

**BAZI FOSFAZEN BİLEŞİKLERİNİN ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE BU BİLEŞİKLERİN DNA İLE
ETKİLEŞİMİ**

Makbule YAVUZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞUBAT 2010
ANKARA**

Makbule YAVUZ tarafından hazırlanan “BAZI FOSFAZEN BİLEŞİKLERİNİN ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE BU BİLEŞİKLERİN DNA İLE ETKİLEŞİMİ” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Zeynel KILIÇ

.....

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Prof.Dr. Leyla AÇIK

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Doç.Dr. Barboros BALABANLI

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tarih:22.02.2010

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Makbule YAVUZ

**BAZI FOSFAZEN BİLEŞİKLERİNİN ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE BU BİLEŞİKLERİN DNA İLE
ETKİLEŞİMİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Makbule YAVUZ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Şubat 2010

ÖZET

NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 adlı fosfazen bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri bir grup insan patojeni bakterisi olan *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus fecalis* (ATCC 292112), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* mayası ve *Candida tropicalis* mayasına karşı çalışılmıştır. Ayrıca bileşiklerinin *Mycobacterium tuberculosis* ATCC H37 Rv referans suşu ve çoklu antibiyotik direnci gösteren 6 farklı klinik *M. tuberculosis* suşu üzerinde etkileri çalışılmıştır. İlave olarak bu maddelerin DNA üzerine etkileri araştırılmış ve DNA üzerinde de etkili olduğu anlaşılmıştır. Jel elektroforez sonucunda DNA üzerinde en etkili madde NA12 maddesinin olduğu anlaşılmıştır.

Bilim Kodu : 203.1.104
Anahtar Kelimeler : Fosfazenler, Biyolojik aktivite, *Mycobacterium tuberculosis*
Sayfa Adedi : 52
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Leyla AÇIK

**DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF
PHOSPHAZENE DERIVATIVES AND THEIR INTERACTION WITH
DNA**

(M.Sc. Thesis)

Makbule YAVUZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ İNSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

February 2010

ABSTRACT

NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 antimicrobial activities were evaluated against, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus fecalis* (ATCC 292112), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans*, *Candida tropicalis* are the most sensitive bacteria to the phosphazenes. Their in vitro antituberculosis activity have been tested against INH-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) and six multi-drug resistant clinical *M. tuberculosis* isolates. Among the synthesized compounds, NA7 was the most active agents against to susceptible the reference strain *M. tuberculosis*. While, compounds NA7, NA8, NA9 and NA12 were active against all the multidrug resistant clinical isolates at the highest concentrations. Gel electrophoresis results indicate that as the compounds bind to DNA, the most effective DNA-modifiers is NA12.

Science Code : 203.1.104

Key Words : Phosphazene derivatives, Biological activity,
Mycobacterium tuberculosis

Page Number : 52

Adviser : Prof.Dr.Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında kıymetli bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösterici olan değerli hocam sayın Prof.Dr. Leyla AÇIK'a teşekkür ederim. Her türlü destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan Prof.Dr. Zeynel Kılıç'a, Nuran Asmafiliz'e, Emine Kılıç'a, sevgili yeğenim Doç.Dr.Haşim Boyacı'ya, Burak Yavuz'a, Burçin Budak'a arkadaşlarım İlknur Aksu, Nermin Hamurcu, Ela Ediz, Ebru Uyar ve Şirin Kuş'a ve kardeşim Berat Aksu'ya teşekkür ederim.

Ayrıca laboratuvar sorumlum Y.Doç.Dr. Devrim Dünder'a bana göstermiş olduğu anlayışından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Tüberküloz Epidemiyolojisi.....	4
2.3. Basilin Yapısı ve Özellikleri.....	6
2.3.1. Basilin membran ve duvar yapısı.....	7
2.4. Tüberkülozda Laboratuvar Bulguları.....	8
2.5. Tanı Amacıyla Uygulanan İşlemler.....	10
2.5.1. Doğrudan preparat.....	10
2.5.2. Kültür.....	11
2.6. Tedavi.....	12
2.6.1. Tüberküloz tedavisinde ilaç direnci gelişiminin mekanizması..	14
2.6.2. İlaç direnci çıkmasının nedenleri.....	15
2.7. Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar.....	15

Sayfa

2.7.1. İzoniazid.....	15
2.7.2. Streptomisin.....	16
2.7.3. Etambutol.....	16
2.7.4. Rifampisin.....	16
2.8. Korunma.....	18
2.9. Fosfozenler.....	20
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Fosfazenler.....	23
3.1.2. Mikroorganizmalar.....	25
3.1.3. Biyolojik aktivite çalışmaları için kullanılan tampon ve Çözeltiler.....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Agaroz jel elektroforezi.....	27
3.2.2. Antimikrobiyal aktivite.....	28
3.2.3. Dekontaminasyon ve homojenizasyon.....	29
3.2.4. MGIT 960 çalışma akışı.....	29
3.2.5. Tip tayini ve M. tuberculosis üretilmesi.....	29
3.2.6. Bactec MGIT sistemi ile duyarlılık testi ve madde ile etkileşimi.....	30
3.2.7. Sonuçların yorumlanması.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	32
4.1. Fosfazenlerin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	32

Sayfa

4.2. Fosfazenlerin Antitüberküloz Aktivitesi.....	36
4.3. Madde ve DNA Etkileşimi.....	40
5. TARTIŞMA.....	42
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ	52

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Enfekte kişide tüberküloz hastalığının gelişimini arttıran durumlar.....	20
Çizelge 3.1. Biyolojik aktivite için kullanılan mikroorganizmalar ve kaynakları.....	28
Çizelge 4.1. NA7, 8, 9 ve 12 nin antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	32
Çizelge 4.2. E1, E2 ve E3 maddelerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları..	33
Çizelge 4.3. Referans ve çoklu ilaç dirençli klinik suşların antibiyogramı.....	37
Çizelge 4.4. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin <i>M. tuberculosis</i> H37Rv suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri..	37
Çizelge 4.5. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin <i>M. tuberculosis</i> çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 1 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri.....	38
Çizelge 4.6. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin <i>M. tuberculosis</i> çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 2 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri.....	38
Çizelge 4.7. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin <i>M. tuberculosis</i> çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 3 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri.....	38
Çizelge 4.8. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin <i>M. tuberculosis</i> çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 4 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri.....	39
Çizelge 4.9. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin <i>M. tuberculosis</i> çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 5 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri.....	39
Çizelge 4.10. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin <i>M. tuberculosis</i> çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 6 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri.....	39

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Bazı maddelerin antimikrobiyal aktivite sonuçları	34
Şekil 4.2. DNA ve NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin etkileşimi.....	40

KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
ARB	Aside Rezistan Basil
BACTEC	Becton Dickinson Diagnostic Instrument
BCG	Baille Calmette-Guerin
CFU	Koloni oluşturan ünite
ÇİD	Çok ilaca Dirençli
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EMB	Etambutol
EZN	Ehrlich- Ziehl-Neelsen
INH	İzoniyazid
IUATLD	Uluslararası Tüberküloz ve Akciğer Hastalıkları Komitesi
LJ	Lowenstein Jensen
MHB	Mueller Hinton Broth
MHA	Mueller Hinton Agar
MGIT	Mycobacteria Growth İndicatör Tube
MIC	Minimal İnhibisyon konsantrasyonu
P-PNB	p-nitro-alfa-asetil amino-beta-hidroksipropiofenon
PPD	Purifiye Protein Derivelere
RIF	Rifampisin
SM	Streptomisin
TE	Tris-EDTA
VSD	Verem Savaş Derneği
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1.GİRİŞ

Tüberküloz, bilinen en eski hastalıklardan biri olmasına rağmen günümüzde de gerek dünyada ve gerekse ülkemizde hala önemini koruyan bir sağlık sorunudur. Tüberkülozun yaygınlaşması ve tüberküloza bağlı ölümlerin artması batı toplumlarında endüstri devriminin gerçekleştiği 19. yüzyılın ikinci yarısında gözlenmiştir. Dünyada fakirliğin artması kötü hijyenik ortamın bulunduğu yaşam şartları ile antitüberküloz programlarına ara verilmesi, göç problemleri, insan bağışıklık sistemi yetmezliği, virüsü (HIV) enfeksiyonu ve ilaçlara karşı direnç gelişiminin artması sonucu tüberküloz önemli bir sağlık problemi olarak son yıllarda tekrar gündeme gelmiştir. Tüberkülozdan ölümlerin 2050 yılına kadar yılda 3 milyondan 5 milyona artacağı tahmin edilmektedir [1]. Gelişmiş ülkelerde tüberkülozun yeniden yükselmesi ve yapılan çalışmalarla istenildiği düzeye indirilememesinin en büyük nedeninin, gelişmiş toplumlara, yaşam şartları iyi olmayan toplumlardan göç edilmesi olduğu gözlenmiştir [2]. Tüberküloz, HIV'a bağlı gelişen nedenlerden sonra, enfeksiyona bağlı ölümlere neden olan hastalıklar arasında ikinci sırada yer almaktadır. Dünyada görülen tüberküloz vakalarının %80'i; Hindistan, Çin, Endonezya, Bangladeş, Pakistan, Nijerya, Filipinler ve bazı Afrika'nın aralarında bulunduğu 22 ülkede gözlenmektedir [3].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)' nün tahminlerine göre, bugün dünyada yaklaşık 20 milyon aktif olgu bulunmakta ve her yıl 50-100 milyon kişi enfekte olmaktadır. Dünya nüfusunun 3 de biri yani 2 milyardan fazla insan bugün tüberküloz basili ile enfektedir. Hastalık nedeniyle oluşan ölüm, yılda yaklaşık 3 milyondur ve bunların en az %80'i gelişmekte olan ülkelere aittir. Bu ülkelerde erişkinlerin %30-60'nın *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir [4]. Bu ülkelerdeki kaçınılmaz ölümün %25'i tüberkülozdan oluşur. Bu vakaların %75'i üretici yaş grubundadır. *M. tuberculosis* diğer enfeksiyon ajanlarına göre çok daha öldürücüdür [5].

