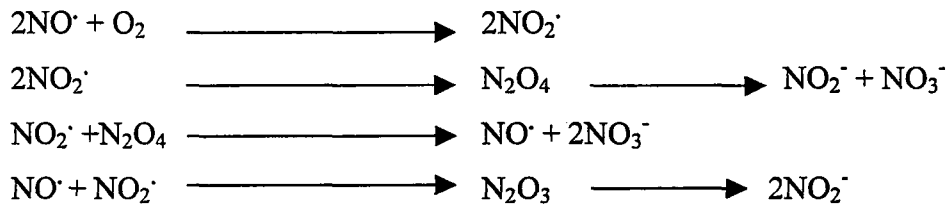
Tablo1. Nitrojenin okside metabolitleri (Grisham'dan, 1992)

Sembol	İsim	Etki
NO [·]	Nitrik oksit	Serbest radikal (S-R)
NO ₂ [·]	Nitrojen dioksit	S-R, nitroze edici etken ajan
N ₂ O	Nitröz oksit	Genel anestetik
N ₂ O ₃	Dinitrojen trioksit	Nitroze edici etken ajan
N ₂ O ₄	Dinitrojen tetraoksit	Dimerik NO ₂ [·] ; nitroze edici ajan
NO ₂ ⁻	Nitrit	Asidik ortamda NO [·] oluşur
NO ₃ ⁻	Nitrat	Stabil anyon



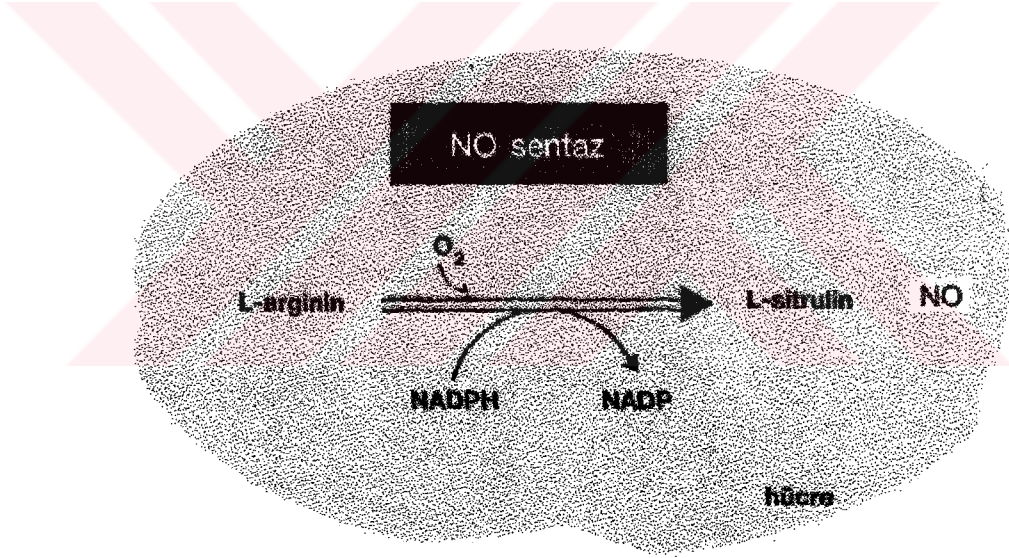
NO'nun biyolojik sistemlerdeki kimyasal etkileşimleri bu paylaşılmamış elektronun stabilizasyonu ile karakterizedir. Bir radikal olan süperoksit, hidroksil gibi radikallerden daha az reaktif olup, yani daha stabil paylaşılmamış elektron taşıyıcısıdır. Biyolojik aktivitesi molekülün şeklinden çok molekülün küçüklüğüne, reaktivitesine, difüzibilitesine bağlıdır. Yarılanma ömrü 3-10 saniyedir (Synder ve Bredt, 1992; Dawson ve Dawson, 1995; Kröncke ve ark., 1995; Yun ve ark., 1996; Eroğlu, 1999).

NO[·], su ve oksijen varlığında aşağıda belirtilen bir dizi nitrojen oksitlerin oluşumuna neden olur (Grisham, 1992):

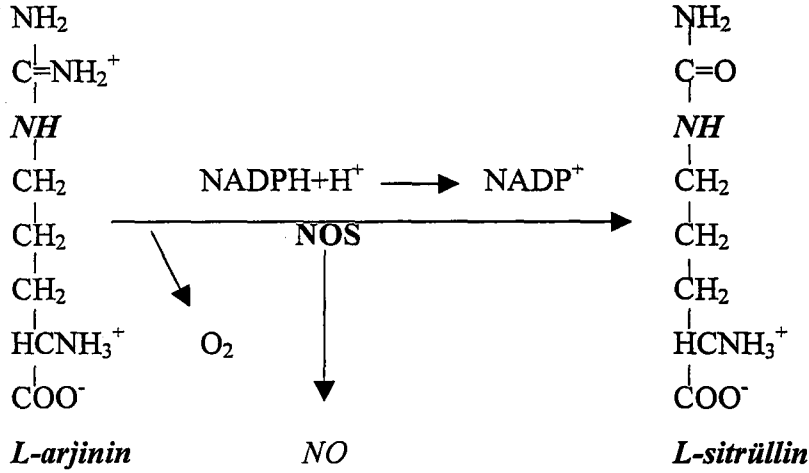


2. NO'nun biyosentezi

NO parakrin bir hormondur; sadece salındığı hücrenin hemen yakınında etkilidir. NO biyolojik yarı ömrü yalnızca birkaç saniye olan kararsız bir radikaldir. Hücrelerdeki sentezi L-arjininin nitrik oksit sentaz (NOS) (NADPH diaforaz) enzimi tarafından oksidasyonu sonucunda gerçekleşir (Şekil 1-2) (Moncado ve Higgs, 1993; Yun ve ark., 1996; Moncado ve ark., 1997; Taylor ve ark, 1998).



Şekil 1. Hücre içi NO sentezinin basitleştirilmiş şeması.



Şekil 2. NOS enzimi ile L-arjinin üzerinden NO sentezi. Kofaktör olarak NADPH+H⁺ kullanılmaktadır.

NOS ilk kez 1989'da tanımlanmış, 1990'da izole edilmiş ve 1991'de klonlanmıştır. Yapısında hem ve sitokrom taşır. p-450 redüktaz ile %60 homologdur (Moncado ve ark., 1991; Garthwaite ve Boulton, 1995; Zweier ve ark., 1995; Rao ve Butterworth, 1998; Eroğlu, 1999).

NOS organizmada benzer biçimde birkaç şekilde bulunabilirse de esas olarak iki ana formu vardır: a) yapısal NOS (cNOS) bazal ya da denetim mekanizmalarının bir bölümü olarak reseptör uyarısına yanıt sonucu kısa dönemli NO sentezler, b) indüklenebilen NOS (iNOS) sitokinlerin etkisiyle NO sentezler. iNOS, NO'yu cNOS'a göre daha büyük hızla oluşturur ve yüksek konsantrasyonlarda NO'nun sitotoksik etkileri ortaya çıkabilir (Tablo 2) (Moncado ve ark.,1991).

Tablo 2. NOS enziminin özellikleri (Çakmakçı'dan, 1999)

Özellik	Yapısal (cNOS)	İndüklenebilen (iNOS)
Ca ⁺⁺ bağımlılığı	+	-
NO oluşum düzeyi	pikomol	nanomol
Uyarıya cevap	ani	gecikmiş
Üretim süresi	kısa	uzun
Glukokortikoid ile etkileşme	etkilenmez	inhibe olur

NOS enzimi; daha çok sinir, endotel, endokard, miyokard hücreleri ve trombositlerde olmak üzere vücuttaki hücrelerin çoğunda bulunmaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. cNOS ve iNOS enzimlerinin salındığı hücreler (Gökçe'den, 1999)

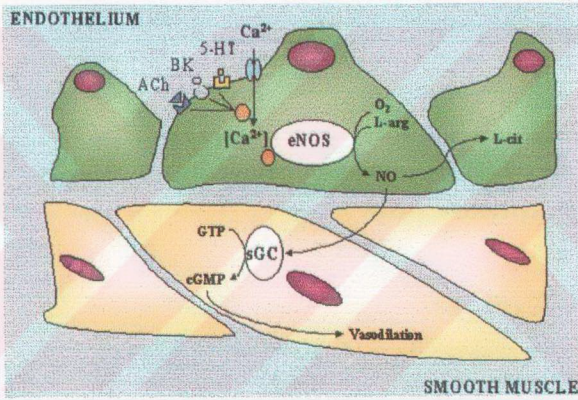
cNOS	iNOS
Endotel hücresi*	Makrofaj, hepatosit*
Santral nöron	Kupfer hücresi
NANC nöron**	Vasküler düz kas hücresi
Nötrofil	Fibroblast, mezenkial hücre
Mast hücresi	Astrosit*, kondrosit
Trombosit	İnflamatuar nötrofil*
Astrosit	Karsinoma hücresi
β-hücresi*	Sinovyosit
Renal makula hücresi*	
Adrenal meduller hücre	
Adrenal korteks hücresi	
Fare nöroblastoma	

*Selektif antikor sınıflamasına dayanır, diğerlerinin sınıflaması spekülatiftir.

**Nonadrenerjik nonkolinerjik nöron

1) Yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS): cNOS sürekli olarak oluşturulur ve iki gruba ayrılır; endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS=NOS III) ve nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS=NOS I) (Çakmakçı, 1999; Gökçe, 1999).

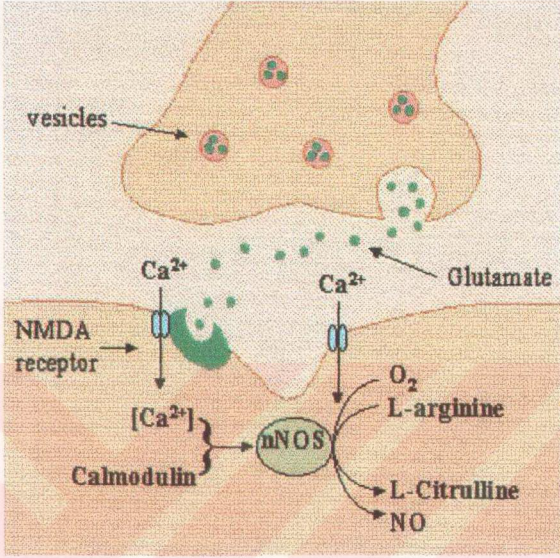
a) eNOS: Endotel kökenlidir (Şekil 3). Bu enzim, vazodilatasyon, platelet agregasyonunun önlenmesi ve vasküler tonusun devamlılığında sorumludur. NO dengesinin bozulması hipertansiyon, tromboz ve aterosklerozise neden olabilir. Hücre içinde sürekli bulunur ve damar direnci ile sinir iletimi gibi fonksiyonlarda da görev yapar ve aralıklarla ve çok küçük miktarlarda NO üretir (Anggard, 1994; <http://www.imakerala.org/nitricoxide> 1.htm; Çoban ve Durupınar, 2001).



Şekil 3. Endotel kaynaklı NOS (eNOS) enziminin uyarılması

(<http://www.bi.bbsrc.ac.uk/WORLD/Labs/MOLCOGNEUR/LMCNpce.html>'den)

b) nNOS: Nöron kökenlidir (Şekil 4). İnme (stroke) de vasküler hasarın önlenmesinde aracıdır. Yetmezliğinde pilorik spazm görülebilir (Anggard, 1994; <http://www.imakerala.org/nitricoxide> 1.htm; Çoban ve Durupınar, 2001).



Şekil 4. Nöronal NOS (nNOS) enziminin uyarılması

(<http://www.bi.bbsrc.ac.uk/WORLD/Labs/MOLCOGNEUR/LMCNpce.html>' den)

cNOS, kofaktör olarak Ca⁺⁺-kalmmodulin bağımlıdır ve hücre içi kalsiyum düzeyini yükselten agonistlere iyi cevap verir. Kalsiyum yükselmesi kalmmodulinin cNOS'a bağlanmasını uyarır ve anında pikomol düzeylerinde NO sentezlenmesine neden olur (Tablo 2). Kalsiyum bağlayıcı maddeler ve kalmmodulin inhibitörleri bu yolla meydana gelen NO sentezini önleyebilirler. Sentez edilen NO, esas olarak hücreler arası ve hücre içi iletişimin fizyolojik aracıdır (Çakmakçı, 1999; Gökçe, 1999).

cNOS'un aktivasyonunda (cevap veren hücreye bağımlı olarak) rol oynayan etkili bazı aktivatörler şunlardır: kalsiyum iyonofor, eksitator aminoasitler, elektriksel uyarı, asetilkolin, bradikinin, trombin, ADP, lipopolisakarit, formil peptidler, lökotrienler, trombosit aktive edici faktör (PAF), forbol miristat asetat (PMA), tromboksan A₂ ve endotelin (Mehta 1995).

u) Makrofajlarda NO sentezleyen indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS): iNOS aynı zamanda NOS II olarak da adlandırılır. Endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, makrofaj, nötrofil, kalp kası ve endokard hücrelerinde gösterilmiştir. Ancak bu hücrelerin prototipi makrofajlardır (Şekil 5). Makrofajlarda sitokin uyarısı sonucunda, birkaç saat sonra başlayan ve günlerce süren nanomol düzeylerinde NO sentezi söz konusudur (Tablo 2). Sitokinler tarafından aktive olmuş makrofajların kullandığı L-arjininin 1/3'ü NO üretmek için kullanılır. iNOS aktivasyonu, asıl olarak endotoksin ve sitokinler (IL-1, TNF, IFN- γ) tarafından yapılır. Bazı hücrelerde sentez IL-8, IL-10, TGF- β gibi maddelerce yavaşlatılabilir; glukokortikoidlerle de bu enzimin uyarılması önlenir. Septik şok gelişiminde önemli bir ajandır. Lipopolisakkarit (LPS), IFN- γ ve endotoksin ile uyarılan makrofajlardan salınan yoğun NO septik şok gelişimine neden olur (Anggard, 1994; [http://www.imakerala.org/nitricoxide 1.htm](http://www.imakerala.org/nitricoxide1.htm); Çoban ve Durupınar, 2001).

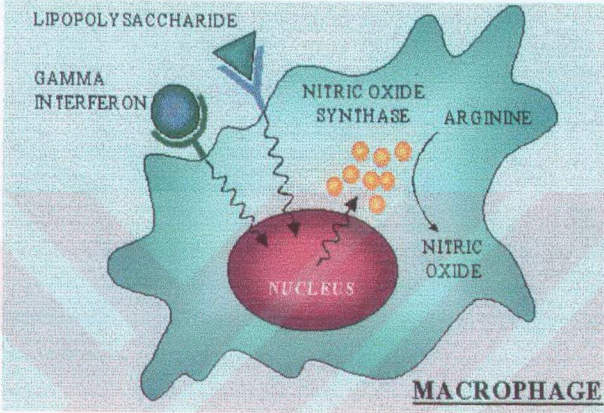
iNOS enzimi, transkripsiyon düzeyinde daha uzun süreli uyarılarak daha fazla miktarlarda (diğerlerinden en az 1000 kat daha fazla; nanomol düzeylerinde) NO üretimine neden olur. Bu sistem fizyolojik şartlarda kalsiyumdan bağımsızdır (Çakmakçı, 1999; Gökçe, 1999).

iNOS toksik düzeylerde NO üretebilen bir enzimdir. Beyinde iNOS enzimi; tümörler, travma, demiyelinizasyon, AIDS demansı, Alzheimer hastalığı ve serebral iskemi gibi değişik patolojik durumlarda da tanımlanmıştır. Bununla birlikte beyin hastalıklarının oluşum mekanizmasında iNOS tarafından üretilen NO'un oynadığı rol henüz bilinmemektedir (Gross ve Volin, 1995).

Bu iki enzimin genleri 1991 yılında klonlanmıştır. Üç farklı NOS için kodlayıcı cDNA'ların klonlanması insan nNOS, eNOS ve iNOS enzimlerinin sırasıyla 1433, 1203 ve 1153 amino asit içerdiğini göstermektedir. Tümü NADPH, FAD, FMN, kalmodulin ve protein kinaz A fosforilasyonu için ortak dizilere sahiptir. İzoenzimler tamamen farklıdır. Sadece %51-57 oranında bir dizilim benzerliği gösterirler. Memeli türleri arasında izoenzimlerde %81-93'lük bir dizilim eşitliği gösteren belirli bir benzerlik mevcuttur (Grisham, 1992; Garthwaite ve Boulton, 1995; Zweier ve ark., 1995; Yun ve ark., 1996; Monaco ve ark., 1997; Rao ve Butterworth, 1998; Taylor ve ark., 1998).

Her iki enzim sistemi N-monometil-L-arjinin (L-NMMA), N-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) ya da N-nitro-L-arjinin (L-NNA) gibi L-arjinin analogları tarafından kompetitif türde inhibe edilebilir. Bu enzim izoformları aynı hücrede birlikte de bulunabilirler. Örneğin; endotel hücreleri NO üretimi açısından TNF- α ile uzun süreli

uyarılırken bir kalsiyum agonisti olan bradikinin ile de kısa süreli uyarılabilmektedir. Ya da, sinir hücreleri ve makrofajlar TNF- α veya LPS ile uyarıldıklarında, iNOS aktif hale gelirken cNOS'un mRNA'sı baskılanmaktadır. Transkripsiyonun denetlenmesi sırasında ters işleyen bir kontrol mekanizması gösterilmiştir (Çakmakçı, 1999; Gökçe, 1999).



Şekil 5. İndüklenebilir NOS (iNOS) enziminin uyarılması

(<http://www.bi.bbsrc.ac.uk/WORLD/Labs/MOLCOGNEUR/LMCNpce.html>'den)

NOS izoformları hücre içi Ca^{++} artışı ile aktive olurlar. eNOS ve cNOS Ca^{++} bağımlı, iNOS ise Ca^{++} 'dan bağımsız olarak hareket etmektedir. Sitokin ile uyarılabilen iNOS bir çok hücrede tanımlanmıştır. iNOS enzimi, immünolojik ya da inflamatuvar bir uyarı sonucu birkaç gün boyunca yüksek düzeylerde NO üretimine neden olarak vücut için zararlı olabilir (Brüne ve ark., 1995).

3. NO'nun biyokimyasal fonksiyonları

NO, nitrojen gazından açığa çıkan, tek değerlikli elektronlardan oluşan ($.N=O$), kararlı olmayan (değişebilir) gaz halinde bir maddedir. NO, diğer serbest radikal bileşiklerine göre daha az reaktif olmasına rağmen bazı durumlarda toksik olabilmektedir. NO, su tabiatındaki eriyiklerde oksijen (O_2) ve su (H_2O) ile çok hızlı tepkimeye uğrayarak

nitrit ve nitrat bileşiklerine dönüşerek hücre içinde sadece birkaç saniye süresince oluşup sonra kaybolur (Gökçe, 1999).