Ülkemizde 1950'li yıllarda başlayan organize kampanyalarla tüberküloza karşı bir savaş başlatılmıştır. 20-25 yıllık zaman dilimi içinde yurt düzeyine

yayılmış verem savaş dispanserleri, göğüs hastalıkları hastaneleri, bölge laboratuvarları, mikrofilm taramaları, Baille Calmette-Guerin (BCG) aşı kampanyaları, üniversite-bakanlık ve dernekler arasındaki uyumlu işbirliği ve verem savaşına kendini adanmış kadrolarla hastalık büyük ölçüde geriletilmiştir. 1950'lerde binde 25 olan hastalık prevalansı, 1975'te binde 1'e düşürülmüştür. 1975-1980 sonrasında veremle savaş hızı azalmış, birçok göğüs hastalıkları hastanesi kapatılmış, BCG aşı kampanyaları eski gücünü yitirmiş, dispanser çalışmaları iyi organize edilememiştir [5].

Şu anda ülkemizde tüberkülozun durumu değerlendirildiğinde, hastalık insidansı açısından başarılı kontrol programı uygulanmış ülkeler ile, kötü programlar uygulamış ülkeler arasında bir konumumuz olduğu görülmektedir. Hastalık insidansı Avrupa ülkelerinin çoğunda yüz binde 20'den az iken, ülkemizdeki tüberküloz hastalık insidansı 2000 yılında Verem Savaş Dispanserlerine (VSD) kayıtlı hastalara göre hesaplandığında yüz binde 27'dir [6].

Dirençli tüberküloz olgularının artışı nedeniyle tüberkülozda standart tedavi yöntemleri her toplum için ayrı ayrı belirlenmesi zorunlu hale gelmiştir. Bir ülkedeki tüberküloz direnç oranlarının bilinmesi, o ülkede uygulanan tüberküloz kontrol programlarının etkinliği ve başarısının değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bugün artık tüberküloz hastalığı için her bir tüberküloz hastasını bulup, başarı ile tedavi etmek en temel çabadır. DSÖ' nün önerdiği hedef var olan tüberküloz olgularının %70'ini bulmak ve basil pozitif olguların % 85' inde tedavi sağlamaktır [5]. Veremle savaşta başlıca hedef hastalığın bulaşmasını önlemek, hastalanan kişilerin tümüyle iyileşmesini sağlamak, hastalığa yakalananların sayısını azaltmaktır. Bunun için yapılması gereken en önemli şey tüberküloz tanısının erken konmasıdır [7].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tüberküloz tüm dünyada insan sağlığını tehdit eden ve bilinen en eski enfeksiyon hastalıklarından olmasına rağmen günümüzde önemini hala koruyan bir hastalıktır. İnsanlık tarihi kadar eski bir hastalık olan tüberküloz hakkında ilk bilgiler İsa'nın doğumundan üç bin yıl önce Nil nehri kıyısında şimdiki adıyla Dar Abu-El Naga olan bir kasabada yaşayan ve kanlı balgam çıkararak ölen genç bir kıza kadar uzanmaktadır. İsa'nın ölümünden bin yıl önce yaşamış olan rahip Nesperihan'ın mumyasında pott apsesi bulunduğu saptanmıştır. Hipokrat M.Ö 460'lı yıllarda eski yunan literatürüne tüberkülozu yerleştirmiştir Günümüzden 2500 yıl önce Kos adasında yaşamış olan Hipokrat'ın kitabında tüberkülozun daha çok 18-35 yaşları arasındaki insanlarda görüldüğü yazılıdır [8]. İlk insanla birlikte var olduğu düşünülen bu enfeksiyon etkeninin M.Ö 4000 ila 2400'lü yıllarda eski Mısır'da Firavunlar döneminden kalma Thebes bölgesinde bulunan 85 mumyadan alınan organik materyalde tespiti yapılmıştır. Yine bu döneme ait kemik kalıntılarında tüberküloza ait lezyonların gösterilmesi, vazo ve testi gibi eserlerdeki resimlerde kemik lezyonlu hastaların tanımlanması bu dönemde hastalığın yaygınlığı ile ilgili bizlere önemli fikirler vermektedir [9]. Tüberküloz çok eski bir hastalık olmasına rağmen bilimsel olarak tanınması ve etkili savaşım yöntemlerinin geliştirilmeye başlanması XIX. Yüzyılın sonlarına doğru gerçekleşmiştir. XVIII - XIX. Yüzyıllarda Avrupa nüfusunun %70'i enfekte eden ve her yedi ölümden birinin sebebi olan tüberkülozun bulaşıcı bir hastalık olduğunu ilk olarak Fransız doktor Villemin 1865'te ortaya çıkarmıştır Tüm dünyanın dikkatini üzerine yoğunlaştırdığı bu görüşün kesinleşmesi ve etkenin gösterilmesi ise 24 Mart 1882 tarihinde Robert Koch tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tarih her yıl Dünya Tüberküloz günü olarak 24 Martta anılmakta ve çeşitli etkinlikler gerçekleştirilmektedir [10].

Tarih boyunca verem epidemileri çeşitli dalgalanmalar göstermiş: M.Ö 1500-750 yılları arasında Nil vadisinde, 1500-50 yılları arası Eski Yunan'da; 250-1500 yılları arası Amerika'da, 1000-2000 arasında da Avrupa'da epidemiler yapmıştır. Sığır tipi verem basili sonradan DNA'sını değiştirerek daha tehlikeli olan insan türüne (*Mycobacterium tuberculosis humanus*) dönüşmüş ve bu değişiklik nedeniyle insanlık büyük bir kıyım yaşamıştır [8]. Türkiye 'de tüberküloza ait ilk çalışmalar 8 Şubat 1895'te Sultan II. Abdulhamit'in emriyle Cemiyeti Tıbbiye-i Şahane'nin toplanarak Osmanlılarda Tüberküloz konusunu tartışmasıyla başlamıştır. İstanbul ve İzmir'de 1905 yılındaki tüm ölümlerin % 18.2' sinin tüberkülozdan olduğu saptanmıştır [11].

Günümüzde hala insanlık için bir tehdit unsuru olan bu hastalığa tarih boyunca birçok isim verilmiştir. Yakalanan kişiyi eriterek öldürdüğü için Tüketim Hastalığı (Consumption), Hastaların renklerini soldurduğu için Beyaz ölüm veya beyaz veba (White Death ; White plaque), yüz yıllarca bir çok kişinin ölümüne sebep olduğu için de ölümün kaptanı (Captain of the Death) olarak isimlendirilmiştir. Romalılar ise bu hastalığa hırıltılı nefes alıp verme ve öksürükle birlikte balgam çıkarma anlamında Phthisis adını vermişlerdir. Bu yüzden veremle ilgilenen doktorlara da Ftizyolog denmiştir. Bizim dilimizde ince hastalık en fazla kullanılan tanımdır [8].

2.2. Tüberküloz Epidemiyolojisi

Tüberküloz epidemiyolojisi, "tüberküloz basili ile insan ve onun toplum içerisindeki çevresi arasındaki etkileşimlerin çalışması" olarak tanımlanmaktadır [12]. Tüberküloz insidansı, 2. Dünya Savaşı'ndan sonra özellikle gelişmiş ülkelerde iyi planlanmış aşılama programları, erken tanı ve tedavi, artan hayat kalitesine bağlı olarak oldukça azalmıştır [13]. Bu bağlamda tüberküloz ile yoksulluk arasındaki bağlantı ön plana çıkmaktadır. Yoksullar güvenli gıda tüketiminden, sağlık hizmetlerine erişimden yoksun kalarak tüberküloz için çok uygun bir zemin oluşturmaktadır. Bu uygun zemin tüberküloz ile enfekte kişilerde hastalığın gelişmesine yol açmakta ve

yoksulluk yüzünden uygun olmayan koşullarda yaşamak zorunda kalan kişiler hastalığı yenmekte zorlanmakta ve bir kısır döngü oluşmaktadır. Tüberküloz sonuç olarak zaten az olan yoksulların yıllık gelirlerinde %20-30 azalmaya yol açmakta ve küresel olarak tüberküloz nedeniyle yıllık ekonomik kayıp 12 milyar Dolar'a erişmektedir. Hastalığın en önemli kaynağı, özellikle solunum yolları ile etrafa çok sayıda tüberküloz basili saçan insanlardır. Aile içi temaslar ve basillerle çok sık karşılaşan sağlık çalışanları damlacık enfeksiyonu ile bulaşmayı çok kolaylaştırır. Enfeksiyona uğrayan kişilerin ancak küçük bir bölümünde hastalık görülür. Tüberküloz daha önce hiç karşılaşmamış toplumlara girince, özellikle tehlikeli olmaktadır [14]. Ancak, özellikle son 20 yılda küresel bir artış göstermiştir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa ülkelerinde özellikle tüberküloz sıklığı yüksek olan ülkelere göçen insan sayısının ve evsizler için barınaklar, hapishaneler gibi toplu yaşam birimlerinin artması, AIDS olgularının ve ilaca dirençli tüberküloz suşlarının gittikçe artan bir hızla çoğalması, bağışıklığı baskılayan ilaç kullanımının yaygınlaşması, tüberküloz sıklığı artışından sorumlu tutulmaktadır [15].

Bu büyük sağlık tehdidine karşı korunma ve tedavi hala sınırlıdır. Dünya sağlık örgütünün bildirilerine göre her yıl yaklaşık olarak 60 milyondan fazla kişi enfekte olmakta, 8 milyon kişide aktif enfeksiyon gelişmekte ve 3 milyon kişi tüberküloz sebebi ile hayatını kaybetmektedir. Enfeksiyonun en sık görüldüğü organ akciğer olup öksürme ve hapşırma yoluyla diğer damlacık enfeksiyonları gibi bulaşırlar. Her biri ortalama 1-3 basil taşıyan damlacıklar akciğer alveollerine kadar ulaşıp enfeksiyona yol açar. Ailede bir kişinin tüberküloz olması durumunda diğer fertlerde tüberküloz gelişme riskinin %30 olduğu da bildirilmektedir. Bundaki büyük etken genetik yatkınlık ve aynı ortamın paylaşımıdır [16].

Gelişmekte olan ülkelere tüberküloza karşı korunmada BCG canlı aşısı kullanılır. Bu aşı kuvveti azaltılmış sığır tipi tüberküloz basillerinden yapılır. Bu aşılamanın amacı, virülen tüberküloz basilleri ile meydana gelen ilk

enfeksiyonun yerine, kişilerde tehlikesiz bir enfeksiyon yapmaktır. İstatistikler BCG aşısından sonra, sınırlı süreler için, hastalığa dirençte bir artma meydana geldiğini göstermektedir. Ancak BCG aşısı kullanımı ile ilgili bazı çekinceler vardır. Koruyucu etkinliği sadece 15 yıl kadar sürer. Önceden enfekte olmuş kişilerde BCG aşısı etkili olmaz. Çoğu gelişmiş ülke kitlesel BCG aşılamasını durdurmuştur. Ancak gelişmekte olan ülkelerde aşı doğumdan sonra mümkün olan en erken dönemde uygulanmaktadır. Yeni ve etkili tüberküloz aşıları geliştirmek için yapılan uluslararası çalışmalar devam etmektedir [17].

2.3. Basilin Yapısı ve Özellikleri

M. tuberculosis sporsuz, intrasellüler, endo ve ekzotoksini olmayan, kapsülsüz, kirpiksiz, ultra viole (UV), sıcaklığa, alkole duyarlı, soğuğa, kuruluğa, asit, alkali ve dezenfektanlara dirençli, kümeler halinde veya teker teker, ikili, üçlü gruplar halinde paralel ya da X, V, L, < şeklinde duran 0.4x3 µm büyüklüğünde olan uzun veya kısa çomakçıklardır. Hücre duvarında konak lizozomal etkilere korunmasını ve asit fast boyanmada kırmızı fuksin ile boyamayı da sağlayan mikolik asitce zengin fosfolipoglikan ve glikolipid bulunur. Ehrlich- Ziehl-Neelsen (EZN) asit fast boyama ile pozitif boyanma gösterir. Lowenstein Jensen (LJ) besi yerinde 6-8 haftada ürer [18]. Üremesi yavaştır. İkiye katlanma süresi 12-24 saattir. Kültür ortamında 2-8 ay, kuru balgamda 6-8 ay, toz partikülleri halinde havada asılı olarak 8-10 gün canlı kalabilir. Sıcaklığa, güneş ışığına, ultraviyole ışığa çok duyarlıdır. [19]. Mikobakteriler hücre yüzeyinin hidrofob oluşu ve basillerin kümeler halinde üremeleri nedeniyle kimyasal etkenlere diğer bakterilerden daha dirençlidirler. Tüberküloz basilleri kuruluğa oldukça dirençlidir. Toksinleri yoktur. Sağlıklı insanların dokularında yıllarca canlı kalabilir. Bunlar, virülan organizmaların konakçı vücuduna yerleşmesi, çoğalması ve konakçı ile karşılıklı ilişkileri aracılığı ile hastalık yaparlar [20].

Bu bakterileri üretmek için kullanılan besiyerleri arasındaki en eski yöntem LJ besiyerinde tuzlar, asparagine, gliserin, patates unu, yumurta sarısı ve akı ile malaşit yeşili vardır. Burada kolonilerin görülebilmesi için 37 °C en az 2-3 hafta bekletilmesi gerekir. Negatif sonuç verebilmek için besiyeri 6 hafta 37 °C inkübe edilir. Bunun dışında sıvı ve katı olmak üzere başka besiyerleri de vardır. Katı besi yerinde kenarları düzensiz olan R koloniler yaparlar. Bunların üremesi, gliserin bulunuşu halinde daha da artabilir. Üreyen kültürden izole edilen tüberküloz basilinin ilaca duyarlılığı incelenmelidir. Basil bir prokaryottur. Histonu olmayan, çıplak, çift sarmallı, tek DNA içeren basiller sitoplazmik membran ve hücre duvarından oluşur [20].

2.3.1. Basil membran ve duvar yapısı

Tüberküloz basilinin pek çok özelliğini sağlayan, en karmaşık ve ona temel işlev ve özelliklerini kazandıran yapısı hücre duvarıdır. Son derece yoğun lipofilik özellik, bu duvara tüberküloz basili için özgüllük kazandırırken, karmaşık bir kimyasal yapının da oluşmasına neden olur. Hücre duvarı üç makromolekülden oluşur; peptidoglikanlar, arabinogalaktanlar ve mikolik asitler. Mikolik asitler sadece mikobakterilerde bulunur.

Hücre duvarının basile sağladığı nitelikleri şöyle sıralayabiliriz.

- Hücrelerde bir araya toplanma eğilimi,
- Koruyucu bağışıklık,
- Konakçı hücreler tarafından salınan litik enzimlere karşı direnç,
- Aside dayanıklılık,
- Bakterisidal ilaçlara karşı direnç,
- İlaçların hücre içine girişine engel olma [21].

Mikropların aside dirençliliği onların hücre yapılarının çok lipidli olmasına bağlıdır. *M. tuberculosis* en iyi 37°C ürer. 37°C üreyen zorunlu aeroptur.

Mikobakteriler enerjilerini birçok basit karbon bileşiklerini oksitleyerek elde ederler. Fazla karbondioksit bulunuşu üremelerini artırır [22].