NO salındıktan sonra, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarına eğilim gösterir. Endotel tabakasında üretilmiş olan NO hızla plazmaya geçer ve plazmada iki tür akibete uğrar: ya eritrosit içine girer ve okside formu ile birleşerek methemoglobin, nitrit ve nitrozotiollerin oluşumuna neden olur. Ya da okside olmayan NO ile birleşir ve nitrata dönüşür. Nitritler ve nitratlar, NO dönüşümünün son ürünleri olup vücuttaki NO üretim seviyesinin göstergeleridir (Brüne ver ark., 1995).

Memelilerde, sitozolik bir enzim olan NOS L-arjininden NO ve sitrüllin oluşumunu katalize eder. Arjininin bu oksidasyonunda önemli bir koenzim olan NADPH ile tetrahidrobioplerin (BH₄), FMN, FAD ve bir çeşit sitokrom p-450 gibi ilave kofaktörlere ihtiyaç bulunur. Bu reaksiyon ile oluşan NO, bakteriye karşı direnç, kan damarlarının dilatasyonu ve bir nörotransmitter olarak glutamatın aktivasyonunu içeren bir çok farklı fonksiyonlarda rol almak üzere bir mesajcı molekül gibi difüzyona uğrayarak salınmaktadır (Dinerman ve ark., 1994).

Makrofajlar bakteriyel hücre duvarı lipopolisakariti gibi bir takım uyarıcıların etkisiyle NO üretebilirler. Kısa süreli NO'nun varlığı makrofajların bakteri ve tümör hücrelerini öldürmelerine olanak sağlar. NO'nun bu etkisi, süperoksit anyonları (O_2^-) ile hücre öldürücü etkisini açıklayan daha toksik reaktanlara dönüşümü arasında karşılıklı etkileşimle ilgili olabilir (Dinerman ve ark., 1994).

NO, serbest bir radikaldır ve oksijen süperoksit (O_2^-) ile reaksiyona girerek peroksinitrit anyonları (ONOO⁻) oluşturabilir. Daha sonra peroksinitrit, güçlü ve sitotoksik oksidan formları olan hidroksil radikali ve nitrojen dioksite ayrışır. Peroksinitrit bu ayrışım öncesinde birkaç µm kalınlıktaki porlardan rahatlıkla diffüze olabilir (Buisson ve ark., 1992).

NO'nun biyokimyasını ve biyolojik fonksiyonunu anlamak için ilk reaksiyon ürünleri olan NO⁺ (nitrozonyum iyonu) ve NO⁻ (nitroksil anyonu) oluşumunu ve esas olan sekonder hedef etkilerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Biyolojik sistemlerde NO, oksijen, süperoksit ve ara ürünler ile reaksiyona girer. Oluşan reaksiyon ürünleri sırasıyla NO_x, peroksinitrit (OONO⁻) ve metal-NO bileşikleri olup redoks (indirgenme) ve artırılma yoluyla hedef dokularla ilişkiye girerek sonradan gelecek reaksiyonlar desteklenir. Thiollerin (RSH/RS⁻) hücre içi reaktivitesi ve etkisi nükleofillerin desteklediği nitrozatif reaksiyonlar ile gerçekleşir ve sonuçta S-nitrozotioller oluşur. Böylece reseptörler, iyon kanalları, enzimler ve transkripsiyon faktörlerinin yanında geçiş (ara) metalleri ve tiolleri

de içeren aktif ya da allosterik alanlar NO-ileti sisteminin esas komponentini oluşturur. Ayrıca, NO mevcudiyetinde ferritin mRNA'sı demir düzenleyici protein-1 (IRP-1) tarafından baskılanır (Brüne ve ark., 1995).

NO, eritrositlerdeki oksihemoglobin ile ve ayrıca redükte hemoglobin ile nitrozohemoglobin (HbNO) üzerinden methemoglobin ve nitrate (NO_3^-) dönüşerek metabolize edilir. Methemoglobin, methemoglobin redüktaz ile tekrar hemoglobine dönüşür. NO_3^- ise idrarla atılıma uğrar.

NO'nun biyokimyasal yollarla ölçümü, in vivo olarak az miktarda sentez edildiğinden ve oksijen ile hızla reaksiyona girdiğinden dolayı oldukça zordur. Ayrıca, yarılanma ömrü çok kısadır ve eldeki yöntemler zahmetli ve spesifik değildir (Gökçe, 1999). Buna rağmen NO aşağıdaki yöntemlerle ölçülebilmektedir (Wennmalm ve ark., 1993;):

- Kemilüminesans yöntemi (NO, nitrit, nitrat)
- UV-Vis spektrofotometrik yöntem (Griess, Met Hb)
- ESR (EPR)-spektroskopisi
- Mass spektroskopisi
- Flow sitometre
- İnfrared spektroskopisi

4. NO'nun hastalıklardaki patofizyolojik rolü

Birçok durumda hastalıklar ve NO arasında çok yakın bir ilişki vardır; klinik tabloyu düzenlemede NO'nun katkısını ortaya koyan yeni bilgiler, bilinen hastalıklara bütünüyle yeni bir açıdan bakma fırsatı vermektedir ve yeni sendromların yarattığı sorunları çözmede, genellikle NO'ya başvurmak güncel bir yaklaşımdır.

Şimdiye kadar sağlanan veriler ışığında, deney sonuçlarını irdelemek ya da sonuçları doğrulamak için daha kapsamlı hasta topluluklarında klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

1) NO'nun ilişkili olduğu hastalıklar

- a) Hipertansiyon ve böbrek işlevi (Johnson ve Freeman, 1991).
- b) Diyabet (Panagiotidis ve ark., 1992).
- c) Sindirim kanalı hastalıkları (Kitagawa ve ark., 1989; Pique ve ark., 1992).
- d) Akciğer işlevleri (Frostell ve ark., 1991; Gustafsson ve ark., 1991; Pepke-Zaba ve ark., 1991).

e) Serebral metabolizma hastalıkları (McDonald ve Johnston, 1990; Izumi ve ark., 1992).

f) Ağrı (Meller ve ark., 1990).

g) Antiateroskleroz ve trombosit aggregasyonunun inhibisyonu (Sinzinger ve ark., 1992).

h) Reperfüzyon hasarı (Masini ve ark., 1991; Pearson ve ark., 1992; Siegfried ve ark., 1992).

ii) NO'nun sitostatik ve sitotoksik rolü

a) **Makrofajlar ve nötrofiller:** Aktive olmuş fare makrofajları nitrit ve nitrat sentez etmektedir. Bu sentez L-arginine bağımlıdır ve L-arginin analogları tarafından inhibe edilmektedir. Sentez, tümör hücreleri ve bakterilere karşı makrofajların sitotoksik yanıtından sorumludur (Moncada ve Higgs, 1993).

NO tarafından indüklenen sitotoksitenin biyokimyasal temeli, hedef hücrelerdeki respiratuvar siklus ve DNA sentezinin anahtar enzimlerindeki demir-içeren takılarla NO'nun kombinasyonuna bağlıdır. Fare makrofajlarında L-arginin NO yolu tümör hücrelerine, intrasellüler ve ekstrasellüler mikroorganizmalara karşı primer bir defans mekanizması oluşturmaktadır (Moncada ve Higgs, 1993).

b) **İmmünite ve inflamasyonda NO'nun rolü:** Bir asır önce Fehleisen kansere karşı direncin bakteriyel ürünler tarafından nonspesifik bir yolla artırılabilceğini göstermiştir. Bu fenomen makrofaj aktivasyonu ile ilişkilidir. Son bulgular, bu nonspesifik immünitenin NOS indüklenmesiyle birlikte olduğunu göstermektedir. NO-bağımlı nonspesifik immünite hem retiküloendotelial hem de nonretiküloendotelial (iNOS bulunduğu tespit edilen hepatositler, vasküler düz kas hücreleri ve vasküler endotel) sistemi içeren genel bir fenomendir. NO-bağımlı nonspesifik immünitede akciğer ve karaciğer bir filtre olarak görev yapmaları nedeniyle çok önemli rol oynamaktadırlar (Moncada ve Higgs, 1993).

Allograft atılımında NO'nun süpressör bir rol oynadığı hipotezi kabul görmektedir. Bu veriler, NO'nun spesifik immünitede rolü olduğunu fakat bunun tam olarak açıklanamadığını göstermektedir (Moncada ve Higgs, 1993).

NO ile ilgili artan bulgular akut ve kronik inflamasyonun bir bölümünde NO'nun rolü olduğunu göstermektedir. NOS inhibitörleri ile tedavi akut inflamasyonlu veya adjuvant artritli ratlarda inflamasyon şiddetini azaltmaktadır. Oysa, L-arginin bunun tam tersi bir etki yapmaktadır. Sıçan akciğer ve dermal vasküler yapılarında immünkompleks ile indüklenen vasküler hasar NOS inhibitörleri ile azaltılabilmektedir. Ayrıca, NO'nun

kolonik sentezi ülseratif kolitli hastalarda artmakta ve NOS inhibitörleri deneysel olarak indüklenmiş deneysel kronik ileiti iyileştirmektedir. Bunlara ilave olarak, plazma ve sinoviyal sıvıdaki nitrit konsantrasyonu romatoid artritli ve osteoartritli hastalarda artmaktadır. İnflamatuvar süreçde NO'nun kökeni açık olmamakla birlikte etki, kan damarları, nötrofiller ve makrofajlardan kaynaklanabilmektedir (Moncada ve Higgs, 1993).

NO, doku hasarının oluşumunda rol oynayabilir. Hem mikroorganizmalar için hem de komşu hücreler için sitostatik veya sitotoksik olabilmektedir. Ayrıca, NO sitostatik ve sitotoksik olmasına rağmen, bazı durumlarda sitotoksik aktivitelerini artıran oksijen derive radikallerle de etkileşebilmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda NOS inhibitörleri ve NO donörlerinin her ikisinin oluşan hasarın bazı formlarına karşı koruyucu olduğu belirtilmektedir. Bu muhtemelen, NO'nun bir yandan sitotoksik bir yandan da vazodilatör etkisine bağlıdır. NO, inflamatuvar reaksiyonlarda, vazodilatasyonun artırılmasında, ödem formasyonunda (sinir uyarısıyla), doku sitotoksitesine neden olan lökosit aktivasyonunda muhtemelen çoklu bir fonksiyona sahiptir (Moncada ve Higgs, 1993).

B. MONONÜKLEER FAGOSİTLER

Mononükleer fagositler granülositler gibi kemik iliğindeki stem hücreden köken alırlar. Ancak, stem hücrenin olgunlaşarak farklılaşması aşamasında her iki hücre grubu birbirlerinden ayrı yollarla farklılaşarak sonunda hem morfolojik ve hem de fonksiyonel olarak farklı hücre gruplarının ortaya çıkmasını sağlarlar. Mononükleer fagositlerin kemik iliğindeki öncü hücresi stem hücreden sonra promonosittir. Bu hücre daha da olgunlaşarak monosit haline dönüşür ve periferal kana geçer. Periferal kanda monositlerin ömrü oldukça kısadır ve değişik organ ve dokulara migrasyonla geçerek doku makrofajlarını oluştururlar. Dokudaki makrofajlara "histiosit" adı da verilmektedir. Doku makrofajları monositlere göre daha uzun ömürlü hücrelerdir ve buldukları ortamın özelliklerine uygun olarak farklılaşmalarını sürdürürler. Sonunda değişik dokularda hem morfolojik ve hem de fonksiyonel olarak farklı hücreleri oluştururlar. Örneğin, karaciğerde Kupffer hücresi, böbrekte intraglomerüler mezangial hücreler, akciğerde alveolar makrofajlar, seröz membranlarda serozal makrofajlar, beyinde mikroglia hücreleri, dalakta ve lenf bezlerindeki sinüs makrofajları dokuda farklılaşan monosit kökenli hücrelerdir. Böylece dolaşımdaki monositler "monosit havuzu"nu oluştururken, dokudaki makrofajlar "Retiküloendotelial sistem" denilen son derece aktif ve önemli bir korunma sistemini oluştururlar.

Doku makrofajlarının bir özelliği de birbirleri ile birleşerek “çok çekirdekli dev hücreleri” oluşturabilmeleridir. Birçok klinik örnekte görülen ve bazı hastalıklar için patognomonik olan dev hücreler böyle oluşmaktadır (örneğin tüberküloz infeksiyonunda görülen Langhans Dev hücresi).

Monosit/makrofaj yüzeylerindeki çok sayıda reseptör yardımı ile hem canlı vücudunda birçok diğer hücre ve dokuya ve hem de vücut dışında plastik ve cam yüzeylere yapışma yeteneğindedir. Laboratuvarlarda bu yapışma özellikleri nedeni ile diğer mononükleer hücrelerden (lenfositler) kolaylıkla ayrılarak elde edilebilmektedirler. Yüzeyde taşıdıkları reseptörlerin pek çoğu iyi tanımlanmış ve fonksiyonları biliniyor ise de, cam ve plastik yüzeye yapışma özelliğinin başlıca hangi reseptör yardımı ile gerçekleştiği bilinmemektedir.

Monosit/makrofajlar yüzeylerindeki yapışma reseptörleri (adezyon reseptörü) yardımı ile dolaşımda damar içi endotel hücrelerine, diğer dolaşan hücrelere (lenfositler gibi) ve dokularda da buldukları çevreyi oluşturan hücre ve hücreler arası matrikse yapışmaktadırlar. Monosit/makrofaj yüzeyinde bulunan en önemli yapışma reseptörleri CR3 (kompleman reseptörü) ve LFA-I'dir (leucocyte function antigen-I).

Mikroorganizma gibi yabancı partiküllerin fagositozu başlıca Fc reseptörleri, kompleman reseptörleri, mannozil-fukozil reseptörleri ve sialo-adhezinler yardımı ile olmaktadır. Mannozi-fukozil reseptörleri hem fagositoz ve hem de pinositozda rol oynamaktadırlar. Birçok kapsülsüz mikroorganizma yüzeyinde mannoz ve fukoz gibi şekerleri taşıdığı için bu tür bakterilerin hücre içine alımı bu reseptörlerce sağlanmaktadır.

IgG molekülünün Fc parçasını bağlayan birbirinden farklı üç tip Fc reseptörü bulunmaktadır. Bunlar insanda Fc γ R1, Fc γ R2 ve Fc γ R3 olarak isimlendirilmektedir. Bunlar arasında özellikle Fc γ R1, IgG'nin Fc parçasına karşı çok yüksek bir affinite göstermektedir. Üç Fc reseptörünün de farklı fonksiyon ve özellikleri olduğu bilinmektedir.

Monosit/makrofaj yüzeyindeki diğer önemli bir reseptör grubu kompleman reseptörleridir. Bunlar da CR1, CR3 vs gibi adlandırılır ve farklı fonksiyonları bulunmaktadır. Vücuda giren mikroorganizmalar dolaşımda kendileri için spesifik IgG molekülü ile bağlanıp (opsonizasyon) komplemanı aktive ettiklerinde monositler için çok iyi bir yem haline gelmekte ve kompleman reseptörlerinin yardımı ile monositler tarafından yakalanmaktadırlar. Monosit/makrofaj tarafından yakalanan bakterinin etrafı hücre zarı tarafından kuşatılarak fagositer vakuol (fagozom) oluşturulmaktadır. Daha sonra sitoplazmadaki lizozimler vakuol membranı ile birleşerek lizozomal içerik vakuol

içine dökülür ve mikroorganizmanın hazmedilmesi süreci başlamış olur. Yabancı antijenin içeri alınması sırasında kullanılmayan reseptörler (Fc) tekrar hücre dışına çıkararak hücreyi yeni bir fagositoza hazır hale getirirler.

Monosit/makrofaj yüzeylerinde çok sayıda sitokin reseptörleri de bulunmaktadır. Örneğin; interferon, prostoglandin, monokin ve TNF reseptörü bunlar arasındadır. Bunun anlamı ise bu mediatörlerin hücre işlevini etkileyebilmesidir. Gerçekten başlıca T hücrelerinden salgılanan değişik mediatörler (sitokinler) monosit/makrofaj fonksiyonlarını çok büyük ölçüde etkileyebilmekte ve istirahatteki monositi, aktif monosit haline dönüştürebilmektedir. Monosit/makrofajların kendileri de çok sayıda sitokin ve mediatör salgılama yeteneğindedirler. Özellikle aktif monosit/makrofajlardan salgılanan sitokinler (monokinler) diğer monosit/makrofajları, nötrofilleri ve T ve B hücrelerini etkileyerek immün savunmanın çok kapsamlı bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (Ustaçelebi, 1999a).

1. Makrofajların antimikrobiyal ve sitotoksik aktiviteleri:

Aktive makrofajlar tarafından üretilen birçok antimikrobiyal ve sitotoksik madde fagosit edilmiş mikroorganizmaların intrasellüler harabiyetinden sorumludur. Bununla birlikte bu toksik maddeler antitümör etkinliğin sağlanabilmesi için de makrofajlardan salınabilmektedir. Bu maddelerin toksik etkileri oksijen-bağımlı ve oksijen-bağımsız iki mekanizmayla gerçekleşmektedir (Kuby, 1997).

1) **Oksijen-bağımlı öldürme mekanizmaları:** Tablo 4'de özetlendiği gibi aktive makrofajlar çok fazla miktarda reaktif oksijen ara maddeleri (ROIs) ve reaktif nitrojen ara maddeleri (RNIs) üretmektedirler. Bu ara maddeler etkin bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler. Fagositoz sırasında respiratuar patlama (respiratory burst) olarak bilinen moleküler bir süreç aktive makrofajlarda oluşmaktadır. Bu süreç, süperoksit anyonunun ve reaktif bir oksijen ara maddesinin oluşumu için oksijenin redüksiyonunu katalizleyen membran-bağlı bir oksidazın aktivasyonu ile başlamaktadır. Oluşan reaktif oksijen ara maddesi sindirilmiş mikroorganizmalar için oldukça toksiktir. Süperoksit anyonu diğer güçlü oksidan ajanların da üretimini sağlamaktadır. Bu ajanlar, hidroksil radikalleri, singlet oksijen ve hidrojen peroksittir. Fagozom ile lizozom kaynaşırken, myeloperoksidaz için toksik bir madde olan ve hipoklorit içeren uzun ömürlü oksidanların üretimi için hidrojen peroksit ile etkileşmektedir (Kuby, 1997).