Mikobakteriler akciğerlerde, böbreklerde, bağırsaklarda, beyin zarında, lenf düğümlerinde, kemiklerde ve diğer organ ile dokularda yani bütün sistemlerde yerleşebilir. Bu bakımdan, çok çeşitli klinik belirtiler yapabilirler. Hastalığın belli başlı belirtileri; iştahsızlık, dermansızlık, zayıflama, gece terlemeleri ve ateştir. Akciğerlerin hastalanması halinde, süregen tipli bir öksürük olur. Daha çok ilerlemiş vakalarda kanlı balgam görülebilir. Hastalığın kesin tanısı, etkenin bu organ ve dokulardan alınan muayene maddelerinin (balgam, bronş alveolar lavaj, idrar, beyin omurilik sıvısı, irin, açlık mide suyu gibi) EZN yöntemi ile boyanıp mikroskopta görülmesi ve besiyerinde üretilmesi ile olur. Bu maddelerden idrar, BOS gibi diğer bakterilerle kirlenmemiş steril olduğunu düşündüğümüz materyalleri doğrudan besi yerlerine ekebiliriz. Ancak balgam gibi numuneler NaOH çözeltisi ile dekontamine edilerek ekime hazırlanır. Ekilen kültür 6 hafta boyunca 37 °C ayarlı etüvde inkübe edilir. Koloniler 2-3 hafta bekleme sonucu ürerler. Mikroskopta mavi alanda pembe çomakçıklar şeklinde görülür. İnsanların tüberküloz basili ile daha önce karşılaşp karşılaşmadığını tüberkülin deri testi, purifiye protein deriveleri (PPD) ile test edilir. Saf bir tüberkülin olan PPD' den 5 birim deri içine verilerek 48 saat içinde en az 10 mm çapında bir şişliğin gelişip gelişmediğine bakılarak karar verilir [23]. Tüberküloz basili vücudumuzda farklı kimyasal yapıya sahip ortamlarda farklı metabolik aktivitelerle yaşamını sürdürür. Oksijeni bol ortamda sürekli çoğalırken oksijensiz ortamda uyku ve yarı uyku durumuna geçerek, çoğalması en aza inmektedir. Basil kavite duvarı gibi alkali ortamlarda hızla çoğalırken, hücre içi asit ortamlarda yavaş metabolik aktivite göstermektedir [24].

2.4. Tüberkülozda Laboratuvar Bulguları

Önceleri, doğrudan mikroskopi ile basilin gösterilmesi, klinik bulgular ile uyum halinde olması tanıda yeterli görülmekte iken, 1950'li yıllardan itibaren kültür

yöntemleri de önem kazanmaya başlamış, mikobakteriyoloji laboratuvarlarının, hastalığın tanı ve tedavisinin yönlendirilmesinde önemli sorumlulukları olduğu kabul edilmiştir. Mikobakteriyoloji laboratuvarı; mikobakterinin mikroskopik olarak gösterilmesi, izole edilmesi, tür düzeyinde tanımlanması, antibiyotik duyarlılık testinin yapılması ile tanı ve tedaviye yol göstermelidir. Bütün bu yöntemler klasik mikrobiyolojik yöntemlerin dışında sadece tüberküloz basiline özeldir. Doğru olarak çalışılıp yorumlanması; deneyim, bilgi ve zaman gibi bazı donanımlara sahip olunması gerekliliğini ortaya koyar. *M. tuberculosis* kompleks tanımının en erken şekilde doğru olarak yapılması hastalığın kontrol altına alınması, hastanın tedavi sürecinin başlaması açısından son derece önemlidir [25].

Robert Koch (1882) tüberküloz basilini tanımlamış, bakteriyi mikroskopik olarak göstermiş, saf kültür olarak izole etmiş, laboratuvar hayvanlarında hastalığı oluşturmuş ve etken - hastalık ilişkisini ortaya koymuştur. Runyon (1959) yılında *M. tuberculosis* ve *Mycobacterium bovis* için ışıқта ve karanlıkta pigment oluşturma, üreme süresi ve koloni morfolojisi özelliklerini göz önüne alarak bir sistem içerisinde incelenmesini sağlamıştır [26]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Tüberküloz ve Akciğer Hastalıkları Komitesi (IUATLD) 1990 yılında mikobakteri laboratuvar hizmetini üç seviyeli olarak yapılmasını önermiştir.

Buna göre;

Düzyey I: Sadece mikroskopik inceleme,

Düzyey II: Mikroskopik inceleme + kültür + *M tuberculosis* kompleksinin tanımı,

Düzyey III: Mikroskopik inceleme + kültür + *M tuberculosis* kompleksinin tanımı + tüm *Mycobacteria* spp. tanımlanması + Antibiyogram + moleküler testlerin yapılmasıdır.

Laboratuvar kendi koşullarına göre bu üç düzeyden birinde çalışmalarını yapmalıdır [27]. *M. tuberculosis* basili; beyin omurilik sıvısı, plevra, periton

sıvısı gibi steril boşluklara ait sıvılar ve balgam, idrar, ciltteki yaralardan alınan örnekler olarak iki gruptur. Örnekler alındıktan sonra homojenizasyon ve dekontaminasyon işlemi uygulanır.

2.5. Tanı Amacıyla Uygulanan İşlemler

2.5.1. Doğrudan preparat:

Alınan örnek ya doğrudan doğruya ya da homojenizasyon işleminden sonra tek kullanımlık temiz lama yayılıp boyanarak incelenir. Mikobakterilerin hücre duvarında yer alan lipid miktarı, diğer bakterilere oranla çok fazla olduğu için, Gram ve diğer laboratuvar boyaları ile boyanmazlar. Pratikte en yaygın olarak kullanılan boya EZN yöntemidir. Boyanın bakteri içine girebilmesi için boyama sırasında hafif ısıtılması gerekir. Bakteri içine aldığı boyayı, asit alkol ile yapılan işlemde boyanın gitmesine rağmen geri vermez. O nedenle aside rezistan basil (ARB) olarak isimlendirilir. Boyanın son aşamasında metilen mavisi ile tüm zemin boyanır böylece pembeye boyanmış bakteriler mavi boyayı hücre duvarlarının lipid yapısından dolayı içlerine almazlar ve mavi zeminde kırmızı-pembe olarak net bir şekilde mikroskopta görülebilirler. Florokrom boya ile; koyu zeminde parlak sarı basiller olarak görülürler. EZN boyanın 1000x büyütme ile incelenmesine karşın, florokrom boya ile inceleme 250x veya 450x büyütmede yapıldığı için kısa sürede geniş bir alan taranabilmektedir. İki boya yönteminin birlikte kullanılması önerilmekle birlikte, özel mikroskop gereksinimi sebebiyle kullanımı yaygın değildir. İmmünofloresan mikroskopta ancak incelenebilir [28] .

Doğrudan mikroskopta bakteriyi görebilmek için örneğin ml' sinde 5000-10000 bakteri bulunması gerekir. Kültür kadar duyarlı bir yöntem olmamakla birlikte, çabuk sonuç alınması nedeniyle tanı değeri yüksektir [29].

2.5.2. Kültür

Modern tüberküloz kontrol programlarında, mikroskopik tanı halen önemini korumakla beraber, etken mikroorganizmanın spesifik tanısının yerini alamamaktadır. Bu nedenle bakteri kültür yöntemleri ile saptanmalıdır. Kültür yöntemleri ile 10-1000 bakteriyi saptamak mümkündür. Doğrudan preparatta görmek yanında, kültürde üretilmiş olması hastalık tanısını kesinleştirir. Kültür için kullanılan besi yerlerinden biri Lowenstein-Jensen besi yeridir. Bir diğer besi yeri Middlebrook sıvı besi yeridir [30].

Mikobakterilerin laboratuvar çalışmalarının en güç yönlerinden birisi, geç üremeleridir. İzolasyondan sonra, tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri için geçen süre de eklendiğinde, zaman çok uzamaktadır. Bu nedenle hızlı kültür sistemlerinin kullanımı önem kazanmıştır.

Son yıllarda yaygın olarak kullanılan hızlı kültür sistemleri sayesinde bakterinin varlığı kısa sürede saptanabilmektedir. BACTEC 460 ve MGIT 960 hızlı kültür sisteminde kullanılan otomatik ve yarı otomatik sistem cihazlardır. Bu sistemlerin diğer avantajlı yanı ise *M. tuberculosis* kompleksini saptayabilmek ve kısa sürede antibiyotik duyarlılık testini uygulayabilmektir. BACTEC sistemi özel cihaz gerektirmesi ve radyoaktif madde ile çalışması nedeniyle yeni arayışlara sebep olmuştur. Bu amaçla geliştirilen besiyeri Mycobacteria Growth İndicator Tüp (MGIT) leridir. Besiyeri içeren tüpün dibinde silikona gömülü floresan madde bulunur. Bu madde oksijen varlığında floresans vermez, ancak bakteri üreyip oksijeni tükettiğinde floresans oluşur. Bu şekilde bakterinin varlığı saptanır. MGIT tüplerinin kullanıldığı, BACTEC MGIT 960 (BD) sistemi; otomatik bir cihaz olup *M. tuberculosis* kompleks ayrımının yapılabilirdiği p-nitro-alfa-asetil amino-beta-hidroksipropiofenon (P-PNB) testi ve antibiyotik duyarlılık testide yapılabilmektedir. Her iki sistemde de üreme sinyali alındığında mutlaka EZN boyası ile boyayıp bakteri görülmelidir. Hızlı kültür sistemleri; 1-4 haftada sonuç alınabilmesi, antibiyotik duyarlılık testinin ve, *M. tuberculosis* kompleks

ayrımının yapılabilmesi açısından diğerlerine göre avantajlıdır [31].