Makrofajlar bir T-hücre-kaynaklı sitokin (IFN- γ) ile birlikte bakteriyel hücre duvarı LPS'i veya MDP ile aktive oldukları zaman, yüksek oranda NOS ekspresyon etmektedirler. Bu enzim, L-arjinini oksitleyerek sitrüllin ve reaktif bir radikal olan NO üretimini

sağlamaktadır. NO, kendi kendine etkili bir antinmikrobiyal aktiviteye sahiptir ve hatta daha etkili antimikrobiyal maddelerin oluşumu için süperoksit anyonları ile de kombine olabilmektedir. Son zamanlarda elde edilen bulgular, bakterilere, mantarlara, helmintlere ve protozoal patojenlere karşı makrofajların antimikrobiyal aktivitesinin çoğunun NO ve NO'dan kaynaklanan maddelere bağlı olduğunu göstermektedir (Kuby, 1997).

ii) **Oksijen-bağımsız öldürme mekanizmaları:** Aktive makrofajlar lizozim ve çeşitli hidrolitik enzimler de sentez edebilmektedirler (Tablo 4). Bunların ayrışma ürünleri oksijen içermemektedir. Bununla birlikte aktive makrofajlar defensinler olarak bilinen antimikrobiyal ve sitotoksik peptidlerin bir grubunu üretmektedir. Defensinler, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Haemophilus influenzae*'yi içeren bir çok bakteriyi öldürebilme yeteneğindedirler. Aktive makrofajlar TNF- α da sekrete etmektedirler ve bu faktör tümör hücreleri için sitotoksik olmasına rağmen normal hücrelere toksik etki yapmamaktadır (Kuby, 1997).

Tablo 4. Makrofaj ve nötrofillerin antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitelerinin mediatörleri
(Kuby'den, 1997)

Oksijen-bağımlı öldürme	Oksijen-bağımsız öldürme
<p>Reaktiv oksijen ara maddeleri</p> <p>O₂ (süperoksit anyonu) OH (hidroksil radikalleri) ¹O₂ (singlet oksijen) H₂O₂ (hidrojen Peroksit) HOCl (hipoklorik asit) NH₂Cl (monokloramin)</p> <p>Reaktiv nitrojen ara maddeleri</p> <p>NO (nitrik oksit) NO₂ (nitrojen dioksit) HNO₂ (nitroz asit)</p>	<p>Defensinler</p> <p>Tümör nekrozis faktör α (yalnızca Makrofajlar için)</p> <p>Lizozim</p> <p>Hidrolitik enzimler</p>

2. Antimikrobiklerin makrofajlardan NO salınımı üzerine etkileri

NO, başta makrofajlar olmak üzere çeşitli hücreler tarafından sentezlenen ve konak immün yanıtından şok gelişimine kadar pek çok süreçte rol alan bir serbest radikal gazdır. Bu nedenle tedavide kullanılacak antibakteriyel ajanların NO salınımı üzerine etkisinin bilinmesi önemli görünmektedir (Gülay ve ark., 1997).

Son zamanlarda bu konu ile ilgili yapılan çalışmaların sayısında giderek bir artış gözlenmektedir. Antifungal bir ajan olan amfoterisin B'nin TNF- α ve IL-1'in makrofajlardan salınımını indükleyerek, buna bağlı NO-bağımlı yolu uyardıkları gösterilmiştir (Tohyama ve ark.,1996). Ayrıca amfoterisin B ve *Cryptococcus neoformans*'a karşı oluşmuş antikapsüler antikorların sinerjistik olarak nitrit seviyesini artırdığı da gösterilmiştir (Mozaffarian ve ark.,1997). Tetrasiklinin farelerde oluşturulan septik şok profilaksisi ve tedavisinde avantajlı olduğu ve bu etkisini de TNF- α , IL-1 α ve iNOS'u inhibe ederek yaptığı belirtilmektedir (Milano ve ark., 1997; D'Agostini ve ark., 1998). Makrolid antibiyotiklerin de sıçan akciğer makrofajlarından NO salınımını inhibe ettiği bildirilmiştir (Kohri ve ark., 2000). Bunlara ek olarak, izoniazid, ampisilin, ofloksasin, streptomisin ve etambutolün in vitro olarak insan-derive makrofajlardan NO salınımını artırdığı gösterilmiştir (Ekinci ve ark., 2001)

3. Makrofaj içi dirençli patojenler

Çoğu fagosite edilmiş mikroorganizmalar fagozomlardan salınan lizozomal içerik tarafından öldürülmektedir. Bununla birlikte, bazı mikroorganizmalar makrofajlar içerisinde canlılık ve çoğalmalarını sürdürebilmektedirler. Bu hücre içi patojenler *L. monocytogenes*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *N. gonorrhoeae*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *B. abortus* ve *C. albicans*'tan oluşmaktadır (Kuby, 1997).

Bazı hücre içi patojenler lizozom-fagozom birleşimini engeller ve fagozom içerisinde çoğalabilirler. Diğer patojenlerin sahip olduğu hücre duvarı komponentleri lizozom içeriğine bu bakterilerin dirençli hale gelmesini sağlamaktadır. Kalan diğer hücre içi patojenler ise, fagozomlardan kaçarak canlılıklarını korumakta ve infekte makrofajın sitoplazması içerisinde çoğalmaktadırlar. Nonspesifik fagositik defans sistemine karşı zekice bir savunma geliştiren bu hücre içi patojenler, spesifik bir immün cevaptan korunmaktadırlar. Gecikmiş tip hipersensitivite (DTH) olarak adlandırılan benzersiz bir hücre-aracılı immünolojik defans mekanizması çoğu patojenle savaşmaktadır (Kuby, 1997).

C. *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR *TYPHIMURIUM* (*SALMONELLA TYPHIMURIUM*)

1. Tarihçesi

Salmonella'lar adlarını ilk kez *Salmonella choleraesuis*'i domuz barsağından izole eden patolog Salmon'dan almışlardır. *Salmonella*'lar doğada yaygın olarak bulunurlar (evcil ve yabani memelilerin, sürüngenlerin, kuşların ve böceklerin gastrointestinal sisteminde). *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* ve *Salmonella sendai* gibi bazı *Salmonella* türleri yalnızca insana adapte olmuşlardır ve doğal konağı bilinmemektedir. *S. enterica* serovar Typhimurium gibi diğer organizmalar geniş bir konağa sahiptirler ve çok geniş bir hayvan konağını infekte edebilmektedirler. *Salmonella dublin* ve *Salmonella arizonae* gibi bazı *Salmonella*'lar hayvan türlerine çok iyi adapte olmuşlardır ve bu türler nadiren insanları infekte etmektedirler (Mandell ve ark., 2000).

Salmonella'ların bugün kullanılan serotiplemesi veya antijenik sınıflandırması 1920-1940 yıllarında Kauffman ve White tarafından bakteriyel yüzey antijenleri ile antikorların etkileşiminin uzun yıllar çalışılmasının bir sonucudur (Mandell ve ark., 2000).

1952'de Zinder ve Lederberg *S. enterica* serovar Typhimurium'u kullanarak bir virus partikülü olan bakteriyofaj P22 yoluyla bir hücreden bir başka hücreye genetik bilgi transferiyle genetik transdüksiyonu geliştirmişlerdir. Bu ilk çalışmanın sonucu olarak *S. enterica* serovar Typhimurium genetik çalışmalar için bir model haline gelmiştir. *S. enterica* serovar Typhimurium genetik çalışmalarının bir ürünü kimyasal bileşiklerin mutajenik aktivitesini test etmek için oxotrofik *S. enterica* serovar Typhimurium mutantları kullanarak yapılan Ames testinin 1973'de geliştirilmesini kapsamasıdır. Günümüzde de *Salmonella*'ların patogenezi ve immünitesi ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır (Mandell ve ark., 2000).

2. Genel özellikleri

Salmonella bakterileri yaklaşık olarak 2.0-5.0 µm boyunda 0.7-1.5 µm eninde çomakçık şeklinde peritriş kirpikleri aracılığı ile hareketli (*Salmonella gallinarum* veya *Salmonella pullorum* hareketsizdir), sporsuz, kapsülsüz bakterilerdir. Bakteriyolojik boyalarla iyi boyanırlar ve Gram olumsuzdurlar. Çoğunda tip 1 (mannoza duyarlı hemagglütinasyon yapan), *S. gallinarum* ve bazı kökenlerde ise tip 2 fimbrialar bulunmaktadır (Bilgehan, 2000).

Salmonella'lar alışılmış birçok besiyerinde üremektedirler. Aerop ve fakültatif anaeropturlar, 37°C'de en iyi ürerlerse de üreme ısıları sınırı oldukça geniştir (20°C-42°C). Ortalama pH 7.2 ortamında üremeyi severler. Buyyon ve benzeri sıvı besiyerlerinde

homojen bulanıklık yaparlar. Jelozda büyük 2-3 mm çapında yuvarlak çoğu kez kabarık, düzgün yüzeyli ve düz kenarlı koloniler yaparlar (Bilgehan, 2000).

Salmonella'lar ısıya dirençsizdirler. 55°C'de 20 dakikada ölürlür. Kuruluğa dirençleri yoktur. Ancak gün ışığından uzak nemli ortamlarda lağım sularında, kuyu sularında ve toprakta uzun süre canlı kalabilirler. Soğuğa çok dirençlidirler. Soğuk yiyecek ve içeceklerde canlı kalmalarının epidemiyolojik önemi vardır. Liyofilize halde yıllarca canlı kalabilirler. Doğrudan temas etmek koşulu ile antiseptikler çabuk etkilidir. Normal konsantrasyonlardaki klor, sulardaki *Salmonella*'ları öldürmektedir. Ancak dışkı parçaları ve diğer organik maddeler içindeki *Samonlella*'lara bu maddelerin etkisi azalmaktadır (Bilgehan, 2000).

Salmonella'ların saklanması için içinde % 1 agar ve % 2 NaHPO₄ 12H₂O içeren dik jeloza batırma kültürü yapıp üretildikten sonra sıkıca kapatılıp oda ısısında, karanlıkta aylarca canlı kalabilirler. Sodyum deoksikolat koliformların üremesini indirgediği halde *Salmonella* ve *Shigella*'ların üremesini etkilemez (Bilgehan, 2000).

3. Sınıflandırma ve taksonomileri

Salmonella'lar Enterobacteriaceae familyasının bir genusudur. 1983'den önce birçok *Salmonella*'nın varlığı taksonomik olarak kabul edilmiştir. Günümüzde yapılan birçok deneyin sonucunda DNA benzerliklerine göre tüm *Salmonella*'lar tek bir tür olarak *S. choleraesuis* diye sınıflandırılmaktadır. *S. choleraesuis* türleri de DNA benzerlikleri ve konaklarına göre 7 alt sınıfa ayrılmaktadır. 7 *Salmonella* alt grubunun üyeleri O somatik, Vi yüzey ve H flagel antijenlerine göre 2300'den daha fazla serovarin birisi içerisinde serotiplenebilmektedir (Mandell ve ark., 2000).

4. Fagositler içerisinde canlılıkları

Fare makrofajlarının *S. enterica* serovar Typhimurium ile infeksiyonunun morfolojisi ve hücre biyolojisi çalışılmaktadır. *Salmonella*, epitel hücrelerinde tanımlandığı gibi makrofajlarda da membranın büzülmesini indükler. *Salmonella*'lar kompleman ile opsonize oldukları zaman reseptör-aracılı endositozdan ziyade yaygın makropinositoz ile makrofajlar içerisine girerler. *Salmonella*'lar, içerisinde ekstrasellüler sıvı bulunan 2-5 µm membran-bağlı bir vakoul ile içeri alınır. Bu vakouller, membran büzülmesinin füzyonu ile oluşur. Endositozdan sonra diğer makropinozomlar ile füzyon, geniş fagozomların meydana gelmesi ile sonlanır ve *Salmonella* içeren büyük vakouller oluşur. Fagozom lizozomal kompartmanı için asidifikasyonu ve yeni oluşumları geciktirebilmesine rağmen, *Salmonella* içeren vakoulün lizozomal kompartman ile hızlıca füzyona girdiği görülmektedir. Nötrofillerin de *Salmonella*'ları fagosite ettikleri ve hızlıca

öldürdükleri bilinmektedir (Alpuche-Aranda ve ark., 1992, 1994; Chen ve ark., 1996; Monack ve ark., 1996; Oh ve ark., 1996; Rathman ve ark., 1997; Mandell ve ark., 2000).

Kronik granüloamatöz hastalıklı kişilerden elde edilen nötrofiller ile ilgili bulgular nötrofillerin *S. enterica* serovar Typhimurium'un hatta *S. typhi*'nin öldürülmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Nötrofiller içerisindeki *Salmonella*'ların öldürülmesinde yalnızca oksijen-bağımsız öldürme mekanizması gereklidir. Oksijen-bağımlı öldürme mekanizmasına direnç makrofaj içerisinde daha önemli olmaktadır. Bu görüş *recA* (rekombinaz; DNA onarımı) ve *recBC* (rekombinaz; DNA onarımı) mutant *S. enterica* serovar Typhimurium ile ilgili bulguları desteklemektedir. Bu mutantlar, oksidatif bir patlama oluşturan fare makrofajları içerisinde yalnızca canlılığını sürdürebilen suşlardaki defektif rekombinasyon ve DNA onarımı ile tanımlanmaktadır (Looney ve Steigbigel, 1986; Buchmeier ve ark., 1993; Mandell ve ark., 2000).

5. Patogenez

a) Bakteriyel faktörler

Salmonella'ların patogeneğinde birçok bakteriyel faktör önemlidir. *S. enterica* serovar Typhimurium'un virulansında iki gen önem taşımaktadır. Bu genler, "patojenite adacıkları" olarak bilinen bölgede lokalizedir. Bu adacıklar SPII ve SPI2 olarak adlandırılır ve 30. kromozom sentromer 63' de lokalize DNA'nın yaklaşık 40 kilobazından oluşur. Bu bölgelerin her ikisi tip III sistemleri ve hedefleri olarak adlandırılan özelleşmiş bir sekresyon sistemini kodlar. Bu sekresyon apparatusunun hedefi memeli hücresi ile temas ettiğinde sitoplazmaya geçişi sağlamaktadır. Benzer sistemler birçok bakteri türünde bulunmaktadır ve apoptozis, sitokin üretimi, sitoskeletal fonksiyonları içeren ökaryot hücre süreçlerini değiştirmeye adapte olmuşlardır. Bu sistemler hücre ölümü, inflamasyon, fagositozun değiştirilmesi ve asıl ilk immün cevapta önemli bir rol oynayabilirler. SPII'yi kodlayan genler epitelyal hücreler ve nötrofil transmigasyonu tarafından makropinositozun indüklenmesinde önemlidir. Bu nedenle gastrointestinal sistem gibi mukozal yüzeylerde patojenik süreç için önemli olabilirler. İlk sonuçlar SPI2'nin makrofaj içerisinde canlılığı ve sistemik patogenezi kapsadığını önermektedir. SPII ve SPI2, patojenik *Salmonella* serotiplerinin büyük bir bölümünde belirli bir bölgede korunmaktadır. Bu da onların *S. enterica* serovar Typhimurium'a ilaveten diğer serotiplerle oluşan infeksiyonların patogeneğinde önemli olduğunu göstermektedir (Collazo ve ark., 1995; Hueck ve ark., 1995; McCormick ve ark., 1995; Mills ve ark., 1995; Pegues ve ark., 1995; Shea ve ark., 1996; Mandell ve ark., 2000).

Gen transkripsiyonunun belirli basamaklarında birçok proteinin sentezini kontrol eden düzenleyici proteinler *Salmonella* patogenezi için temeldir. En iyi çalışılmış örnek PhoP/PhoQ (transkripsiyonel regülatörler)'dur. Bu düzenleyici genler makrofaj içerisinde canlılık, katyonik antimikrobiyal proteinler ve asit pH'ya direnç ve epiteliyal hücrelere invazyon için önemlidir. PhoP/PhoQ tarafından düzenlenen genler bir asit fosfataz, katyon taşıyıcıları ve dış membran proteinlerini kodlar, ayrıca lipopolisakkarit modifikasyonu lipopolisakkarite palmitat, aminoarabinoz ve 2-OH-miristatın ilavesi için önem arz eder. Modifikasyonlar antimikrobiyal katyonik peptidlere karşı direnci destekler ve lipid-A'nın makrofajlar tarafından TNF- α sekresyonunu uyarma yeteneklerini değiştirir. *S. typhi*'nin PhoP/PhoQ mutantları insanlarda avirulandır ve yeni canlı tifoid ateş aşılı için umut vermektedir.

Diğer düzenleyici genler patogenezi de rol almaktadır. Bunlardan *crp/cya* (transkripsiyonel regülatörler) katabolik baskılamayı ve adenilat siklaz aracılığı ile yüzey proteinlerini düzenler. *OmpR/envZ* (transkripsiyonel regülatörler) porin gen transkripsiyonunu; *katF* bir alternatif bakteriyel σ -faktördür ve katalaz üretimini; *ssrAB* sistemik patogenezi de önemli olan SPI2'deki genleri düzenler (Fields ve ark., 1986, 1989; Curtiss ve Kelly, 1987; Dorman ve ark., 1989; Miller ve ark., 1989; Fang ve ark., 1992; Behlau ve Miller, 1993; Gunn ve Miller, 1996; Hohmann ve ark., 1996; Guo ve ark., 1997; Mandell ve ark., 2000).

LPS'in lipid-A komponenti memeli hücreleri için güçlü bir toksindir ve farelerdeki *S. enterica* serovar Typhimurium infeksiyonunda temel bir virulans determinantıdır. Kor polisakkaritlerini ve O-polisakkarit yan zincirini kaybetmiş mutantlar avirulandır. O-polisakkarit yan zincirinin modifikasyonu kompleman-aracılı öldürmeye ve fagositoza direnci artırmaktadır (Mandell ve ark., 2000).

b) Konak faktörleri

Virulans; mikroorganizma ile konağın infeksiyonu sınırlandırma yeteneği arasındaki kompleks bir etkileşimi kapsar. *Salmonella* infeksiyonlarında konak özgüllüğü hastalık için çok önemlidir. Örneğin, *S. typhi* potansiyel olarak insanlarda ölümcül tifoid ateşe neden olabilmektedir fakat, farelerde avirulandır. Bunun tersi olarak, *S. enterica* serovar Typhimurium'un en sık rastlanılan tipleri insanlarda gastroenterite neden olurken, farelerde lethal infeksiyona neden olurlar (O'Brien, 1982; Mandell ve ark., 2000).

Son zamanlarda *Salmonella* infeksiyonuna dirençte IL-12'nin önemi gösterilmiştir. IL-12 reseptöründen yoksun kişiler mikobakteriyel ve *Salmonella* infeksiyonlarına çok duyarlıdır. Bu bulgular intrasellüler bakteriyel infeksiyonların kontrolünde hücre-aracılı

immüitenin önemini göstermektedir. IL-12 Th hücre cevabını ve IFN- γ üretimini indüklediği için, bu ilk immün cevap yolu salmonellozise dirençte çok önemlidir (de Jong ve ark., 1998; Mandell ve ark., 2000).