2.6. Tedavi

Tüberküloz tedavisi; hastayı iyileştirmek, aktif tüberkülozun geç etkilerini ve ölümü önlemek, tekrarı önlemek, diğer insanlara bulaşmasını önlemek ve kazanılmış ilaç direnci gelişmesini önlemeyi amaç edinmiştir. Tedavide uyulması gereken ilkeler vardır ve bunlar yerine getirilmemesi yetersiz ve yanlış tedavi girişimleri hastalığın kronikleşmesine ve daha olumsuz bir sonuç olarak dirençli hastalık formlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. ilaç tedavisi oldukça etkili olmakla birlikte en önemli etkenlerden birisi başvuru anında hastalığın evresidir [32]. Semptomlar ateş soğuk algınlığı ve öksürüğe eşlik eden plevra ağrısı, kilo kaybı ve yorgunluktur. Semptomlar akut veya kronik olabilir.

M. tuberculosis yavaş büyüyen, çoğalmadan uzun süre canlı kalabilen, hücre içinde yerleşme eğilimi gösteren, direnç gelişimi olabilen bir basildir. Bu nedenle tüberküloz tedavisi, diğer enfeksiyonlara göre farklı zorluklar gösteren, uzun süreli ve kombine bir tedaviyi gerektirir. Bu özelliklere dikkat edildiği durumda tedavinin başarısı %95'in üstündedir. Başarısızlığın en önemli nedeni ise hastaların tedaviye uyum göstermemesi ve yan etkilerdir [33]. Tedavi için beslenme ruh ve beden dinlenmesi önemlidir. Son 40 yılda birincil seçenek olarak yeni bir ilaç bulunamamıştır ve yine son yıllarda HIV epidemisi ile yeniden önem kazanan tüberküloz epidemisinde bir diğer sorunda çoklu ilaç direnci gösteren suşların popülasyondaki artışıdır. Tüberküloz basilinde herhangi bir antitüberküloz ilaca karşı direnç sıklıkla lezyonlardaki bakteri popülasyonu büyük olduğunda ve tek ilaçla tedavi uygulandığı zaman oluşur [34]. Tüberküloz kemoterapisinin geliştirildiği 1950 yılından sonra, BCG aşısı ve anti-tüberküloz ilaçların kullanılması ile tüberküloz basilinin eradike edilebileceği düşünülmüş ancak hastalığın birkaç yıl kontrol altına alınmasından sonra, özellikle son 20 yılda birçok ülkede çoğul ilaçlara dirençli (en az isoniazid ve rifampine karşı oluşan direnç)

tüberkülozda artma olmuştur. DSÖ, 2000 yılında bakteriyolojik olarak doğrulanmış tüberküloz olgularının %10'unun çoğul ilaçlara dirençli suşları ile enfekte olduğunu açıklamıştır. Özellikle çoklu dirençlilik gösteren tüberküloz basiliyle enfekte hastaların artması, tanı ve duyarlılık testlerinin uzun zaman alması hastalığın tedavisinde ve kontrolünde sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüberkülozun etkin tedavi şekli ancak tedavi dozlarının, gerekli süre içerisinde sıkı disiplin altında kullanımı ile mümkündür. Uygun tedavi dozlarının seçimi ise standardize edilmiş, hızlı ve doğru yorumlama özelliklerine sahip duyarlılık yöntemlerine bağlıdır. Günümüzde antitüberküloz ilaçlara karşı meydana gelen direnç mekanizmaları anlaşılmaya başlanmış, dirençten sorumlu genlerin bazıları bulunmuştur. Moleküler yöntemlerle direnç genindeki mutasyonun varlığı tespit edilip, ilacın duyarlılık sonucu kısa sürede saptanabilmektedir [35].

Tüberkülozun dünyada artmasının önemli bir nedeni HIV epidemisi'dir. HIV ile ilişkili tüberküloz olguları, 1980'lerden sonra başta Afrika olmak üzere birçok ülkede artmıştır. HIV enfeksiyonundan dolayı bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde önceki tüberküloz enfeksiyonu kolayca reaktif olmaktadır. *M. tuberculosis* ile enfekte olan, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde, hayatının herhangi bir döneminde tüberkülozun gelişme riski %10 iken HIV enfeksiyonlularda bu oran her yıl için %10'dur. DSÖ'ne göre, 2003 yılında HIV ile enfekte hastalarda 674 000 (11/100 000) yeni tüberküloz olgusu saptanmıştır [35]. Bunların dışında bugün kullanılan en etkili antitüberküloz ilaçlar, izoniazid, ethambutol, streptomisin, rifampin ' dir [36]. Fakat ne yazık ki, bu ilaçların her birine karşı hızlı dirençli tüberküloz basilleri meydana çıkmaktadır. Bunun nedeni uygun olmayan, düzensiz, yarım kalmış tüberküloz tedavisidir [37]. En başarılı sonuçlar bu ilaçların (örneğin: streptomisin+izoniazid; izoniazid + ethambutol;streptomisin+izoniazid gibi) çeşitli kombinasyonları halinde kullanılması ile alınabilir. Bu şekilde yapılan tedavi ile, dirençli şekillerin meydana gelişi geciktirilebilir. Yayma negatif olan tüberküloz hastalarında ise Dünya Sağlık Örgütü üç ilaçla tedavi önermiştir [38]. Ülkemizde bu hastalar için dört ilaçla tedavi önerilmiştir. Bu kararın en

önemli nedeni ilaç direnci oranlarının yüksek olmasıdır [39]. 2 ay Streptomisin (SM)+ Isoniazid (INH) + Rifampisin (RIF) + Ethambutol (EMB) ve 7 ay INH+RIF olmak üzere toplam 9 aylık tedavi uygun görülmüştür [39]. İlaçlar enfeksiyonun durdurulmasında etkilidirler ancak basilleri yok edemezler. Hastalığın kontrolünde, konakçıya ait faktörlerin de büyük önemi vardır. Tüberküloz basilleri hücreler içinde bulunurlar ve streptomisin gibi ilaçlar hücrelerin içine kolayca giremezler, lezyonlardaki peynirleşmiş maddeler, ilaçların etkisini önlerler, bazı lezyonlarda fibröz çeperler vardır; bunlarda ilaçların lezyonlara ulaşmasını engeller. İşte bu şekilde ki bazı sebeplerle ilaçlara karşı basillerin direnç kazandıkları ileri sürülmüştür [40].

2.6.1. Tüberküloz tedavisinde ilaç direnci gelişiminin mekanizması

M. tuberculosis bakterisinde ilaca karşı gelişen direnç, kromozom mutasyonları ile olmaktadır [41]. Bir basil topluluğunda ilaç kullanımından bağımsız olarak her ilaca karşı dirençli basiller bulunmaktadır. Bu basillere dirençli mutant basil denmektedir. Örneğin daha önce ilaç ile karşılaşmamış 1 milyon basil bulunan bir bakteri topluluğunda INH' a karşı dirençli bir mutantın olması halinde, bu basil topluluğu INH ile karşılaştığında 1 tane dirençli mutant basil dışındaki tüm basiller yok olacak, ancak dirençli olan tek bir basil yaşamaya devam edecektir. Çoğalmaya devam eden bu dirençli basil, bir süre sonra milyonlar ile ifade edilen sayılara ulaşarak lezyona egemen hale gelecektir.

Örneğin 1 milyar basil bulunan bir kaviter lezyonda, 1 000 ile 10 000 adet arasında tek bir ilaca dirençli basil bulunabilmektedir. Öldürülmeyen dirençli mutant basil giderek çoğalır ve hakim populasyon halini alır. Burada önemli nokta, sözü edilen dirençli basillerin henüz ilaç tedavisi başlanmamış bir hastada, tedavinin başlangıcında bulunmasıdır. Bir ilaca karşı kendiliğinden dirençli bulunan basil genellikle diğer ilaçlara duyarlıdır ve bu da tüberkülozda kombine tedavinin yani birden fazla ilaç tedavisinin temelini oluşturmaktadır [42].

İlaçla tedaviye başlandığında, lezyonlardaki canlı basil sayısının yüksekliği de direnç oluşma ihtimalini arttırmaktadır. Bu bakımdan en büyük risk kaviteli pulmoner lezyonlarda, en az risk ise basil sayısının çok az olduğu tüberkülomlardadır [42]. Çok ilaca dirençli (ÇİD) basiller en azından INH ve RİF 'e dirençli olan basillerdir. Bu iki ilaç antitüberküloz tedavinin ana ilaçları olduğu için ÇİD bu gün bakteriyel direncin en şiddetli şeklidir. ÇİD tüberküloz, hastalığın kontrolü açısından önemli bir sorundur (6). Tüberkülozda daha önce ilaç almış olmak direnç riskini belirgin olarak artırır [43]. İlaç direncinin daha önceki tedavinin uzunluğu ile orantılı olarak arttığı da ispatlanmıştır [44].