6. Salmonellozlar

a. *Tifoidal Salmonelloz*

S. typhi'nin etken olduğu, mental konfüzyon, düşmeyen ateş, baş ağrısı, karın ağrısı, relatif bradikardi, splenomegali, lökopeni, bakteriyemi, rozeol denilen deri döküntüleri ile karakterize, insanlara özgü, sistemik bir infeksiyon hastalığıdır. Daha çok gıda ve sularla, fekal-oral bulaşan, bazı ülkelerde endemik olarak bulunan, zaman zaman salgınlara yol açması yanında tedavi edilmezse çeşitli komplikasyonları ile ölümlerle sonuçlanabilen bir hastalıktır (Topçu, 1996).

Tifo hastalığı geçiren kişilerde hem humoral hem de hücrel yanıt gelişir. Kişi ikinci kez tifo basili ile karşılaştığında genellikle tekrar hastalanmaz, ancak antibiyotik tedavisi erken başlanan hastalar ikinci kez tifo geçirebilir. *S. typhi*'nin çeşitli antijenlerine karşı gelişen antikorların koruyuculukta rolü tam olarak bilinmemektedir. Vi antijeni ile yapılan çalışmalar, bu antijene karşı oluşan antikorların koruyuculukta önemli olduğunu göstermiştir. "O" antijenine karşı gelişen intestinal salgısal IgA ve hücrel bağışıklık da koruyuculukta rol oynamaktadır (Topçu, 1996).

Tifo hastalığının antimikrobiyal tedavisinde eskiden beri kullanılan ilaçlar tercih sırasına göre kloramfenikol, ampisilin (amoksisilin) ve trimetoprim/sulfametoksazol'dür. Bu ilaçlara direnç gelişimi başta olmak üzere çeşitli nedenlerle tifo tedavisinde son yıllarda yeni antibakteriyel ilaçlar kullanılmaya başlanmıştır. Bu yeni ilaçlar; kinolonlar, üçüncü kuşak sefalosporinler ve bir ölçüde de aztreonamdır (Topçu, 1996).

b) *Nontifoidal Salmonellozlar*

1994'de *S. enterica* serovar Typhimurium ve *S. enteritidis* insanlardan en sık izole edilen alt tiplerdir. Nontifoidal *Salmonella*'lar çok sıklıkla karşılaşılan etken değillerdir fakat, gelişmekte olan ülkelerde taşıyıcılarda ve yetişkin çocuklarda diyarenin önemli bir bölümünü oluşturmaktadırlar. Salmonellozların insidansı besin zehirlenmelerinin artış gösterdiği Mayıs-Ekim dönemlerinde ve tropikal iklimli bölgelerdeki yağışlı dönemlerde en üst düzeye çıkmaktadır (Mandell ve ark., 2000).

İnsanlarda, nontifoidal *Salmonella* infeksiyonları çoğu zaman yiyecek kaynaklıdır. Hayvan kaynaklı ve günlük yiyeceklerin *Salmonella*'lar ile kontamine olması sonucu oluşmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde, nontifoidal salmonellozların oluşumu sıklıkla

kümes hayvanları ve yumurtaların tüketimi ile birlikte fakat, taşıyıcıların büyük bir kısmı insanlara transmisyonunda önemlidir (Mandell ve ark., 2000).

İnsan nontifoidal *Salmonella* izolatları arasındaki antimikrobiyal direnç dünyada artış göstermektedir ve muhtemelen bu direnç artışı febril sendromların ampirik tedavisi için antimikrobiyal ajanların yaygın olarak kullanılmasına bağlıdır. Ampisiline, kloramfenikole ve trimetoprim-sulfometaksazole yüksek direnç oranları (>%50) Afrika, Asya ve Güney Amerika'dan rapor edilmektedir. Klinik olarak kullanışlı antimikrobiyal ajanlara karşı çoklu *Salmonella* direnci gelişmekte olan ülkelerde önemli ve acil bir sorun olmaktadır. Dirençli bakteri ile infekte kişilerde sistemik infeksiyon oluşma olasılığı duyarlı bakteri ile infekte kişilerden daha fazladır. Transfer edilebilen direnç plazmidlerinin çeşitliliği çok ilaca dirençli nontifoidal *Salmonella* suşlarında gösterilmektedir. Direnç plazmidlerinin bu çeşitliliği enterik bakteriyel türler arasında direncin iç transferi için önemlidir (Zoukh, 1988; Kariuki ve ark., 1996; Mandell ve ark., 2000).

Son zamanlarda, İngiltere'de çok ilaca dirençli başka bir *S. enterica* serovar Typhimurium suşu görülmüştür ve bu suş faj tip 104 (DT104) olarak tanımlanmıştır. DT104 (definitive type) suşu ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfonamidler ve tetrasikline karşı dirençlidir. İngiltere'de *S. enteritidis* PT4 (phage type)'den sonra en sık izole edilen ikinci *Salmonella* izolatıdır. DT104 suşunun trimetoprim ve florokinolonlara dirençli olması da önem arz etmektedir. İngiltere ve Galler Ülkesi'nde DT104 suşlarının kazanılması hasta çiftlik hayvanları ile temas ve çeşitli et ürünlerine maruz kalma ile birlikte. DT104 ile oluşan infeksiyonun mortalite ve morbiditesi duyarlı *S. enterica* serovar Typhimurium ile oluşan infeksiyona göre daha fazladır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yukarıda belirtilen beş antibiyotiğe dirençli *S. enterica* serovar Typhimurium izolatlarının prevalansı 1979-1980'de % 1'den az iken, 1996'da %34'e yükselmiştir. Pulsed-field jel elektroforezi ile bu suşların çoğunun faj tip DT104 olduğu gösterilmiştir (Wall ve ark., 1995; Glynn ve ark., 1998; Mandell ve ark., 2000).

Gelişmiş ve Arjantin, Türkiye, Cezayir ve Hindistan gibi gelişmekte olan ülkelerde 3. kuşak sefalosporinlere dirençli nontifoidal *Salmonella*'ların neden olduğu salgın ve sporadik vakalar bildirilmektedir. 3. kuşak sefalosporinlere direnç plazmid tarafından kodlanan ve transfer edilebilen genişlemiş spektrumlu β -laktamazlara (sefotaksimaz) bağlanmaktadır. Son zamanlarda karbapenem dirençli suşlar da rapor edilmektedir (Poupart ve ark., 1991; Bauernfeind ve ark., 1992; Wattal ve ark., 1994; Barguelli ve ark., 1995; Vahaboğlu ve ark., 1995; Mandell ve ark., 2000).

gyrA ve *gyrB* DNA giraz genlerinde oluşan mutasyonlar sonucu meydana gelen kinolon direnci insan ve hayvan *Salmonella* suşları arasında meydana gelmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1994-1995 yılları arasında 4008 *Salmonella* izolatu test edilmiş ve nalidiksik aside % 0.5, siprofloksasine % 0.02 oranında direnç saptanmıştır. Buna karşılık, İngiltere'de kinolon direnci insidansı 1993'de % 0'dan 1996'da % 14'e yükselmiştir. Bu artış, İngiltere'de 1993 yılında hayvanlarda kullanılmak üzere bir kinolon olan enrofloksasinine lisans verilmesi ile aynı zamana rastlamaktadır (Heisig, 1993; Reyna ve ark., 1995; Griggs ve ark., 1996; Herikstad ve ark., 1997; Threlfall ve ark., 1996; Mandell ve ark., 2000).

7. Nontifoidal salmonellozisin tedavisi

Salmonella gastroenteritleri genellikle kendi kendini sınırlar. Bu yüzden tedavi sıvı ve elektrolit kaybının giderilmesine yöneliktir. Komplike olmayan *Salmonella* gastroenteritlerinde kısa süreli veya tek doz oral kinolonlar, amoksisilin veya trimetoprim-sülfometoksazol tedavisinin semptomların veya dışkı taşıyıcılığının azalmasına bir katkı sağlamadığı görülmüştür. Bu nedenle komplike olmayan *Salmonella* gastroenteritlerinde rutin olarak antimikrobiyal tedavi önerilmemektedir (Mandell ve ark., 2000).

Salmonella gastroenteritli hastaların %5'inden daha azında bakteriyemi gelişmesine rağmen, asıl hastalar invaziv infeksiyonlar için artmış bir risk altındadır ve bunlarda öncelikli olarak antimikrobiyal tedavi faydalı olabilir (Mandell ve ark., 2000).

S. enterica serovar Typhimurium hücre içi bir patojen olduğu için tedavisinde makrofaj içine geçişi iyi olan antibiyotikler seçilmelidir. Özellikle kinolon grubu antibiyotiklerin makrofaj içerisine geçişi çok iyidir. Bu grubun antibakteriyel etkinliği DNA'nın süper sarmal oluşturması için gerekli DNA giraz enziminin inhibisyonu ile gerçekleşir. Hücre içi geçişi olduğu bilinen diğer grup ise beta-laktamlardır. Beta-laktamlar etkilerini hücre duvar sentezini inhibe ederek sağlarlar (Balland ve ark., 1996; Schüler ve ark., 1997; Ustaçelebi, 1999b; Ekinci, 1999).

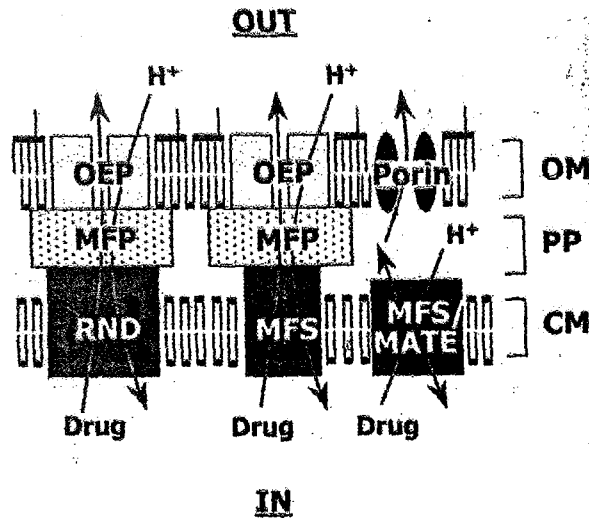
8. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'da kinolon direnç mekanizmaları

Gram-negatif bakterilerde kinolonlara direnç genellikle iki mekanizma ile gelişir. İlki, kinolonların bakteriyel hedeflerindeki genlerde (DNA giraz (GyrA) ve topoizomerez IV (ParC)) mutasyon oluşmasıdır. İkincisi, antibiyotiğin efflux pompası aracılığıyla aktif olarak hücre dışına atılmasıdır (Poole, 2000).

Efflux pompasına bağlı direnç gelişimi ilk olarak 1980'lerin başında rapor edilmiştir. Daha sonraları pompa ile ilgili determinantların çoğu klonlanmış ve tanımlanmıştır. Bakterilerdeki efflux pompası taşıyıcılar 4 süperfamiliya içerisinde

gruplandırılmıştır. Bu gruplama, aminoasit dizilerindeki homoloji baz alınarak yapılmıştır. Bu familyalar; major kolaylaştırıcı süperfamilya (MFS), ATP-bağlayan kaset familya, resistance-nodulation-division familya (RND), küçük multidrug resistans protein familyası (SMR)'dir. Son zamanlarda, beşinci bir familya olarak multidrug ve toksik bileşiklerin çıkarıldığı familya (MATE) tanımlanmıştır. Antibiyotik efflux pompaları RND, MFS veya MATE grupları içerisinde yer alır ve hücreden antibiyotiğin atılması için proton hareket gücünden elde edilen enerjiyi harcar. RND familyasına ait taşıyıcılar gram-negatif bakteriye bağlanır ve periplazmik membran füzyon proteini (MFP) (periplazmik efflux proteini olarak da adlandırılır) ve bir dış membran proteini (dış membran efflux proteini olarak (OEP) da adlandırılır) ile birlikte çalışır (Poole, 2000).

Efflux mekanizmasının neden olduğu kinolon direnci bir çok gram-negatif bakteride rapor edilmiştir. Bunlar; *Burkholderia cepacia*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacterioides fragilis*. *S. enterica serovar Typhimurium*'da AcrA (MFP familyasında) ve AcrB (RND familyasında) efflux sistemleri bildirilmiştir. Bu sistemlerin substratları antibiyotikler, boyalar ve deterjanlardır. Gram-negatif bakterilerdeki efflux pompasının şematik bir şekli aşağıda sunulmuştur (Poole, 2000).



Şekil 6. Gram-negatif bakterilerdeki efflux pompasının şematik bir şekli (Poole, 2000'den).

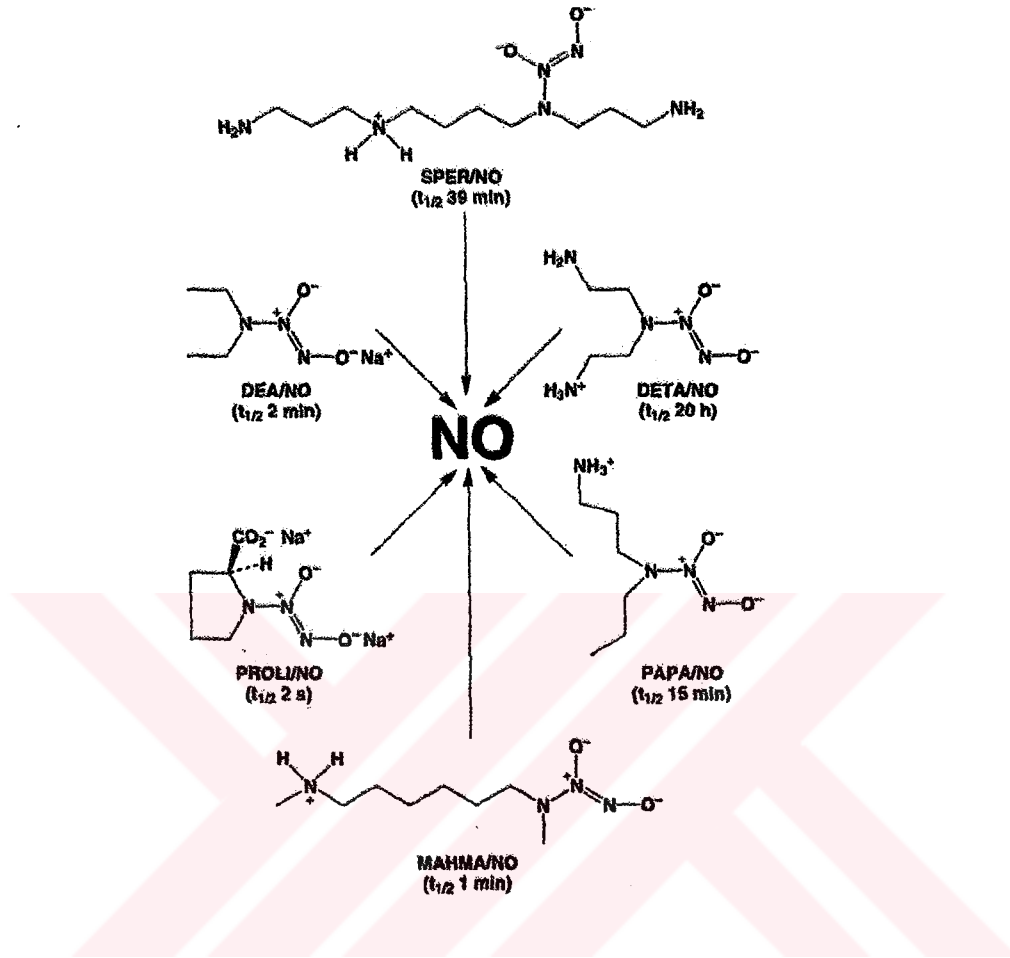
D. DIAZENIUMDIOLATE'LER

Diazeniumdiolate'ler $[N(O)NO]^-$ fonksiyonel grubunu içeren kimyasal maddelerdir. Bu yapısal ünitenin taşıdığı bileşiklerin biomedikal araştırmalar ve klinik kullanımı ile ilgili yaklaşımlar artmaktadır. Bunun asıl temeli, bu bileşiklerin çoğunun sıvı ortamlarda ve lokal pH değişikliklerine yanıt olarak kendiliğinden önemli bioregülatör maddeleri ve NO'yu salmak için ayrışmalarıdır. En önemli özellikleri elektron transferi veya redoks reaktivasyonu gerektirmemeleridir. Oysa ki, NO kaynağı olarak gliseril trinitrat veya sodyum nitroprussid için elektron transferi veya redoks reaktivasyonu gerekmektedir (McElhane-Feser ve ark., 1998; Fitzhugh ve Keefer, 2000).

NO araştırmaları için diazeniumdiolate'lerin diğer NO salan kimyasal maddelere göre 4 avantajı vardır. Bunlar;

1. Salınan NO miktarı bilinir. Bireysel olarak diazeniumdiolateler sabit pH'da, kinetik olarak iyi bir tavırda NO üretimi için ayrışmaya eğilim gösterirler.
2. NO üretimleri çok fazladır. Yarı ömürleri 2 sn- 20 saattir.
3. NO kendiliğinden salınır. Çoğu diazeniumdiolate redoks aktivasyonu olmaksızın NO salar. Bu olay tioller veya diğer redoks aktif ajanların yokluğuna nispeten duyarsızdır.
4. Çoğu diazeniumdiolate redoks aktivasyonuna karşı direnç gösterse de yine de, NO⁻, NO₂, ONOO⁻ ve NO⁺ donörlerinin güvenilir kaynakları olarak kullanılır.

NO salan diazeniumdiolateler şunlardır; DETA-NO ((Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate), SPER-NO, DEA-NO, PROLI-NO, PAPA-NO, MAHMA-NO (Fitzhugh ve Keefer, 2000). Bu maddelerin kimyasal yapıları ve yarılanma ömürleri Şekil 7'de sunulmuştur.



Şekil 7. NO salan diazeniumdiolateler ve yarılanma süreleri
(Fitzhugh ve Keefer, 2000'den).

III. MATERYAL VE METOD

A. Bakteri izolatları

Çalışmada 15 *S. enterica* serovar Typhimurium klinik izolatu kullanılmıştır. Klinik izolatlar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Birsal ERDEM'den temin edilmiştir. Klinik izolatların bakteriyolojik tanımlanması da aynı merkezde yapılmıştır. Standart suş olarak *S. typhimurium* SZH KUEN 557 suşu kullanılmıştır. Standart suş, KÜKENS (İstanbul Tıp Fakültesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi)'den temin edilmiştir.

B. Bakteri inokülümünün hazırlanması

Saklama besiyerlerindeki izolatlardan Eosin Metilen Blue (EMB) agarda bir gecelik taze kültürler hazırlanmıştır. Her izolatu 0.5 Mc Farland ($0.5 \cdot 10^8$ basil/ml) bulanıklığında bakteri solüsyonları hazırlanmıştır. Bu solüsyonlardan 1:100 oranında dilüsyonlar hazırlanıp, inokülüm kaynağı olarak kullanılmıştır.

C. Antimikrobiyal ajanların hazırlanması

Çalışmada kullanılan antimikrobiyal ajanlardan ofloksasin "Hoechst Marion Roussel"den, siprofloksasin "Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti."den, pefloksasin "Eczacıbaşı Rhone Poulenc"den, ampisilin ve ampisilin/sulbaktam "Mustafa Nevzat İlaç San. A.Ş."den temin edilmiştir. Bu antimikrobiyal ajanların 4096 µg/ml'lik stok solüsyonları hazırlanarak kullanılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

Çalışmada, NO kaynağı olarak DETA-NO ((Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazin-1-ium-1,2-diolate) kullanılmıştır. DETA-NO saf etken maddesi Frederick Kanser Araştırma Enstitüsü'nden Prof. Dr. Joseph A. Hrabie ve Prof. Dr. Lary Keefer tarafından hediye edilmiştir. DETA-NO etken maddenin hediye edildiği enstitünün bilgileri doğrultusunda 0.1 N NaOH ile çözülerek ve son konsantrasyonu 16 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. DETA-NO çalışmanın yapıldığı aynı günde taze olarak hazırlanmıştır.

D. Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğinin saptanması

Çalışmada antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğini ölçmede mikrodilüsyon dama tahtası (checkerboard) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem antibiyotik kombinasyonlarının ölçülmesinde kolay ve sonuçları yorumlamak için kullanılan matematiksel hesaplamaların basit olması nedeniyle tercih edilmiştir (Koneman ve ark., 1997; Bal, 1999).

Bu yöntemde 96 kuyucuklu steril mikroplaklar kullanılmıştır. Her bakteri ve buna karşı denenecek kombinasyon için bir mikroplak paneli gereklidir. Kombinasyon testi için antibiyotiklerin tek tek stok solüsyonlarının hazırlanması ve buradan ayrı tüplerde çift kat seri dilüsyonlarının yapılması gerekir. Antibiyotiklerin kombine etkilerinin deneneceği her kuyucukta her iki antibiyotik eşit miktarda bulunur. Bu nedenle antibiyotiklerin istenen son konsantrasyonlarının elde edilmesi için tüpte bu konsantrasyonların iki katı hazırlanmıştır (Koneman ve ark., 1997; Bal, 1999).

Tüpte hazırlanan her iki antibiyotik solüsyonundan kombinasyon denenecek kuyucuğa 50'şer µl aktarıldığı için, test kuyucuğundaki son hacim 100 µl'dir. Her mikroplak panelinde ilk yatay sıra (A2-A12) ve ilk dikey sütun (A1-H1) kuyucukları antibiyotiklerin tek başlarına, diğer kuyucuklar ise kombinasyonlardaki MİK'lerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Koneman ve ark., 1997; Bal, 1999).

Kombinasyona giren her antibiyotiğin, o mikroorganizma için bilinen veya beklenen MİK değerinin en az iki, tercihen sekiz katına kadar olan dilüsyonları kullanılmıştır. Her bir kuyucuktaki bakteri sayısı 5×10^4 CFU/100 µl olarak ayarlanmıştır. Antibiyotik dilüsyonları bakteri süspansiyonunda kullanılan besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır (Koneman ve ark., 1997; Bal, 1999).

Her plakta iki kontrol kuyucuğu bulunur: üreme kontrolü; H12 ve sterilite kontrolü; G12. H12 antibiyotik içermez ve bu kuyucukta testin okunması sırasında yoğun bulanıklık görülmelidir. G12'de ise herhangi bir üremenin görülmemesi gerekir. Kombinasyon testinin plakta çalışma yöntemi Tablo 5'de görülmektedir (Koneman ve ark., 1997; Bal, 1999).

Tablo 5. Kombinasyon etkisi denenecek a ve b antibiyotiklerinin paneldeki son kombinasyon-dilüsyonları (µg/ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		a1	a2	a4	a8	A16	a32	A64	a128	A256	a512	a1024
B	b1	a1 + b2	a2 + b2	a4 + b2	a8 + b2	A16 + b2	a32 + b2	a64 + b2	a128 + b2	A256 + b2	a512 + b2	a1024 + b2
C	b4	a1 + b4	a2 + b4	a4 + b4	a8 + b4	A16 + b4	a32 + b4	a64 + b4	a128 + b4	A256 + b4	a512 + b4	a1024 + b4
D	b8	a1 + b8	a2 + b8	a4 + b8	a8 + b8	A16 + b8	a32 + b8	a64 + b8	a128 + b8	A256 + b8	a512 + b8	a1024 + b8
E	b16	a1 + b16	a2 + b16	a4 + b16	a8 + b16	A16 + b16	a32 + b16	a64 + b16	a128 + b16	A256 + b16	a512 + b16	a1024 + b16
F	b32	a1 + b32	a2 + b32	a4 + b32	a8 + b32	A16 + b32	a32 + b32	a64 + b32	a128 + b32	A256 + b32	a512 + b32	a1024 + b32
G	b64	a1 + b64	a2 + b64	a4 + b64	a8 + b64	A16 + b64	a32 + b64	a64 + b64	a128 + b64	A256 + b64	a512 + b64	SK
H	b128	a1 + b128	a2 + b128	a4 + b128	a8 + b128	A16 + b128	a32 + b128	a64 + b128	a128 + b128	A256 + b128	a512 + b128	ÜK

SK: sterilite kontrolü; ÜK: Üreme kontrolü

ZC FÜSLEKÇERLİK KURULU
DOĞU HANGİREKİM MERKEZİ

E. Sonuçların değerlendirilmesi

Sonuçların yorumu için önce her iki antibiyotiğin ayrı ayrı fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FİK) değerleri hesaplanır:

$$FİK_a = \frac{\text{a antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri}}{\text{a antibiyotiğinin tek başına MİK değeri}}$$

$$FİK_b = \frac{\text{b antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri}}{\text{b antibiyotiğinin tek başına MİK değeri}}$$

$$FİK \text{ indeksi } (\sum FİK) = FİK_a + FİK_b$$

$\sum FİK \leq 0.5$ ise sinerjist

$> 0.5 - 4 \leq$ ise aditif veya indiferan

> 4 ise antagonist etki şeklinde yorumlanır (Koneman ve ark., 1997; Bal, 1999)

F. Dama tahtası (Checkerboard) yönteminin uygulanması

Çalışmada 96 kuyucuklu plaklar ve besiyeri olarak Müller Hinton broth (MHB) kullanılmıştır. Plakların ilk 2-12 numaraya gösterilen yatay kuyucuklarında ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin, ampisilin ve ampisilin/sulbaktam antibiyotiklerinin; A-H harfleriyle gösterilen dikey kuyucuklarda ise DETA-NO'nun MİK'leri saptanmıştır. DETA-NO'nun MİK'lerinin belirlenmesi için 8-0.06 mg/ml'lik konsantrasyonlar kullanılmıştır. Antibakteriyel ajanlar için kullanılan konsantrasyon aralıkları: ofloksasin, siprofloksasin ve pefloksasin için 4-0.003 µg/ml, ampisilin için 2048-2 µg/ml ve ampisilin/sulbaktam için ise 512-0.5 µg/ml'dir (Tablo 6-8).

Dama tahtası testinin uygulanmasında kinolon grubu ajanlar 2. sıranın 12. kuyucuğunda 4 µg/ml konsantrasyondan başlayarak iki kat seri dilüsyonlarla 2. kuyucuğa kadar dilüe edilmiştir. Çalışmada dilüsyon sonrasında kinolonlar için antibiyotik konsantrasyon aralığı 4-0.003 µg/ml, ampisilin için 2048-2 µg/ml ve ampisilin/sulbaktam için

ise 512-0.5 µg/ml olarak ayarlanmıştır. DETA-NO için 2. sıranın H kuyucuğundan başlayarak benzer şekilde iki kat seri dilüsyonlarla son konsantrasyonlara (4-0.06 mg/ml) ulaşılmıştır. Hazırlanan tüm plaklarda H12 kuyucuğu herhangi bir antibakteriyel ajan içermeyen kontrol ve G12 kuyucuğu ise sterilit kontrolü olarak kullanılmıştır (Tablo 6-8).

Bu şekilde plaklar hazırlandıktan sonra her kuyucuğa hazırlanan bakteri inokülümünden (yaklaşık 5×10^4 bakteri/ml) 10 µl inoküle edilmiştir. Daha sonra plaklar 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında sonuçlar görsel olarak değerlendirilmiştir. Antibakteriyel ajanların tek başlarına ve kombine halde MİK değerleri üremenin olmadığı en son kuyucuk olarak rapor edilmiştir. Çalışmada tüm testler iki kez yapılmıştır.

G. Dama tahtası kombinasyon testinin kontrolü

Bu amaçla, daha önceden *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı sinerjistik etkinliği gösterilmiş olan siprofloksasin ve ampisilin antibiyotikleri kullanılmıştır. Yukarıda bahsedildiği gibi 2 adet *S. aureus* klinik izolatına karşı kombinasyon testi uygulanmıştır.

E. Escherichia coli için DETA-NO ile kinolon ve penisilin türevi antibiyotiklerin kombinasyon testinin uygulanması

Bu amaçla 3 adet *E. coli* klinik izolatı kullanılmıştır. Yukarıda bahsedilen kombinasyon testi için Tablo 6-8'de belirtilen konsantrasyonlarda antibakteriyel ajanlar kullanılarak test uygulanmıştır.

Tablo 6. *S. enterica* serovar Typhimurium ve *E. coli* için kombinasyon etkisi denenecek DETA-NO (mg/ml) ve kinolon antibiyotiklerinin ($\mu\text{g/ml}$) paneldeki son kombinasyon-dilüsyonları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik
A	0.06 (DETA-NO)	0.003 (kinolonlar)	0.007 (kinolonlar)	0.015 (kinolonlar)	0.03 (kinolonlar)	0.06 (kinolonlar)	0.125 (kinolonlar)	0.25 (kinolonlar)	0.5 (kinolonlar)	1 (kinolonlar)	2 (kinolonlar)	4 (kinolonlar)
B	0.125 (DETA-NO)	0.06 / 0.003	0.06 / 0.007	0.06 / 0.015	0.06 / 0.03	0.06 / 0.06	0.06 / 0.125	0.06 / 0.25	0.06 / 0.5	0.06 / 1	0.06 / 2	0.06 / 4
C	0.25 (DETA-NO)	0.125 / 0.003	0.125 / 0.007	0.125 / 0.015	0.125 / 0.03	0.125 / 0.06	0.125 / 0.125	0.125 / 0.25	0.125 / 0.5	0.125 / 1	0.125 / 2	0.125 / 4
D	0.5 (DETA-NO)	0.25 / 0.003	0.25 / 0.007	0.25 / 0.015	0.25 / 0.03	0.25 / 0.06	0.25 / 0.125	0.25 / 0.25	0.25 / 0.5	0.25 / 1	0.25 / 2	0.25 / 4
E	1 (DETA-NO)	0.5 / 0.003	0.5 / 0.007	0.5 / 0.015	0.5 / 0.03	0.5 / 0.06	0.5 / 0.125	0.5 / 0.25	0.5 / 0.5	0.5 / 1	0.5 / 2	0.5 / 4
F	2 (DETA-NO)	1 / 0.003	1 / 0.007	1 / 0.015	1 / 0.03	1 / 0.06	1 / 0.125	1 / 0.25	1 / 0.5	1 / 1	1 / 2	1 / 4
G	4 (DETA-NO)	2 / 0.003	2 / 0.007	2 / 0.015	2 / 0.03	2 / 0.06	2 / 0.125	2 / 0.25	2 / 0.5	2 / 1	2 / 2	2 / 4
H	8 (DETA-NO)	4 / 0.003	4 / 0.007	4 / 0.015	4 / 0.03	4 / 0.06	4 / 0.125	4 / 0.25	4 / 0.5	4 / 1	4 / 2	4 / 4

SK: Sterilitate kontrolü; ÜK: Üremekontrolü

Tablo 7. *S. enterica* serovar Typhimurium ve *E. coli* için kombinasyon etkisi denenecek DETA-NO (mg/ml) ve ampisilin ($\mu\text{g/ml}$) paneldeki son kombinasyon-dilüsyonları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik
A	0.06 (DETA-NO)	2 (ampisilin)	4 (ampisilin)	8 (ampisilin)	16 (ampisilin)	32 (ampisilin)	64 (ampisilin)	128 (ampisilin)	256 (ampisilin)	512 (ampisilin)	1024 (ampisilin)	2048 (ampisilin)
B	0.125 (DETA-NO)	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
C	0.25 (DETA-NO)	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
D	0.5 (DETA-NO)	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
E	1 (DETA-NO)	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
F	2 (DETA-NO)	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
G	4 (DETA-NO)	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
H	8 (DETA-NO)	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048

SK: Sterilite kontrolü; ÜK: Üreme kontrolü

Tablo 8. *S. enterica* serovar Typhimurium ve *E. coli* için kombinasyon etkisi denenecek DETA-NO (mg/ml) ve ampisilin/sulbaktam ($\mu\text{g/ml}$) paneldeki son kombinasyon-dilüsyonları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik	DETA-NO / antibiyotik
A	0.06 (DETA-NO)	0.5 (ampisilin/ sulbaktam)	1 (ampisilin/ sulbaktam)	2 (ampisilin/ sulbaktam)	4 (ampisilin/ sulbaktam)	8 (ampisilin/ sulbaktam)	16 (ampisilin/ sulbaktam)	32 (ampisilin/ sulbaktam)	64 (ampisilin/ sulbaktam)	128 (ampisilin/ sulbaktam)	256 (ampisilin/ sulbaktam)	512 (ampisilin/ sulbaktam)
B	0.125 (DETA-NO)	0.06 / 0.5	0.06 / 1	0.06 / 2	0.06 / 4	0.06 / 8	0.06 / 16	0.06 / 32	0.06 / 64	0.06 / 128	0.06 / 256	0.06 / 512
C	0.25 (DETA-NO)	0.125 / 0.5	0.125 / 1	0.125 / 2	0.125 / 4	0.125 / 8	0.125 / 16	0.125 / 32	0.125 / 64	0.125 / 128	0.125 / 256	0.125 / 512
D	0.5 (DETA-NO)	0.25 / 0.5	0.25 / 1	0.25 / 2	0.25 / 4	0.25 / 8	0.25 / 16	0.25 / 32	0.25 / 64	0.25 / 128	0.25 / 256	0.25 / 512
E	1 (DETA-NO)	0.5 / 0.5	0.5 / 1	0.5 / 2	0.5 / 4	0.5 / 8	0.5 / 16	0.5 / 32	0.5 / 64	0.5 / 128	0.5 / 256	0.5 / 512
F	2 (DETA-NO)	1 / 0.5	1 / 1	1 / 2	1 / 4	1 / 8	1 / 16	1 / 32	1 / 64	1 / 128	1 / 256	1 / 512
G	4 (DETA-NO)	2 / 0.5	2 / 1	2 / 2	2 / 4	2 / 8	2 / 16	2 / 32	2 / 64	2 / 128	2 / 256	SK
H	8 (DETA-NO)	4 / 0.5	4 / 1	4 / 2	4 / 4	4 / 8	4 / 16	4 / 32	4 / 64	4 / 128	4 / 256	ÜK

SK: Sterilite kontrolü; ÜK: Üreme kontrolü

IV. BULGULAR

a) DETA-NO, ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin, ampisilin ve ampisilin/sulbaktamın *S. enterica* serovar Typhimurium suşları için belirlenen MİK değerleri Tablo 9'da sunulmuştur.

Tablo 9. DETA-NO, ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin, ampisilin ve ampisilin/sulbaktamın *S. enterica* serovar Typhimurium suşları için MİK değerleri

Stan. Suş	MİK-no (mg/ml)	MİK-ofx (µg/ml)	MİK-sip (µg/ml)	MİK-pef (µg/ml)	MİK-amp (µg/ml)	MİK-sul (µg/ml)
1	1	0.06	0.03	0.125	1	1
2	2	0.125	0.007	0.125	512	128
3	2	0.06	0.015	0.125	512	64
4	2	0.06	0.007	0.06	512	128
5	2	0.06	0.007	0.125	512	64
6	2	0.06	0.007	0.06	512	128
7	2	0.03	0.007	0.06	512	128
8	2	0.06	0.007	0.125	512	128
9	2	0.06	0.007	0.06	512	128
10	2	0.06	0.015	0.06	512	128
11	2	0.06	0.007	0.06	512	64
12	2	0.06	0.007	0.125	512	128
13	2	0.03	0.007	0.06	512	128
14	2	0.06	0.015	0.06	512	64
15	2	0.06	0.015	0.06	512	128

Stan. suş: standart suş; no: DETA-NO; ofx: ofloksasin; sip: siprofloksasin; pef: pefloksasin; amp: ampisilin; sul: ampisilin/sulbaktam

DETA-NO'nun standart suş ve bir klinik izolata karşı MİK değeri 1 mg/ml bulunmuş iken, diğer klinik izolatlar için MİK değeri 2 mg/ml'dir. Ofloksasin için elde edilen MİK değerleri 0.03-0.125 µg/ml aralığındadır. 2 izolat için 0.03 µg/ml, 12 izolat

için 0.06 µg/ml ve bir izolat için ise 0.125 µg/ml'dir. Siprofloksasin MİK aralığı 0.007-0.015 µg/ml arasındadır. 4 izolat için 0.015 µg/ml ve diğerleri için 0.007 µg/ml olarak saptanmıştır. Pefloksasin MİK aralığı ise 0.06-0.125 µg/ml'dir. 6 izolatta 0.125 µg/ml ve diğerlerinde 0.06 µg/ml'dir. Ampisiline karşı tüm izolatlar dirençli (tüm izolatların MİK değeri 512 µg/ml) bulunurken, standart suşun MİK değeri 1 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Ampisilin/sulbaktama karşı 10 izolatta MİK değeri 128 µg/ml iken, diğerlerinde 64 µg/ml'dir. Standart suşun MİK değeri ise 1 µg/ml'dir.

b) Ofloksasin ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi Tablo 10'da sunulmuştur.