2.6.2. İlaça direncin ortaya çıkmasının nedenleri

- a- Multibasiller pulmoner tüberküloz vakalarında yetersiz kemoterapi reçeteleri (INH'e başlangıç dirençli bir yeni ARB(+) hastada tedavinin başlangıç fazında 2-3 ilaç verilmesi)
- b- Tedavi başarısızlıklarında bir başka ilaç eklenmesi.
- c- hastanın yeterli bilgiye sahip olmaması.
- d- Tedavinin doğrudan gözlem altında olmaması.
- e- Ekonomik olarak ilaç teminindeki zorluk.
- f- İlaçların kullanımının uzun sürmesi.
- g- Kullanılan ilaçların ayarlanmalarının iyi yapılmaması [6].

2.7 . Tüberküloz Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

2.7.1. İzoniazid (INH)

İzoniazid 1951 yılında geliştirilmiş ve tedavi kombinasyonlarına girmesiyle tüberküloz tedavi edilebilen bir hastalık haline gelmiştir. Sadece *M. tuberculosis* üzerine etkili olup tüm tüberküloz tedavi rejimlerinde diğer ilaçlarla kombine şekilde kullanılır. Uyuyan basiller üzerine bakteriyostatik, hızlı üreyen basillere de bakterisit etki yapan bu ilacın etki mekanizması

kesin bilinmemektedir. Diğer ilaçlara göre daha yavaş direnç gelişimi söz konusu olduğundan korunma amaçlı tek başına kullanılabilir. Karaciğerde metabolize edilen ilaç beyin omurilik sıvısına ve anne sütüne geçer. Yan etkileri ciltte döküntü, ateş, sarılık, kaşıntı, baş ağrısı ve uykusuzluktur.

2.7.2. Streptomisin (SM)

Düşük dozlarda bakteriyostatik, yüksek dozlarda bakterisit etki gösterir. Tüberküloz odakları üzerinde baskılayıcı etkisi vardır. Bakteri hücresinin ribozomu ile birleşerek protein sentezini engeller. Yan etkileri baş ağrısı, baş dönmesi, kızarıklık, kaşıntı, kusmadır.

2.7.3. Etambutol (EMB)

Tüberkülostatik bir ilaçtır. Çoğalma dönemindeki mikobakteriler üzerine etkilidir. Uyuyan mikobakteriler üzerine etkisi yoktur. Antitüberküloz etkinliği INH ve RF göre daha düşüktür ancak direnç gelişimini önlemek için kombinasyona eklenir. Etkisini mikolik asitin hücre duvarına bağlanmasını inhibe edip hücre duvar sentezini bozarak göstermektedir. Tek başına kullanılırsa diğer antitüberküloz ilaçlarda olduğu gibi etambutole de direnç gelişir ancak bu direnç INH 'a göre daha geç ortaya çıkar. Beraberinde kullanılan ilaçlara direnç gelişimini azaltması ilacın değerini artırır ve antitüberküloz tedaviye direnç gelişmesini önlemek ve geciktirmek için eklenir. Yan etkileri azdır. Baş ağrısı, eklem ağrısı ve ciltte alerjik döküntüler görülebilir.

2.7.4. Rifampisin (RF)

Rifampisin tüberküloz tedavisinde INH ' den sonra ikinci önemli ilaçtır. 1966 ' da keşfedilmiştir. Etki spektrumu dardır. Stafilokoklar, anaerobik gram negatif bakteriler ve mikobakteri enfeksiyonlarında kullanılır. *M. tuberculosis* 'in RNA sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösterir. Uyuyan ve hızla çoğalan

mikobakteriler üzerine etkilidir. Diğer antitüberküloz ilaçlara oranla direnç gelişimi daha yavaştır. Rifampisin anne sütüne geçer. İdrar, ter, gözyaşı balgam gibi vücut sıvılarını turuncu-pembe boyar. Gebelere ilk üç ayda verilmemelidir. Yan etkileri seyrektr. Bulantı, kusma, karın ağrısı, baş ağrısı, uyuşukluk ve kırgınlık gibi etkileri görülebilir [45] .

Bağıışıklık yetmezliğı olan kişilerin özellikle tüberküloz gibi tedavisi zor ve bulaşııcılığı fazla olan enfeksiyonlara yatkınlığı fazladır. Bu nedenle HIV ile enfekte olan kişilerde tüberküloz görölme riski de artmıştır. DSÖ, HIV ve tüberkülozun beraber görölme oranının yüksekliğı nedeniyle bu tabloyu "iki hastalık bir hasta" olarak tanımlamış, korunma yöntemleri ve tedavi prensiplerinde iki hastalığın beraberliğini göz önünde bulundurmuştur. Ayrıca, karaciğer transplantasyonu ve kemik iliğı nakli yapılan kişilerde de immünsüprasif ilaçlar kullanıldığı için tüberküloz gelişimine yol açabilmektedir.[46].

Damlacık enfeksiyonu ile bulaşan tüberkülozda her bir damlacık partikölünde 1 ila 3 arasında basil bulunur. Solunum yoluyla alveollere ulaşan basiller alveollerde makrofajlar tarafından fagozite edilir. Basilin fagozite edilmesinin ardından ortama sitokinler ve kemokinler salınır, böylece ortamda nötrofil, monosit, ve lenfosit artmasına yol açar. Monositler bakteriyi elimine edemezler, lenfokinlerin etkisiyle monositler epiteloid hücrelere ve çok nükleuslu dev hücrelere dönüşerek basili çevreleyip, alveollerde hapsedip, lokal yayılmasını önleyen bir duvar oluştururlar. Bazı vakalarda, başlangıçta bakteriyi fagosite etmiş olan monositler lenfatik dolaşım ve sistemik sirkülasyon yoluyla farklı organlara ulaşabilir. Bağıışıklık sistemi sağlıklı olan kişilerde bakterileri içeren hücreler, epiteloid hücreler ve T-hücreleri ile çevrelenmiş olarak sessiz formda bulunur [47].

Özellikle çok ilaca dirençli tüberküloz basiliyle enfekte hastaların artması, tanı ve duyarlılık testlerinin çok zaman alması hastalığın tedavisinde ve kontrolünde sorun olmaktadır. Tüberkülozun etkin tedavisi uygun tedavi

disiplinine gerektiği gibi uyulmakla sağlanabilir. Tedavi disiplinini sağlamak için her hastanın düzenli olarak takip edilmesi ve kontrolünün sağlanması gerekir. Ancak bu şekilde etkili bir tedavi sağlanmış olur [48].

2.8. Korunma

BCG aşısının tüberküloz enfeksiyonundan koruyucu etkisi yoktur, basilin kan ve lenf sistemi yoluyla yayılımını engeller. Bu nedenle aşının tüberküloz basilinin diğer komplikasyonlarını azalttığı üzerinde durulmaktadır. Örneğin çeşitli vaka kontrollü çalışmalarda BCG aşısının menenjit tüberkülozu önlemedeki etkisinin yaklaşık %75-85 olduğu, aşısız çocuklarda menenjit tüberküloz gelişme olasılığının 5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de BCG'nin tüm yaş gruplarında koruyuculuğu 1981-82 yıllarında yapılan prevalans çalışmasının verilerine göre %72.7 bulunmuştur; özellikle de 0-6 yaş grubunda %85 olarak hesaplanmıştır [49]. Tüberküloz önlenabilir ve tedavi edilebilir bir hastalık olmasına rağmen, yaşam kalitesini bozan ve ölüm oranı yüksek olan hastalıklardan birisidir. Ülkemizde tüberküloz oranı, 2000 yılında Verem Savaş Dispanserine kayıtlı hastalara göre hesaplandığında yüz binde 27'dir. 2003 yılında Verem Savaş Daire Başkanlığı tarafından DSÖ'ne bildirilen yeni hasta sayısı 18 555 'dir [50].

Tüm tüberküloz vakalarının %80-90'ında hastalık akciğerde ortaya çıkar, %15-20 vakada ise akciğer dışı organlarda tüberküloz görülür. Akciğer dışı tüberküloz vakalarının bir çoğu akciğerdeki tüberküloz enfeksiyonunu takiben ortaya çıkar. Tüberküloz, *M. tuberculosis*' in primer olarak sindirim veya solunum yoluyla vücuda girmesiyle geçer. Daha sonra lenfojen, hematojen veya komşuluk yoluyla diğer doku ve organlara yayılır. Lenfatik sistem, plevra, periton, santral sinir sistemi, genitoüriner sistem, kemikler, eklemler ve gastrointestinal sistem sık tüberküloza tutulan organlardır [51].

Primer enfeksiyon sonrası akciğerlerden birçok organa yayılan ve aktiflikleri vücut tarafından durdurularak uyku dönemi haline getirilen tüberküloz

basillerinin aktivite kazanması sonucu meydana gelen organ tüberkülozlarının tümü erişkin tipi tüberküloz olarak adlandırılır. Hayatının herhangi bir döneminde tüberküloz basili ile enfekte olmuş kişilerin %10'unda hayatlarının belli dönemlerinde tüberküloz hastalığı gelişme riski vardır. Bu oran ilk iki yıl içinde %5, geri kalan yıllar içinde %5' tir. Hastalığın gelişimi için tüberküloz basilinin bağışıklık sisteminin savunmasını yenmesi ve çoğalması gerekmektedir [52].