Tablo 10. Ofloksasin ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi

	MİK-no (mg/ml)	MİK-ofx (µg/ml)	MİK-kno (mg/ml)	MİK-kofx (µg/ml)	FIX	sonuç
Stan. Suş	1	0.06	0.5	0.06	1.5	add veya ind
1	1	0.06	0.5	0.06	1.5	add veya ind
2	2	0.125	0.5	0.125	1.25	add veya ind
3	2	0.06	0.5	0.125	2.33	add veya ind
4	2	0.06	1	0.125	2.58	add veya ind
5	2	0.06	1	0.125	2.58	add veya ind
6	2	0.06	0.5	0.06	1.25	add veya ind
7	2	0.03	0.5	0.06	2.25	add veya ind
8	2	0.06	0.5	0.06	1.25	add veya ind
9	2	0.06	0.5	0.06	1.25	add veya ind
10	2	0.06	0.5	0.06	1.25	add veya ind
11	2	0.06	0.5	0.06	1.25	add veya ind
12	2	0.06	0.5	0.06	1.25	add veya ind
13	2	0.03	1	0.125	4.6	antagonist
14	2	0.06	0.5	0.06	1.25	add veya ind
15	2	0.06	0.25	0.03	0.625	add veya ind

Stan. suş: standart suş; no: DETA-NO; ofx: ofloksasin; kno: kombine DETA-NO; kofx: kombine ofloksasin; add veya ind: aditif veya indiferan

Tablo 10'da ofloksasin ve DETA-NO'nun *S. enterica* serovar Typhimurium üzerine etkinlikleri incelendiğinde; tüm izolatlar ofloksasine duyarlı bulunmuş ve DETA-NO için MİK değerleri ise 1-2 mg/ml arasında saptanmıştır. Her iki ajanın kombine etkileri incelendiğinde ise, sinerjistik bir etki gözlenmemiştir. 1 izolatta antagonist etki, diğer izolatlarda ise aditif veya indiferan bir etki gözlenmiştir.

c) Tablo 11'de siprofloksasin ve DETA-NO'in tek başlarına ve kombine olarak *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi sunulmuştur.

Tablo 11. Siprofloksasin ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi

Stan. Suş	MİK-no (mg/ml)	MİK-sip (µg/ml)	MİK-kno (mg/ml)	MİK-ksip (µg/ml)	FIX	sonuç
1	1	0.03	0.125	0.015	0.625	add veya ind
2	2	0.007	0.25	0.007	1.25	add veya ind
3	2	0.007	0.25	0.007	1.125	add veya ind
4	2	0.015	0.25	0.007	0.59	add veya ind
5	2	0.007	0.25	0.007	1.125	add veya ind
6	2	0.007	0.25	0.015	2.3	add veya ind
7	2	0.007	0.5	0.015	2.4	add veya ind
8	2	0.007	0.25	0.015	2.3	add veya ind
9	2	0.007	0.25	0.007	1.125	add veya ind
10	2	0.007	0.25	0.007	1.125	add veya ind
11	2	0.015	0.25	0.007	0.6	add veya ind
12	2	0.007	0.25	0.007	1.125	add veya ind
13	2	0.007	0.25	0.007	1.125	add veya ind
14	2	0.007	0.25	0.007	1.125	add veya ind
15	2	0.015	0.25	0.007	0.6	add veya ind
16	2	0.015	0.5	0.007	0.7	add veya ind

Stan. suş: standart suş no; DETA-NO; sip: siprofloksasin; kno: kombine DETA-NO; ksip: kombine siprofloksasin; add veya ind: aditif veya indiferan

Siprofloksasine karşı tüm izolatlar duyarlı bulunmuştur. DETA-NO ile siprofloksasin kombinasyonunda ise, tüm izolatlarda aditif veya indiferan etki tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirinde sinerjistik ve antagonist etki saptanmamıştır.

d) Pefloksasin ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi Tablo 12'de sunulmuştur.

Tablo 12. Pefloksasin ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi

Stan. Suş	MİK-no (mg/ml)	MİK-pef (µg/ml)	MİK-kno (mg/ml)	MİK-kpef (µg/ml)	FIX	sonuç
1	1	0.125	0.25	0.125	1.25	add veya ind
2	2	0.125	0.5	0.06	0.98	add veya ind
3	2	0.125	1	0.125	1.5	add veya ind
4	2	0.125	1	0.125	1.5	add veya ind
5	2	0.06	1	0.25	4.6	antagonist
6	2	0.125	1	0.25	2.5	add veya ind
7	2	0.06	1	0.25	4.6	antagonist
8	2	0.06	1	0.25	4.6	antagonist
9	2	0.125	1	0.25	2.5	add veya ind
10	2	0.06	1	0.25	4.6	antagonist
11	2	0.06	1	0.25	4.6	antagonist
12	2	0.06	1	0.25	4.6	antagonist
13	2	0.125	1	0.125	1.5	add veya ind
14	2	0.06	1	0.25	4.6	antagonist
15	2	0.06	1	0.25	4.6	antagonist

Stan. suş: standart suş no: DETA-NO; kno: kombine DETA-NO; pef: pefloksasin; kpef: kombine pefloksasin; add veya ind: aditif veya indiferan

Tablo 12'de pefloksasine karşı da tüm izolatlar duyarlı bulunmuştur. DETA-NO ile kombinasyonlarında 9 izolatta antagonist etki saptanmış olup diğerleri için ise aditif veya indiferan etki gözlenmiştir.

e) Tablo 13'de ampisilin ve DETA-NO'in tek başlarına ve kombine olarak *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi sunulmuştur.

Tablo 13. Ampisilin ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi

	MİK-no (mg/ml)	MİK-amp (µg/ml)	MİK-kno (mg/ml)	MİK-kamp (µg/ml)	FIX	sonuç
Stan. Suş	1	1	0.5	1	1.5	add veya ind
1	1	512	2	256	2.5	add veya ind
2	2	512	2	256	1.5	add veya ind
3	2	512	0.5	512	1.25	add veya ind
4	2	512	2	512	2	add veya ind
5	2	512	1	256	1	add veya ind
6	2	512	0.5	512	1.25	add veya ind
7	2	512	1	256	1	add veya ind
8	2	512	1	512	1.5	add veya ind
9	2	512	2	512	2	add veya ind
10	2	512	2	512	2	add veya ind
11	2	512	2	512	2	add veya ind
12	2	512	1	256	1	add veya ind
13	2	512	1	512	1.5	add veya ind
14	2	512	1	256	1	add veya ind
15	2	512	1	128	0.75	add veya ind

Stan. suş: standart suş; no: DETA-NO; kno: kombine DETA-NO; amp: ampisilin; kamp: kombine ampisilin; add veya ind: aditif veya indiferan

Ampisiline karşı tüm izolatlar dirençli (MİK= 512 µg/ml), standart suş ise duyarlı (1 µg/ml) bulunmuştur. DETA-NO ile kombinasyonlarında ise, tüm izolatlarda aditif veya indiferan etki gözlenmiş olup sinerjistik bir etki gözlenmemiştir.

f) Ampisilin/sulbaktam ve DETA-NO'in tek başlarına ve kombine olarak *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi Tablo 14'de sunulmuştur.

Tablo 14. Ampisilin/sulbaktam ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi

	MİK-no (mg/ml)	MİK-sul (µg/ml)	MİK-kno (mg/ml)	MİK-ksul (µg/ml)	FIX	sonuç
Stan. Suş	1	1	2	>4	6	antagonist
1	1	128	4	64	4.5	antagonist
2	2	64	4	64	3	add veya ind
3	2	64	4	64	3	add veya ind
4	2	128	4	64	2.5	add veya ind
5	2	64	4	64	3	add veya ind
6	2	128	4	64	2.5	add veya ind
7	2	128	4	64	2.5	add veya ind
8	2	128	2	64	1.5	add veya ind
9	2	128	2	64	1.5	add veya ind
10	2	128	4	64	2.5	add veya ind
11	2	64	1	64	1.5	add veya ind
12	2	128	4	64	2.5	add veya ind
13	2	128	4	64	2.5	add veya ind
14	2	64	4	64	3	add veya ind
15	2	128	4	64	2.5	add veya ind

Stan. suş: standart suş; no: DETA-NO; kno: kombine DETA-NO; sul: ampisilin/sulbaktam; ksul: kombine ampisilin/sulbaktam; add veya ind: aditif veya indifera

Tüm izolatlarda ampisilin/sulbaktama karşı da tüm izolatlar dirençli (64-128 µg/ml) bulunmuş olup, standart suş ise duyarlıdır (1 µg/ml). DETA-NO ile kombinasyonunda standart suş ve bir klinik izolat için antagonist etki bulunmuştur. Diğer izolatlar için aditif veya indifera etki saptanmıştır. Sinerjistik bir etki gözlenmemiştir.

g) Tablo 15'de siprofloksasin ve ampisilin tek başlarına ve kombine olarak *S. aureus* suşlarına karşı etkilerinin değerlendirilmesi görülmektedir.

Tablo 15. Siprofloksasin ve ampisilin tek başlarına ve kombine olarak *S. aureus* suşlarına karşı etkilerinin değerlendirilmesi

	MİK-sip (µg/ml)	MİK-amp (µg/ml)	MİK-ksip (µg/ml)	MİK-kamp (µg/ml)	FIX	sonuç
1	0.125	16	0.03	0.5	0.27	sinerji
2	0.5	2	0.125	0.06	0.28	sinerji

sip: siprofloksasin; amp: ampisilin; ksip: kombine siprofloksasin; kamp: kombine ampisilin

Çalışmada kontrol amacıyla kullanılan *S. aureus* klinik izolatlarına karşı siprofloksasin ve ampisilin kombinasyonlarında beklendiği gibi sinerjistik etki saptanmıştır.

h) Ofloksasin ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *E. coli* suşlarına karşı etkilerinin değerlendirilmesi Tablo 16'da sunulmuştur.

Tablo 16. Ofloksasin ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *E. coli* suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi

	MİK-no (mg/ml)	MİK-ofx (µg/ml)	MİK-kno (mg/ml)	MİK-kofx (µg/ml)	FIX	sonuç
1	2	0.03	0.5	0.06	2.25	add veya ind
2	1	0.06	1	0.06	2	add veya ind
3	4	0.03	1	0.06	2.25	add veya ind

no: DETA-NO; ofx: ofloksasin; kno: kombine DETA-NO; kofx: kombine ofloksasin; add veya ind: aditif veya indiferan

Üç tane *E. coli* suşu ofloksasine karşı duyarlı bulunmuş olup, DETA-NO'nun MİK değerleri de 1-4 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Üç suşun tümünde aditif veya indiferan bir etki gözlenmiştir.

ı) Tablo 17'de siprofloksasin ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *E. coli* suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi sunulmuştur.

Tablo 17. Siprofloksasin ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *E. coli* suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi

	MİK-no (mg/ml)	MİK-sip (µg/ml)	MİK-kno (mg/ml)	MİK-ksip (µg/ml)	FIX	sonuç
1	2	0.007	0.5	0.015	2.29	add veya ind
2	1	0.007	0.5	0.015	2.64	add veya ind
3	4	0.007	0.5	0.015	2.265	add veya ind

no: DETA-NO; sip: siprofloksasin; kno: kombine DETA-NO; ksip: kombine siprofloksasin; add veya ind: aditif veya indiferan

Tablo 17'de görüldüğü gibi tüm suşlar siprofloksasine duyarlı bulunmuştur. Kombinasyon testinde 3 suşta da aditif veya indiferan etki gözlenmiştir.

i) Tablo 18'de pefloksasin ve DETA-NO'nun *E. coli* suşlarına karşı kombine etkilerinin sonuçları verilmiştir.

Tablo 18. Pefloksasin ve DETA-NO'nun tek başlarına ve kombine olarak *E. coli* suşlarına etkilerinin değerlendirilmesi

	MİK-no (mg/ml)	MİK-pef (µg/ml)	MİK-kno (mg/ml)	MİK-kpef (µg/ml)	FIX	sonuç
1	2	0.06	1	0.25	4.66	antagonist
2	1	0.06	2	0.25	6.16	antagonist
3	4	0.125	2	0.125	1.5	add veya ind

no: DETA-NO; pef: pefloksasin; kno: kombine DETA-NO; kpef: kombine pefloksasin; add veya ind: aditif veya indiferan

Pefloksasin için 2 suşta antagonist etki saptanırken 1 suşta aditif veya indiferan etki gözlenmiştir.

j) Tablo 19'da DETA-NO ve ampisilin kombinasyonunun *E. coli* suşları üzerine etkileri gösterilmiştir.

Tablo 19. DETA-NO ve ampisilin tek başlarına ve kombine olarak *E.coli* suşlarına karşı etkilerinin değerlendirilmesi

	MİK-no (mg/ml)	MİK-amp (µg/ml)	MİK-kno (mg/ml)	MİK-kamp (µg/ml)	FIX	sonuç
1	2	512	1	512	1.5	add veya ind
2	1	512	1	512	1.5	add veya ind
3	4	>512	2	512	1.5	add veya ind

amp: ampisilin; kamp: kombine ampisilin. no: DETA-NO; kno: kombine DETA-NO add veya ind: aditif veya indiferan.

Tablo 19’da görüldüğü gibi tüm suşlarda aditif veya indiferan etki tespit edilmiştir.

k) Tablo 20’de de görüldüğü gibi, ampisilin/sulbaktam için tüm suşlarda aditif veya indiferan etki saptanmıştır.

Tablo 20. DETA-NO ve ampisilin/sulbaktamın tek başlarına ve kombine olarak *E.coli* suşlarına karşı etkilerinin değerlendirilmesi

	MİK-no (mg/ml)	MİK-amp/sul (µg/ml)	MİK-kno (mg/ml)	MİK-kamp/sul (µg/ml)	FIX	sonuç
1	2	64	4	64	3	add veya ind
2	1	64	1	64	3	add veya ind
3	4	256	2	64	0.75	add veya ind

amp/sul: ampisilin/sulbaktam; kamp/sul: kombine ampisilin/sulbaktam. no: DETA-NO; kno: kombine DETA-NO.

V. TARTIŞMA

S. enterica serovar Typhimurium non-tifoidal salmonelloza neden olur ve en sık görülen klinik şekli enterokolittir (Topçu, 1996). *S. enterica* serovar Typhimurium hücre içi bir patojen olduğu için tedavisinde özellikle hücre içi geçişi olan antibiyotikler seçilmelidir. Kinolon grubu antibiyotiklerin hücre içi geçişi çok iyidir ve bu grup ajanlar DNA giraz enziminin inhibisyonu ile etki eder. β -laktam antibiyotiklerin de hücre içine geçtiği bilinmektedir ve etki mekanizmaları hücre duvar sentezinin inhibisyonudur (Schüler ve ark., 1997; Ekinci, 1999; Ustaçelebi, 1999b).

Makrofajlar ve nötrofiller LPS ve MDP ile aktive olduklarında RNIs ve ROIs üretirler. Bu ürünlerin antimikrobiyal etkileri vardır. Aktive olan makrofaj ve nötrofiller NOS enzimi eksprese ederler. Bu enzim, L-arjinini oksidize ederek sitrüllin ve NO üretimini sağlar. NO tek başına antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gibi süperoksid anyonları ile kombine olarak daha etkili antimikrobiyal maddeleri de oluşturabilir. Makrofajların antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili son bulgular bakterilere, mantarlara, helmintlere ve protozoal patojenlere aktivitenin büyük bir kısmının NO ve ondan derive maddelerden kaynaklandığını göstermiştir. Ancak mevcut bilgiler NO'nun mikroorganizmaları öldürme mekanizmasını açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Muhtemelen, hedef hücrelerdeki respiratuvar siklus ve DNA sentezinin anahtar enzimlerindeki demir-içeren bölgelerle NO'nun etkileşimine bağlı olduğu düşünülmektedir (Kuby, 1997).

Bu tez çalışmasında; *S. enterica* serovar Typhimurium izolatları üzerine NO'nun tek başına ve ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin, ampisilin ve ampisilin/sulbaktam ile kombinasyonlarının etkinliği araştırılmıştır. Çalışmamızda kullanılan 15 klinik izolatın tümü ofloksasin, siprofloksasin ve pefloksasine duyarlı, ampisilin ve ampisilin/sulbaktama ise dirençli bulunmuştur.

Son zamanlarda İngiltere'de çok ilaca dirençli *S. enterica* serovar Typhimurium suşları görülmeye başlanmış ve bu suşlar faj tip 104 (DT104) olarak tanımlanmışlardır. DT104 suşu ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfonamidler ve tetrasikline dirençlidir. DT104 suşunun trimetoprim ve florokinolonlara dirençli olması da önem arz etmektedir. DT104 ile oluşan infeksiyonların mortalite ve morbiditesi duyarlı *S. enterica* serovar Typhimurium ile oluşan infeksiyonlara göre daha fazladır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yukarıda belirtilen beş antibiyotiğe dirençli *S. enterica* serovar

Typhimurium izolatlarının prevalansı 1979-1980'de % 1'den az iken, 1996'da %34'e yükselmiştir. Pulsed-field jel elektroforezi ile bu suşların çoğunun faj tip DT104 olduğu gösterilmiştir (Wall ve ark., 1995; Glynn ve ark., 1998; Mandell ve ark., 2000).

NO'nun özellikle hücre içi patojenlere karşı antimikrobik etkinliğinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Long ve ark. (1999), NO'nun mikobakterisidal etkinliğini hazırladıkları bir düzenekte in vitro olarak göstermişlerdir. Çalışmalarında, *M. tuberculosis* H37Rv suşuna 3, 6, 12 ve 24 saat süreyle 0, 25, 50, 70 ve 90 ppm NO gazı verdikten sonra 28 gün inkübasyona bırakmışlardır. 28. gün sonunda plaklardaki bakteri kolonilerini saymışlar ve 24 saat süreyle 90 ppm NO ile muamele edilen plaklarda koloni sayısının önemli oranda azaldığını göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada çok ilaca dirençli *M. tuberculosis* suşu da kullanmışlar ve onu da 3, 6, 12, 24 ve 48 saat 70 ve 90 ppm NO ile muamele etmişlerdir. 28 günlük inkübasyon sonunda 48 saat hem 70 hem de 90 ppm NO'ya maruz bırakılan plaklarda herhangi bir üreme tespit etmemişlerdir. Araştırmacılar NO'nun bu etkisinin bakterisidal mi yoksa inhibitör mü olduğunu tespit etmek için plakları 3 haftalık bir inkübasyona daha bırakmışlar ve NO'nun etkisinin mikobakteriyosidal olduğunu göstermişlerdir.

McElhaney-Feser ve ark. (1998), NO'nun *Candida* türlerine karşı tek başına ve azollerle kombine olarak etkilerini araştırmışlardır. NO kaynağı olarak DETA-NO, DEA-NO ve MAHMA-NO'yu denemişlerdir. Bunlardan DETA-NO'nun yarı ömrü daha uzun (20 saat) olduğu için NO kaynağı olarak kullanımının diğerlerine göre avantajlı olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da NO kaynağı olarak DETA-NO tercih edilmiştir. McElhaney-Feser ve ark. çalışmalarında *Candida* türlerine karşı DETA-NO'nun MİK değerinin yaklaşık olarak 2 mg/ml olduğunu tespit etmişlerdir. Kombinasyon testinde ise DETA-NO'nun ketokonazol, flukonazol ve mikonazolün her biriyle sinerjistik bir etki gösterdiğini bulmuşlardır. Çalışmalarının sonucunda *Candida* infeksiyonlarının tedavisi için yeni stratejiler geliştirilmesinde DETA-NO veya benzer özellikteki kimyasalların kullanışlı olabileceğini belirtmişlerdir.

De Groote ve ark. (1996) çalışmalarında, *metL* (metil transferaz; NO direnci) mutant *S. enterica* serovar Typhimurium suşlarına karşı NO donörü DETA-NO'nun ve O₂- üreten redoks-cycling ajan paraquatın (PQ) disk diffüzyon metod ile etkili olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada *S. enterica* serovar Typhimurium izolatlarına karşı DETA-NO'nun MİK değeri standart suş ve bir klinik izolatta 1 mg/ml bulunmuş iken, 14 klinik izolatta 2 mg/ml olarak tespit edilmiştir.

S. enterica serovar Typhimurium ve *E. coli*'de çoklu antibiyotik direncinden sorumlu kromozomal kaynaklı iki regulon vardır. Bunlar soxRS (redoks stres regülonu; süperoksit cevabı) ve marRAB (multiple antibiyotik rezistansı)'dır. Aerobik organizmalar enerjilerini organik bileşiklerin oksidasyonu ile oksijeni son elektron alıcısı olarak kullanarak elde ederler. Bu işlem sonucunda reaktif oksijen radikalleri oluşur ki bunlar potansiyel olarak hücre için zararlıdır. *E. coli* bu hücre içi reaktif oksijen radikallerine karşı bir çok gen grubunu uyararak cevap verir ki bunların ürünleri oksidatif hasarı ya onarır ya da ortadan kaldırır. Artan süperoksitlere karşı cevap soxRS sisteminde düzenlenir, bununla birlikte eşlik eden yardımcı genler topluluğu da soxRS regülonunu belirler (Fang ve ark., 1997; Pomposiello ve Demple, 2000).

SoxR proteini redoks olarak aktif demir sülfür içeren homodimerik transkripsiyonel regülatördür. *SoxR*'deki demir sülfürün oksidasyon durumu proteinin transkripsiyonel aktivitesini düzenler: indirgenmiş *soxR* transkripsiyonu etkilemezken, ikinci transkripsiyonel aktivatörü kodlayan gen olan *soxS* genini dramatik olarak artırır. *SoxS* proteini *AraC/XylS* familyasının bir üyesidir ve *soxS* ekspresyon artışı en az 15 geni aktive eder, bunlar, *sodA* (Mn-içeren süperoksit dismutaz), *zwf* (glukoz-6-fosfat dehidrogenaz), *micF* (porin OmpF mRNA'ya antisense RNA), *nfo* (DNA onarım endonükleaz IV), *fpr* (NADPH: ferredoksin oksidoredüktaz), *acrAB* (effluks pompası), *acn* (akonitaz), *fumC* (ısı-resistant fumaraz) ve *nfsA* (nitroredüktaz A). *SoxS*'nin indüksiyonu *micF* ve *acrAB* genlerine bağlı olarak çoklu antibiyotik direncine neden olur (Fang ve ark., 1997; Pomposiello ve Demple, 2000).

Son olarak, *soxRS* geni *S. enterica* serovar Typhimurium'dan klonlanmıştır. Nükleotid dizileri *E. coli*'nin *soxR* ve *soxS* polipeptidleri ile % 97'lik uyum göstermiştir. İki gen arasındaki regülatuar bölgeler neredeyse *E. coli*'deki ile aynıdır. SoxRS suşları süperoksit oluşturan ajan olan PQ'a çok duyarlıdır. *nfo* ve *sodA*'nın ekspresyonunun uyarımını önler ve PQ ile muamelesi antibiyotik direncinde artışa neden olmaz. Bunlara ilave olarak, *S. enterica* serovar Typhimurium'daki *soxS* geni *sodA*'nın ekspresyonunun aktivasyonu için ve redoks siklus ajanlarına direnç için gereklidir (Fang ve ark., 1997; Pomposiello ve Demple, 2000).

MarRAB sisteminde; *MarR*-aracılı represyon *MarA*'nın aktif sentezi için çevresel ajanlara cevabı azaltır. *MarA* ile *soxS* homologdur. *SoxS* ve *MarA* proteinleri oksidanlara ve antibiyotiklere direnç için genlerin direkt aktivatörüdür (Koutsolioutsou ve ark., 2001).

SoxRS ve *MarRAB* aracılı antibiyotik direnci, antisense RNA *micF* aracılı dış membran porin *OmpF*'nin down-regulasyonuna ve *acrAB*'nin kodladığı effluks pompasının aktivasyonuna bağlıdır. Bazı bulgular, *soxRS* veya *marRAB* regulonlarının ekspresyonunun patojenik bakterilerdeki antibiyotik direnci ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Hem *marA* ve hem de *soxS* mRNA yapısal ekspresyonunun *E. coli*'deki klinik kinolon direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (yaklaşık %15 vakada). *MarR* genindeki mutasyon bu suşlardaki *marA* ekspresyonunu dereprese eder (Koutsolioutsou ve ark., 2001).

Fang ve ark. (1997) çalışmalarında, *S. enterica* serovar Typhimurium'da Mn-süperoksid dismutazın ekspresyonunun artması ve PQ'a direnç için *soxS*'nin gerekli olduğunu ancak, in vitro NO donör bileşiklerine, makrofajların öldürme mekanizmalarına direnç ve farelerdeki virulans için gerekli olmadığını tespit etmişlerdir.

Koutsolioutsou ve ark. (2001) çalışmalarında, *soxRS* regulonunun PQ gibi redoks-cycling ilaçlarla ve NO ile aktive olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, *S. enterica* serovar Typhimurium'un bir klinik izolatında *soxRS*-yapısal mutasyonu tanımlanmış ve bu suşun antibiyotiklere daha dirençli olduğunu gösterilmiştir. Ding ve Demple (2000) çalışmalarında *E. coli*'deki *soxR*'nin aktivitesine NO'nun etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında, saf NO gazı füzyonunun *soxR*'yi aktive ettiğini göstermişlerdir.

Son yıllarda, siprofloksasin birikiminin azaldığı *S. enterica* serovar Typhimurium mutantlarının aşırı *acrA* eksprese ettiği ve çoklu antibiyotik direncinde *acrAB* efflux pompasının önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Giraud ve ark. 2000).

Son zamanlarda, özellikle gram-negatif bakterilerde çoklu antibiyotik direnci ile ilgili olduğu gösterilmiş olan efflux pompası ile ilgili çalışmalara artan bir eğilim gözlenmektedir. Nikaido ve ark. (1998) daha önce ilaca-aşırı duyarlı *S. enterica* serovar Typhimurium suşunun *acrAB* operonunda bir mutasyona sahip olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca çalışmalarında, eğer *acrAB* pompası genetik ve fizyolojik olarak inaktif ise lipofilik zincirler içeren beta-laktam antibiyotiklerin hızlı bir şekilde

dış membrana penetre olduğunu ancak, pompa aktif ise diffüzyonun çok zayıf olduğunu rapor etmişlerdir.

Li ve ark. (1998) beta-laktamaz inhibitörlerinin *Pseudomonas aeruginosa*'nın multidrug efflux pompası için substrat işlevi gördüğünü ve bakteriyel infeksiyonların tedavisinde beta-laktam-beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarının inaktif MexAB-OprM ve diğer bakterilerdeki benzer efflux sistemlerini önemli oranda artıracaklarını göstermişlerdir. Lee ve ark. (2000) farklı yapısal tipteki efflux pompalarının aynı hücrede kombine edilmesi durumunda, gözlenen antibiyotik direncinin tek başına eksprese ettiği pompaların her birininkinden çok daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Bakterilerde bu efflux pompalarına bağlı antibiyotik direncinde gözlenen artışın geri döndürülmesinde kullanılacak bir yol olarak bu pompaların bir şekilde inhibe edilmesi görülmektedir. Bu amaçla Lomovskaya ve ark. (2001) çalışmalarında; *P. aeruginosa*'ya karşı levofloksasinin etkilerini incelemişler ve daha sonra MC-207,110 pompa inhibitörü ile levofloksasinin kombine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, pompa inhibitörü ile artan kombinasyonlarda elde edilen MİK değerlerinin giderek azaldığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak ta; efflux pompasının inhibe edilmesinin, intrinsik direnci önemli oranda azalttığı, kazanılmış direnci geri döndürdüğü ve kinolonlara yüksek düzeyde dirençli *P. aeruginosa* suşlarının ortaya çıkma sıklığını da azalttığını bulmuşlardır.

Bu tez çalışmasında, NO'nun tek başına ve ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin, ampisilin ve ampisilin/sulbaktam ile kombinasyonunun *S. enterica* serovar Typhimurium izolatlarına etkileri in vitro olarak araştırılmıştır. Çalışmada, bütün izolatlar kinolon grubu antibiyotiklere duyarlı bulunurken (ofx: 0.03-0.125 µg/ml, cip: 0.007-0.03 µg/ml, pef: 0.06-0.125 µg/ml), ampisilin (amp: 512 µg/ml tüm izolatlar için) ve ampisilin/sulbaktama (amp/sul: 64-128 µg/ml) dirençli bulunmuştur. Standart *S. enterica* serovar Typhimurium suşu için ise hem ampisilin hem de ampisilin/sulbaktam MİK değeri 1 µg/ml olarak tespit edilmiştir. DETA-NO için bir klinik izolat ve standart suşta MİK değeri 1 mg/ml iken, diğer 14 klinik izolatta 2 mg/ml bulunmuştur.

Kombinasyon testinde, DETA-NO ile çalışmada kullanılan 5 antibiyotik arasında sinerjistik bir etki gözlenmemiştir. Ofloksasin için bir izolatta, pefloksasin için 9 izolatta, ampisilin/sulbaktam için 1 klinik izolat ve standart suşta antagonist etki tespit

edilmiştir. Ampisilin ve siprofloksasin için antagonist etki tanımlanmamıştır. Bunların dışında tüm izolatlarda aditif veya indiferan etki gözlenmiştir.

Çalışmada, soxRS regulonunun ilk kez *E. coli* suşlarında gösterilmesinden dolayı aynı antibiyotikler ile DETA-NO'nun kombine etkilerinin araştırılması amacı ile 3 klinik izolat üzerinde deneme yapılmıştır. Sonuçta, 2 suşta pefloksasin ile antagonist etki saptanırken, ofloksasin, siprofloksasin, ampisilin ve ampisilin/sulbaktam ile aditif veya indiferan etki gözlenmiştir.

SoxRS ve marRAB regulonları kinolon gibi spesifik plazmid veya transpozon kaynaklı genleri olmayan antibiyotik direncine önemli oranda katkıda bulunurlar. Bu yollarla oluşan direnç, yüksek oranda spesifik direnç determinantları ile oluşanlardan tipik olarak düşük olmasına rağmen, bu genlerin genel doğası yüksek düzey direncin gelişimine birinci basamak olarak katkıda bulunmaktadır. Çabuk oluşup geçen (transient) soxRS veya marRAB aktivasyonu antibiyotik direncinin yayılmasında yardımcı olabilir. Direnç oluşmasında, bu iki regulonun aktivasyonu yoluyla acrAB (efflux pompası acrB'yi kodlayan) aşırı ekspresyonu ve porin OmpF ekspresyonunun azalması önemlidir. İmmun ve inflamatuvar cevaplar ya da antibiyotiklerin kendileri tarafından soxRS ve marRAB'in aktivasyonu çoklu antibiyotik direnci oluşmasını sağlar, ancak bu direnç yalnız regulonlar aktive olduğunda ortaya çıkar (Koutsolioutsou ve ark., 2001). Çalışmamızda antibiyotikler ile NO arasında herhangi bir sinerjistik etki gözlenmemesi, bu genlerin NO tarafından geçici olarak aktivasyonunu düşündürmektedir. Bu şekilde, soxRS veya marRAB tarafından düzenlenen direnç fonksiyonlarının transient ekspresyonu, bu determinantlardan yoksun hücrelerin canlı kalma olasılığını artırarak diğer antibiyotik direnç determinantlarının yayılarak artmasına neden olur (Koutsolioutsou ve ark., 2001).

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında NO'nun *S. enterica* serovar Typhimurium izolatlarına karşı ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin, ampisilin ve ampisilin/sulbaktam ile sinerjistik etkisi gözlenmemiş ancak, bazı izolatlarda antagonist etki saptanmıştır. Yukarıda anlatılanlar ışığında NO, *S. enterica* serovar Typhimurium izolatlarında soxRS ve marRAB regulonlarını aktive etmiş olabilir. Eğer aktivasyon oluşmuş ise, buna bağlı olarak antagonist etki gözlenmiş olabilir.

NO'nun biyolojik fonksiyonlarından dolayı son yıllarda, *in vivo* olarak kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Örneğin, hipoksik solunum

yetmezliği ve persistent pulmoner hipertansiyonu olan neonatlara 2 hafta süreyle 80 ppm dozunda NO verilmiş ve herhangi bir yan etki gözlenmemiştir (NINOSG, 1997; Roberts ve ark., 1997). In vitro olarak sıçan düz kas hücreleri NO donörü DETA-NO ile muamele edilmiş ve hücre canlılığının %95'den daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç DETA-NO'nun toksik olmadığını göstermektedir (Mooradian ve ark., 1995). Diazeniumdiolate'lerden yapılmış bir prodrug hepatik bozuklukta kullanılmış ve toksik bir etki bildirilmemiştir (Saavedra ve ark., 1997). Bir çalışmada da diazeniumdiolate'ler yoluyla sıçan derisinde NO dağılımı etkili bir şekilde yapılmıştır (Smith ve Simmons, 1998).

Çalışmamızda *S. enterica* serovar Typhimurium infeksiyonlarının tedavisinde antibiyotikler ile NO'nun kombine kullanılmasının tedavideki yeri ve antibiyotikler ile etkileşimi araştırılmıştır. Ancak elde edilen sonuçlar her iki ajanın birbirini bazı suşlarda olumsuz yönde etkilerken, çođu sušta ise birbirlerini etkilemediklerini göstermiştir. Bu çalışmada gösterilen tüm etkiler in vitro olduğu için bu konunun daha iyi aydınlatılmasında in vivo çalışmalara da gereksinim duyulduğu görülmektedir

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Klinik *S. enterica* serovar Typhimurium izolatlarının tümü ofloksasin, siprofloksasin ve pefloksasine duyarlı bulunmuştur.
2. Tüm klinik izolatlar ampisilin ve ampisilin/sulbaktama dirençli olarak tespit edilmiştir.
3. NO tüm izolatlara karşı 1-2 mg/ml'lik konsantrasyonlarda etkili bulunmuştur.
4. NO ve 5 antibiyotiğin kombinasyonlarında; pefloksasin için 9 izolatta, ofloksasin için 1 izolatta ve ampisilin/sulbaktam için de 1 izolatta antagonist etki gözlenirken, diğerleri için aditif veya indiferan etki gözlenmiştir.
5. NO ve antibiyotiklerin etkileşimi konusunda henüz veriler bulunmamaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, NO ile ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin, ampisilin ve ampisilin/sulbaktam kombinasyonunun birbirlerini etkilemedikleri (aditif veya indiferan) saptanmıştır.
6. Makrofajların hücre içi patojenlere karşı önemli bir defans molekülü olan NO ile, bu patojenlerin tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin etkileşiminin bilinmesi gerekliliği sonucuna varılmıştır.
7. İn vitro olarak gösterilen bu etkileşimin in vivo da gösterilmesinin antibakteriyal tedavilerin planlanması konusunda yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

VII. KAYNAKLAR

- Alpuche-Aranda, C. M., Racoosin, E. L., Swanson, J. A., Miller, S. I. (1994). *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *Journal of Experimental Medicine*, **179**, 601-608.
- Alpuche-Aranda, C. M., Swanson, J. A., Loomis, W. P., Miller, S. I. (1992). *Salmonella typhimurium* activates virulence gene transcription within acidified macrophage phagosomes. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **89**, 10079-10083.
- Anggard, E. (1994). Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *The Lancet*, **343**, 1199-1205.
- Bal, Ç. (1999). Antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliğinin saptanması. *Flora*, **4**, 219-229.
- Balland, O., Pinto-Alphandary, H., Viron, A., Puvion, E., Andreumont, A., Couvreur, P. (1996). Intracellular distribution of ampicillin in murine macrophages infected with *Salmonella typhimurium* and treated with (³H)ampicillin-loaded nanoparticles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **37**, 105-115.
- Barguellil, F., Burucoa, C., Amor, A., Fauchere, J. L., Fendri, C. (1995). In vivo acquisition of expanded-spectrum beta-lactamase in *Salmonella enteritidis* during antimicrobial therapy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases*, **14**, 703-706.
- Bauernfeind, A. ve ark. (1992). A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection*, **20**, 158-163.

- Behlau, I., Miller, S. I. (1993). A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells. *Journal of Bacteriology*, *175*, 4475-4484.
- Bilgehan, H. (2000). Salmonella. *Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları'ndan*. 10. baskı, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 29-57.
- Bolanes, J. P., Almeida, A., Stewart, V., Peuchen, S., Land, J. M., Clark, J. B., Heales, J.R. (1997). Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: Mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry*, *68* (6), 2227-2240.
- Bryk, R., Griffin, P., Nathan, C. (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*, *407*, 211-215.
- Brüne, B. Meßmer, U. K., Sandau, K. (1995). The role of nitric oxide in cell injury. *Toxicology Letters*, *82/83*, 233-237.
- Buchmeier, N. A., Heffron, F. (1989). Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages. *Infection and Immunity*, *57* (1), 1-7.
- Buchmeier, N. A., Lipps, C. J., So, M. Y., Heffron, F. (1993). Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Molecular Microbiology*, *7*, 933-936.
- Buisson, A., Plotkine, M., Boulu, R. G. (1992). The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, *106*, 766-767.