İlaç direnci gelişen tüberküloz vakaları şu anda dünya da en önemli problemlerdendir. İki veya daha fazla ilaca karşı direnç gelişimi sıktır. Özellikle izoniazid ve rifampine karşı direnç gelişimi oranının %44 lere kadar çıktığı bildirilmektedir [53]. Hastalığın gelişimini artıran durumlar Çizelge 2.1'de verilmiştir [54].

Çizelge 2.1. Enfekte kişide tüberküloz hastalığının gelişimini arttıran durumlar

Özgün bağışıklığın azalması	Lokal direnç azalması
Enfeksiyonun Yeni Gelişmiş Olması (2 yıldan az) Uzun Süreli Kortikosteroid Kullanımı, Bağışıklığı Baskılayan Tedaviler, Lösemi, Lenfoma, HIV Enfeksiyonu Baş boyun kanserleri, Diğer Sistem Kanserleri Canlı Virüs Aşısı, Transplantasyon, Sarkoidozis, Hormonel Etkiye Bağlı Direnç Azalması Gebelik, Diabetes Mellitus, Lohusalık	Yetersiz tedavi Diğer Nedenler: Sigara Bağımlılığı, Vücut Ağırlığının İdeal Ağırlığa Göre %5'ten, düşük olması. Uyuşturucu Kullanımı, Kronik Böbrek Yetmezliği, Hemodiyaliz uygulanması.

2.9. Fosfazenler

Fosfazenler, kimyasal yapıları $-P=N-$ birimlerinden oluşan ve fosfor atomlarının her birinde iki sübstitüent bulunduran düz zincirli $[(R)HN=PX_3, X_2P(Y)N=PX_3(R: \text{alkil}; X: \text{halojen, alkil, aril, alkoksi, amino}; Y: O, S)]$, halkalı $[(NPX_2)_n (F, Cl, Br: n=3-12)]$ ve polimerik $[X_2P(Y)-(N=PX_2)_n-N=PX_3 (R=\text{alkil}, X=\text{halojen, alkil, aril, alkoksi, amino}; Y=O, S)]$ bileşiklerdir. Özellikle heksaklorosiklotrifofazenin ($N_3P_3Cl_6$, trimer) sübstitüsyon reaksiyonları geçmişten bu yana ilgi çeken bir konu olmuştur. Trimerin iki dişli ligandlarla (dioller, diaminler, poliaminler) olan reaksiyonları sonucunda *spiro-*, *ansa-* ve *bino-* fosfazen türevleri oluşmaktadır. Oluşan bu türevlerin de *spiro-spiro*, *spiro-bino-spiro*, *spiro-ansa-spiro* vd. bileşikleri verebilecekleri ve bu

bileşiklerin de bir karışım halinde olacağı açıktır.

İlk fosfazen bileşiği, 1834 yılında Wohler ve Rose'nin fosforpentaklorür ile amonyumklorürün reaksiyonlarından elde edilmiştir [55]. Takip eden ilk 50 yılda çok fazla bir çalışma yapılmamıştır. Daha sonra Gerhardt, Laurent, Gladstone ve Wichelhaus, bu bileşiklerden trimeri, $(\text{NPCl}_2)_3$, izole ederek yapısını açıklamışlardır. Amerikalı kimyacı Stokes, 1895 -1898 yılları arasında yaptığı çalışmalarda, $(\text{NPCl}_2)_n$ yapısındaki bu bileşiklerden $n=4, 5, 6$ ve 7 olan bileşikleri izole etmiş ve bu bileşiklerin ısıtıldıkları zaman elastomerik yapıda polimere dönüştüklerini belirtmiştir.

Fosfazen kimyasında 1950'li yılların ortalarında, sentez tekniklerinin ve enstrümental tekniklerin gelişmesi ile birlikte sübstitüsyon reaksiyonları, yapı tayinleri vb. çalışmalar hız kazanmıştır. Özellikle, düz zincirli yapıdaki poli(diklorofosfazen) bileşiğinin Allcock ve Kugel tarafından 1965 yılında sentezlenmesinden sonra bu bileşiklerin polimerleri konusunda çok hızlı bir gelişme kaydedilmiştir[56]. 1960'lı yılların başından beri bir taraftan alkoliz, aminoliz, organometalik vb. bileşiklerle sübstitüsyon reaksiyonları, diğer taraftan polimerlerinin sentezi ve bu bileşiklerin kullanım alanları konusundaki çalışmalar artan bir hızla devam etmektedir.

Fosfazenler, endüstriyel ve tıbbi alanlarda da önemli bir yer tutarlar. Fosfazen türevleri ve fosfazen polimerlerinin kullanım alanları yarı iletkenler, sıvı kristal materyaller, non lineer optik ve yüksek kırılma indeksine sahip camlar, biyolojik uyumlu materyaller, yanmaz fiberler, filmler olarak verilebilir. Polifosfazenlerin bağlanan yan grupların özelliğine göre yanmaya, radyasyona, sıcaklık, indirgen ve yükseltgenlere karşı dayanıklı olmaları ve elektrokimyasal işlemlerde kullanılabilmeleri bu maddelere büyük önem kazandırmıştır. Ayrıca aminofosfazenlerin tetrapirolidin türevlerinin anti-bakteriyel [57] ve HIV virüsüne [58] karşı aktiviteye sahip maddeler oldukları

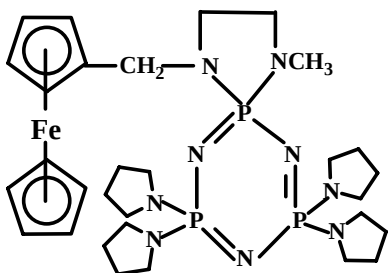
belirlenmiştir. Yapılan son çalışmalarda bu bileşiklerin düşük toksiditeye sahip olmalarından dolayı kemoterapik uygulamalarda önemli avantajlar sağladığı belirtilmiştir [59]. Tümör önleyici etkisi nedeniyle halkalı etilendiamin bileşiği olan aziridin ve pirolidin sübstitüentleri içeren siklofosfazen türevleri özellikle önem kazanmaktadır. Bu bileşiklerin, diğer aziridinil grubu içeren hücrel aktif bileşikler gibi kemik iliklerinde birikerek zehir etkisi göstermesi ve hücrel nükleofillerle olan tesadüfi reaksiyonlar gibi dezavantajları vardır. Bu istenmeyen durumları ortadan kaldırmak ve aziridinilsiklofosfazen türevlerinin tedavi edici etkisini artırmak amacıyla çalışmalar devam etmektedir. Labarre ve grubu poliaminlerden elde edilen doğrudan tümör üzerinde etkili bileşikler ile seçiciliği artırmayı hedeflemektedir. van de Grampel ve çalışma arkadaşları hücrel aktivitenin R sübstitüentlerinin elektron verme gücü ile orantılı olduğunu belirlemişlerdir. Aromatik okso ve amino gruplar aziridinilfosfazenlerin hücrel özelliklerini sübstitüentler arasındaki molekül içi elektronik etkileşimler yolu ile değiştirmektedir. Aynı zamanda 1-aziridinil gruplarının DNA ile etkileşme yapabilen karbokasyonlara dönüşümlerini kolaylaştırmaktadır. Karbokasyon oluşumu aziridinil içeren ilaçların hücrel aktifliklerini daha çok artırmaktadır [58]. Ayrıca fosfazen türevlerine supramoleküler bileşikler oluşturabilecek potansiyel bir kaynak olarak da bakılmaktadır [60]. Fosfazenlerin ana iskeletini oluşturan $P=N$ bağları, çok kuvvetli bağlardır, bu nedenle sıcaklık, radyasyon, indirgen ve yükseltgenlere karşı dayanıklıdır. Fosfor atomu üzerindeki sübstitüentlere bağlı olarak halkalı fosfazenler ve açık zincirli polifosfazenlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri değişmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

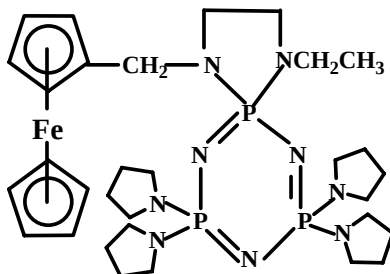
3.1. Materyal

3.1.1. Fosfazenler

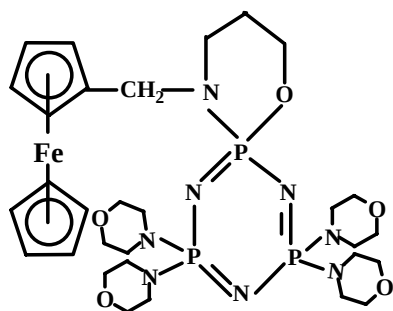
Araştırmada materyal olarak kullanılan **Fosfazenler** Ankara Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Zeynel Kılıç ve Nuran Asmafiliz tarafından sentezlenmiştir. 7 farklı fosfozen bileşiği NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddeleri ve çözücü olarak dioksan kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan maddelerin kimyasal yapısı aşağıda verilmiştir:



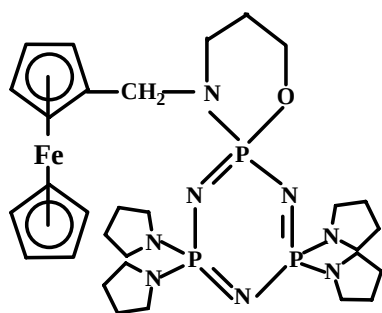
NA7



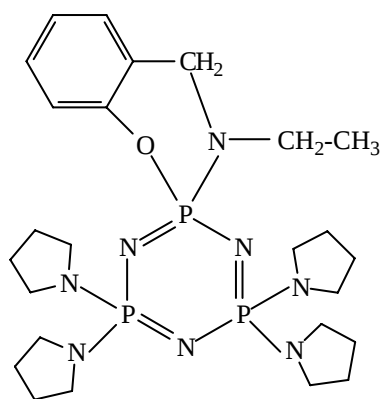
NA8



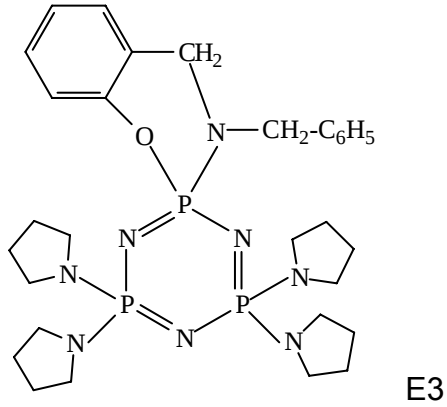
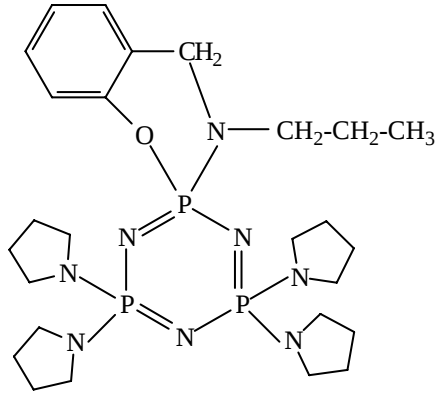
NA9



NA12



E1



3.1.2. Mikroorganizmalar

Bu çalışmada Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi tüberküloz laboratuvarına gelen örneklerden; *M. tuberculosis* kültür pozitifliği ve çok ilaca dirençliliği saptanan altı suş ve bütün antitüberküloz ilaçlara duyarlı olduğu bilinen kontrol suşu *M. Tuberculosis* ATCC H37rv ve ayrıca *E.coli* ATCC 25922, *E. feacalis* ATCC 292112, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* NRRL-B-3711, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. vulgaris* ATCC 8427. *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 13803, *P. Aeruginosa* ATCC 27853 mikroorganizmaları kullanılmıştır.

3.1.3. Biyolojik aktivite çalışmaları için kullanılan tampon ve çözeltiler

- *Stok Tris çözeltisi:* 500 mM Tris (pH: 8.0)
- *Stok EDTA tamponu:* 500 mM EDTA (Etilendiamin-tetra asetik disodyum tuzu), 5M NaOH (pH: 8.0)
- *TE tamponu:* 10 mM Tris (pH:8), 1mM EDTA (pH:8)
- *Agaroz:* % 0,8 ve % 2 (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanır.
- *Tris asetat (TAE) tamponu:* 242g Tris base, 57,1 ml Glasiyal asetik asit, 100 ml 0,5M EDTA (pH:8), saf su
- *Yükleme tamponu:* % 40 sukroz, % 0,025 bromfenol mavisi, % 0,25 ksilen siyanol
- *Etidyum bromür:* 10mg/ml derişimde hazırlanır. Koyu renkli şişelerde muhafaza edilir.
- *Muller Hinton Broth*
 Et ekstresi.....2,0 gr
 Kazein hidrolizati.....17,5 gr
 Nişasta.....1,5 gr
 Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.
 121 °C basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 10'ar ml steril tüplere dağıtılmıştır.
- *Muller Hinton agar*
 Et ekstresi.....5,0 gr
 Agar.....12,0 gr
 Kazein hidrolizati.....17,5 gr
 Nişasta.....1,5 gr
 Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır
 121 °C basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve 15'er ml 90 mm çapındaki steril petrilere dağıtılmıştır.
- *Sabouraud Dextrose Agar*
 Bacto pepton.....10,0 gr

Bacto Dekstroza.....40,0 gr

Bacto Agar.....15,0 gr

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır

121 °C de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir

- *TTC Tuzu*

2,3,5- Triphenyltetrazolium chlorid.....250 mg

Etanol (%96).....100 ml

Madde tartılarak etanol de iyice çözülmüş ve spreya özellikli cam şişe içinde buzdolabında saklanmıştır.

- *Mc Farland No: 0,5 bulanıklık standardı*

BaCl₂ (%1,175).....0,5 ml

H₂SO₄.....99,5 ml

BaCl₂ ve H₂SO₄ karıştırılarak 15 ml'lik kapaklı tüplere dağıtılır. Kapağı parafilm ile kapatılan tüp, karanlıkta oda sıcaklığında saklanır.

BACTEC MGIT 960 Çalışmada Becton Dickinson Diagnostic Instrument (BACTEC) metodu ve MGIT 960 cihazı kullanılmıştır. MGIT 960 sistemi, floresans veren bir indikatörün bulunduğu tüplerde bakterilerin üretilmesi esasına dayanmaktadır. Mikobakteriler üredikçe tüpteki oksijenin tüketilmesine bağlı olarak indikatör serbest kalmakta ve floresans açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan floresans cihaz tarafından otomatik olarak ölçülmekte ve sonuçlar verilmektedir [61].

3.2. Yöntem

3.2.1. Agaroz jel elektroforezi

% 2 (w/v) agaroz, TAE tamponu içinde kaynatılarak çözüldükten sonra 1 µl etiyum bromür çözeltisi eklenmiş ve jel tabağına dökülmüştür [Maniatis ve ark. 1989]. Jel polimerleştikten sonra 15 µl PZR ürünü ile yükleme tamponu karıştırılarak jelde oluşan kuyucuklara yüklenmiş ve 40-90 V arasında

serbest akımda yürütülmüştür. Jellerin görüntülenmesi BioDoc Analyze (Biometra) görüntüleme cihazında yapılmış ve bilgisayar ortamında fotoğrafları alınmıştır.

3.2.2. Antimikrobiyal aktivite

Disk difüzyon yöntemi

Önce 120 mm çapındaki steril cam petrilere steril edilmiş 25 ml Sabouraud Dextrose Agar (SDA) dökülmüş ve petri düz bir zemin üzerinde donmaya bırakılmıştır. Besiyeri'nin katılaşmasından sonra önceden hazırlanmış spor çözeltisi (10^7 spor/ml) 500 µl besiyeri yüzeyine aktararak drigalski spatülü ile sporların besiyerine yayılması sağlanmıştır. Daha sonra steril kabin içinde kapağı yarı açık halde kurumaya bırakılmıştır. Yüzeyi kurumuş olan besiyerine önceden hazırlanmış olan, stok çözeltilerden 5µl emdirilmiş yaklaşık 6mm çapındaki steril kağıt diskler yerleştirilmiştir. Standart antifungal olan ketokonazol pozitif kontrol olarak kullanılmıştır [Demirci ve ark. 2002].

Çizelge3.1.Biyolojik aktivite için kullanılan mikroorganizmalar ve kaynakları

	Mikroorganizma*	Suş No	Ortam	Sıcaklık	
1	<i>Eschericia coli</i>	ATCC 35218	MHA	37 °C	Patojen
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	MHA	37 °C	Patojen
3	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	ATCC 27853	MHA	37 °C	Patojen
4	<i>Enterococcus feacalis</i>	ATCC 292112	MHA	37 °C	Patojen
5	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 8427	MHA	37 °C	Patojen
6	<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803	SGA	37 °C	Patojen
7	<i>Bacillus cereus</i>	NRRL B-3711	MHA	37 °C	Patojen
8	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	MHA	37 °C	Patojen
9	<i>Eschericia coli</i>	ATCC 25922	SGA	37 °C	Patojen
10	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	MHA	37 °C	Patojen

MHA: Mueller Hinton Agar, SGA: Sabouroud