- Chen, L. M., Kaniga, K., Galan, J. E. (1996). *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Molecular Microbiology*, **21**, 1101-1115.
- Collazo, C. M., Zierler, M. K., Galan, J. E. (1995). Functional analysis of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invI* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus. *Molecular Microbiology*, **15**, 25-38.
- Curtiss, R. D., Kelly, S. M. (1987). *Salmonella typhimurium* deletions mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infection and Immunity*, **55**, 3035-3043.
- Çakmakçı, M. (1999). Zehirli molekülden haberci maddelerin kraliçeliğine; Nitrik oksit. *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi*, **374**, 58-62.
- Çoban, A. Y., Durupınar, B. Nitrik oksit ve DNA hasarı. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **35**, 497-504.
- D'Agostino, P., La Rosa, M., Barbera, C., Arcoleo, F., Di Bella, G., Milano, S., Cillari, E. (1998). Doxycycline reduces mortality to lethal endotoxemia by reducing nitric oxide synthesis via an interleukin-10-independent mechanism. *Journal of Infectious Diseases*, **177**, 489-492.
- Dawson, V. L., Dawson, T. M. (1995). Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. *Advances in Pharmacology*, **34**, 323.
- De Jong, R., Altare, F., Haagen, I. A., Elferink, D. G., Boer, T., van Breda Vriesman, P. J., Kabel, P. J., Draaisma, J. M., van Dissel, J. T., Kroon, F. P., Casanova, J. L., Ottenhoff, T. H. (1998). Severe mycobacterial and *Salmonella* infection in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science*, **280**, 1435-1438.

- De Groote, M. A., Testerman, T., Xu, Y., Stauffer, G., Fang, F.C. (1996). Homocysteine antagonism of nitric oxide-related cytostasis in *Salmonella typhimurium*. *Science*, *272*, 414-416.
- Dinerman, J. L., Dawson, T. M., Schell, M. J., Snowman, A., Snyder, S. H. (1994). Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, *91*, 4214-4218.
- Ding, H., Demple, B. (2000). Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, *97*, 5146-50.
- Dorman, C. J., Chatfield, S., Higgins, C. F., Hayward, C., Dougan, G. (1989). Characterization of porin and ompR mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: ompR mutants are attenuated in vivo. *Infection and Immunity*, *57*, 2136-2140.
- Editorial. (1992). The molecule of the year. *Science*, *258*, 1861-1865.
- Ekinci, B. (1999). İnsan monosit kökenli makrofajlar içindeki *Salmonella typhi* üzerine in vitro olarak ampisilin, siprofloksasin ve ofloksasinin etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Samsun.
- Ekinci, B., Çoban, A. Y., Birinci, A., Ertürk, M., Durupınar, B. (2001). Bazı antibiyotiklerin insan makrofajlarından nitrik oksit salınımına etkileri. *Mikrobiyoloji Bülteni*, *35*, 267-271.
- Erbaş, D. (1997). Nitrik oksit. *Türk Fizyolojik Bilimler Derneği XXIII. Ulusal Fizyoloji Kongresi*, Adana, Özet Kitabı, s14-15.
- Eroğlu, L. (1999). Nitrik oksit: Genel özellikleri. *ANKEM Dergisi*, *13* (3), 370-373.

- Fang, F. C., Libby, S. J., Buchmeier, N. A., Loewen, P. C., Switala, J., Harwood, J., Guiney, D. G. (1992). The alternative sigma factor katF (rpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **89**, 11978-11982.
- Fang, F. C., Vazquez-Torres, A., Xu Y. (1997). The transcriptional regulator SoxS is required for resistance of *Salmonella typhimurium* to paraquat but not for virulence in mice. *Infection and Immunity*, **65**, 5371-5375.
- Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G., Heffron, F. (1986). Mutants of *salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **83**, 5189-5193.
- Fields, P. I., Groisman, E. A., Heffron, F. (1989). A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science*, **243**, 1059-1062.
- Fitzhugh, A. L., Keefer, L. K. (2000). Diazeniumdiolates: Pro- and antioxidant applications of the "NONOates". *Free Radical Biology & Medicine*, **28 (10)**, 1463-1469.
- Frostell, C., Fratacci, M. D., Wain, J. C., Jones, R., Zapol, W. M. (1991). Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation*, **83**, 2038-2047.
- Garthwaite, J., Boulton, L. (1995). Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annual Review of Physiology*, **57**, 683.
- Gibaldi, M. (1993). What is nitric oxide and why are so many people studying it? *Journal of Clinical Pharmacology*, **33**, 488.

- Giraud, E., Cloeckaert, A., Kerboeuf, D., Chaslus-Dancla, E. (2000). Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 1223-1228.
- Glynn, M. K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M., Angula, F. C. (1998). Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 infections in the United States. *The New England Journal of Medicine*, **338**, 1333-1338.
- Gökçe, M. F. (1999). Sıçan hipokampusünde çinkonun sebep olduğu hücre kaybına nitrik oksitin etkileri, Uzmanlık Tezi, s26-62, Samsun.
- Griggs, D. J., Gensberg, K., Piddock, L. J. (1996). Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**, 1009-1013.
- Grisham, M. B. (1992). Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. Pp 70-75.
- Groisman, E. A., Ochman, H. (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends in Microbiology*, **5**, 343-348.
- Gross, S. S., Volin, M. S. (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annual Review of Physiology*, **57**, 737-769.
- Gunn, J. S., Miller, S. I. (1996). PhoP/PhoQ activates transcription of *pmrA/B*, encoding a two-component system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *Journal of Bacteriology*, **178**, 6857-6864.

- Guo, L., Lim, K. B., Gunn, J. S., Bainbridge, B., Darveau, R. P., Hackett, M., Miller, S. I. (1997). Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science*, *276*, 250-253.
- Gustafsson, L. E., Leone, A. M., Persson, M. G., Wiklund, N. P., Moncada, S. (1991). Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *181*, 852-857.
- Gülay, Z., Yücesoy, M., Yuluğ, N. (1997). Karbapenemlerin nitrik oksit yanıtı üzerine etkileri. *ANKEM Dergisi*, *11*, 445-450.
- Heisig, P. (1993). High-level fluoroquinolone resistance in a *Salmonella typhimurium* isolate due to alterations in both *gyrA* and *gyrB* genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *32*, 367-377.
- Herikstad, H., Hayes, P., Mokhtar, M., Fracaro, M. L., Threlfall, E. J., Angulo, F. J. (1997). Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, *3*, 371-372.
- Hohmann, E. L., Oletta, C. A., Killeen, K. P., Miller, S. I. (1996). *phoP-phoQ*-deleted *Salmonella typhi* (TY800) is a safe and immunogenic single dose typhoid fever vaccine in volunteers. *Journal of Infection Diseases*, *173*, 1408-1414.
- <http://www.bi.bbsrc.ac.uk/WORLD/Labs/MOLCOGNEUR/LMCNpce.html>
- <http://www.imakerala.org/nitricoxide 1.htm>
- Hueck, C. J., Hantman, M. J., Bajaj, V., Johnston, C., Lee, C. A., Miller S. I. (1995). *Salmonella typhimurium*-secreted invasion determinants are homologous to *Shigella* Ipa proteins. *Molecular Microbiology*, *18*, 479-490.

- Izumi, Y., Ckuffird, D. B., Zorumski, C. F. (1992). Inhibition of long term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science*, **257**, 1273-1276.
- Johnson, R. A., Freeman, R. H. (1991). Blockade of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) production inhibits renin release independent of the resulting increase in renal perfusion pressure in rats. *American Journal of Nephrology*, **2**, 507.
- Kariuki, S., Gilks, C., Corkill, J., Kimari, J., Benca, A., Waiyaki, P., Hart, C. A. (1996). Multi-drug resistant non-*typhi* salmonellae in Kenya. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **38**, 425-434.
- Kharitonov, V. G. (1994). Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 5881-5883.
- Kitagawa, H., Takeda, F., Kohei, H. (1989). Gastric mucosal protective action of endothelium-derived relaxing factor. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **162 (Suppl)**, 131-133.
- Kohri, K., Tamaoki, J., Kondo, M., Aoshiba, K., Tagaya, E., Nagai, A. (2000). Macrolide antibiotics inhibit nitric oxide generation by rat pulmonary alveolar macrophages. *European Respiratory Journal*, **15**, 62-67.
- Koneman, E. W., Allen, S. D, Janda, W. M, Schreckenberger, P. C., Winn, Jr, W. C. (1997). Antimicrobial susceptibility testing. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth edition*, Lippincott, Philadelphia, New York, 842-845.
- Koşay, S. (1996). Nitrik oksitin hastalıklardaki patofizyolojik rolü. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ayın Kitabı Dergisi*, **83**, 1-89.
- Koutsolioutsou, A., Martins, E. A., White, D. G., Levy, S. B., Demple, B. (2001). A soxRS-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical

isolate of *Salmonella enterica* (Serovar Typhimurium). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**, 38-43.

Kröncke, K. D., Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V. (1995). Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **376**, 327.

Kuby, J. (1997). Immunology. *Third edition*, W. H. Freeman and Company New York, s47-82.

Lee, A., Mao, W., Warren, M. S., Mistry, A., Hoshino, K., Okumura, R., Ishida, H., Lomovskaya, O. (2000). Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *Journal of Bacteriology*, **182**, 3142-3150.

Li, X. Z., Zhang, L., Srikumar, R., Poole, K. (1998). β -lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**, 399-403.

Lomovskaya, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H., Lee, V. J. (2001). Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**, 105-116.

Long, R., Light, B., Talbot, J. A. (1999). Mycobacteriocidal action of exogenous nitric oxide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**, 403-405.

Looney, R. J., Steigbigel, R. T. (1986). Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense in vitro. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **108**, 506-516.

- Mandell, G. L., Bennet, J. E., Dolin, R. (2000). *Salmonella Species, Including Salmonella typhi*. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fifth edition, Ed(s), Miller, S. M., Pegues, D, A. Churchill Livingstone Philadelphia, Pennsylvania, 2344-2363.
- Marangoz, C. (1996). Nitrik oksit ve epilepsi. *OMÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 13 (3), 165-183.
- Masini, E., Bianchi, S., Mugnai, L., Gambassi, F., Lupini, M., Pistelli, A., Mannaioni, P. F. (1991). The effect of nitric oxide generators on ischemia reperfusion injury and histamine release in isolated perfused guinea-pig heart. *Agents and Action*, 33, 53-56.
- McCormick, B. A., Miller, S. I., Carnes, D., Madara, J. L. (1995). Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: A novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infection and Immunity*, 63, 2302-2309.
- McDonald, J. W., Johnston, M. V. (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Research Reviews*, 15, 41-70.
- McElhaney-Feser, G. E., Rauli, R. E., Cihlar, R. L. (1998). Synergy of nitric oxide and azoles against *Candida* species in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 (9), 2342-2346.
- Mehta, J. L. (1995). Endothelium, coronary vasodilation and organic nitrates. *American Heart Journal*, 129, 382-391.
- Meller, S. T., Lewis, S. J., Bates, J. N., Brody, M. J., Gebhart, G. F. (1990). Is there a role for an endothelium-derived relaxing factor in nociception? *Brain Research*, 531, 342-345.

- Milano, S., Arcoleo, F., D'agostino, P., Cillari, E. (1997). Intraperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulation inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**, 117-121.
- Miller, S. I., Kukral, A. M., Mekalanos, J. J. (1989). A two-component regulatory system (*phoP/phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **86**, 5054-5058.
- Mills, D. M., Bajaj, V. Lee, C. A. (1995). A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Molecular Microbiology*, **15**, 749-759.
- Monack, D. M., Raupach, B., Hromockyj, A. E., Falkow, S. (1996). *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **93**, 9833-9838.
- Moncada, S., Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England Journal of Medicine*, **329** (27), 2002-2010.
- Moncado, S., Higgs, A., Furchgott, R. (1997). XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacological Reviews*, **49**, 137.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, **43**, 109-142.
- Mooradian, D. L., Hutsell, T. C., Keefer, L. K. (1995). Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **25**, 674-678.

- Mozaffarian, N., Berman, J. W., Casadevall, A. (1997). Enhancement of nitric oxide synthesis by macrophages represents an additional mechanism of action for amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**, 1825-1829.
- The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group. (1997). Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure. *The New England Journal of Medicine*, **336**, 597-604.
- Nikaido, H., Basina, M., Nguyen, V. Y., Rosenberg, E. Y. (1998). Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those β -lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *Journal of Bacteriology*, **180**, 4686-4692.
- O'Brien, A. D. (1982). Innate resistance of mice to *Salmonella typhi* infection. *Infection and Immunity*, **38**, 948-952.
- Oh, Y. K., Alpuche-Aranda, C., Berthiaume, E., Jinks, T., Miller, S. I., Swanson, J. A. (1996). Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*, **64**, 3877-3883.
- Panagiotidis, G., Alm, P., Lundquist, I. (1992). Inhibition of islet nitric oxide synthase increases arginin-induced insulin release. *European Journal of Pharmacology*, **229**, 277-278.
- Pearson, P. J., Lin, P. J., Schaff, H. V. (1992). Global myocardial ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets in the canine coronary artery. A possible cause of vasospasm after cardiopulmonary bypass. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **103**, 1147-1154.

- Pegues, D. A., Hantman, M. J., Behlau, I., Miller, S. I. (1995). PhoP/PhoQ transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: Evidence for a role in protein secretion. *Molecular Microbiology*, **17**, 169-181.
- Pepke-Zaba, J., Higebottam, T. W., Dinh-Xuan, A. T., Stone, D., Wallwork, J. (1991). Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet*, **338 (8776)**, 1173-1174.
- Pique, J. M., Esplugues, J. V., Whittle, B. J. (1992). Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. *Gastroenterology*, **102**, 168-174.
- Pomposiello, P. J., Demple, B. (2000). Identification of SoxS-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, **182**, 23-9.
- Poole, K. (2000). Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**, 2233-2241.
- Poupart, M. C., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., Sirot, J. (1991). Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from a *Salmonella mbandaka* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35**, 1498-1500.
- Rao, V. L. R., Butterworth, R. (1998). Neuronal nitric oxide synthase and hepatic encephalopathy. *Metabolic Brain Disease*, **13**, 175.
- Rathman, M., Barker, L. P., Falkow, S. (1997). The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infection and Immunity*, **65**, 1475-1485.

- Reyna, F., Huesca, M., Gonzalez, V., Fuchs, L. Y. (1995). *Salmonella typhimurium gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**, 1621-1623.
- Roberts, J. D., Fineman, J. R., Morin, F. C. et al. For the Inhaled Nitric Oxide Study Group. (1997). Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. *The New England Journal of Medicine*, **336**, 605-610.
- Saavedra, J. E., Billiar, T. R., Williams, D. L., Kim, Y. M., Watkins, S. C, Keefer, L. K. (1997). Targeting nitric oxide (NO) delivery in vitro. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and toxicity in the liver. *Journal of Medicinal Chemistry*, **40**, 1947-1954.
- Schüler, P., Zemper, K., Borner, K., Koeppe, P., Schaberg, T., Lode, H. (1997). Penetration of sparfloxacin and ciprofloxacin into alveolar macrophages, epithelial lining fluid, and polymorphonuclear leucocytes. *European Respiratory Journal*, **10**, 1130-1136.
- Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D. W. (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, **93**, 2593-2597.
- Siegfried, M. R., Erhardt, J., Rider, T., Ma, X. L., Lefer, A. M. (1992). Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia reperfusion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **260**, 668-675.
- Sinzinger, H., Virgolini, I., O'Grady, J., Rauscha, F., Fitscha, P. (1992). Modification of platelet function by isosorbide dinitrate in patients with coronary artery disease. *Thrombosis Research*, **65**, 323-335.

- Smith, D. J., Simmons, M. L. (1998). Transdermal delivery of nitric oxide from diazeniumdiolates. *Journal of Controlled Release*, **51**, 153-159.
- Snyder, S. H., Bredt, D. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, **5**, 28.
- Taylor, B. S., Alarcon, L. H., Billiar, T. R. (1998). Inducible nitric oxide synthase in the liver: Regulation and function. *Biochemistry (Moscow)*, **63**, 766.
- Threlfall, E. J., Frost, J. A., Ward, L. R., Rowe, B. (1996). Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella typhimurium* (Letter). *Lancet*, **347**, 1053-1054.
- Tohyama, M., Kawakami, K., Saito, A. (1996). Anticryptococcal effect of amphotericin B is mediated through macrophage production of nitric oxide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**, 1919-1923.
- Topçu, A. W., Söyletir, G., Doğanay, M. (1996). Tifo dışı salmonellozlar. *İnfeksiyon Hastalıkları'nda, Birinci baskı*, Nobel Tıp Kitapevleri, 501-505.
- Ustaçelebi, Ş. (1999a). Fagositer sistem ve antijen sunucu hücreler. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji'de, Birinci baskı*, Editör(ler), Akoğlu, T., Güneş Kitapevi Ltd. Şti. 161-165.
- Ustaçelebi, Ş. (1999b). Antimikrobiyal ilaçlar ve etki mekanizmaları. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji'de, Birinci baskı*, Editör(ler), Çolak, D., Güneş Kitapevi Ltd. Şti. 81-85.
- Vahaboğlu, H., Hall, L. M., Mulazimoğlu, L., Dodanlı, S., Yildirim, I., Livermore, D. M. (1995). Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. *Journal of Medical Microbiology*, **43**, 294-299.

- Wall, P. G., Morgan, D., Lamden, K., Griffin, M., Threlfall, E. J., Ward, L. R., Rowe, B. (1995). Transmission of multi-resistant strains of *Salmonella typhimurium* from cattle to man. *Veterinary Research*, *136*, 591-592.
- Wattal, C., Kaul, V., Chugh, T. O., Kler, N., Bhandar', S. K. (1994). An outbreak of multidrug resistant *Salmonella typhimurium* in Delhi (India). *Indian Journal of Medical Research*, *100*, 266-267.
- Wennmalm, A. Benthin, J., Edlund, A. (1993). Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. *Circulation Research*, *73*, 1121-1127.
- Yun, H. Y., Dawson, V. L., Dawson, T. M. (1996). Neurobiology of nitric oxide. *Critical Reviews in Neurobiology*, *10*, 291.
- Zoukh, K. (1988). Resistance to antibiotics of salmonellae other than *typhi* and *paratyphi* isolated in Algeria from 1979 to 1985. *Pathologie Biologie*, *36*, 255-257.
- Zweier, J. L., Wang, P., Samouilov, A., Kuppusamy, P. (1995). Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nature Medicine*, *1*, 804.

VIII. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılı Şubat ayında Ordu'nun Fatsa ilçesinde doğmuşum. İlk, Orta ve Lise eğitimimi Fatsa'da tamamladıktan sonra 1989 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü'ne başladım. 1993 yılında mezun oldum. 1994 yılı Eylül ayında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimime başladım. Eylül 1997 yılında "Mycobacterium tuberculosis ilaç duyarlılığının Löwenstein-Jensen ve Middlebrook 7H10 besiyerinde proportion metod ile karşılaştırmalı olarak araştırılması" konulu tezimi tamamlayarak Yüksek Lisansı bitirdim. Aynı yıl aynı enstitüde Doktora eğitimime başladım. Halen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Uzman olarak görevimi sürdürmekteyim.

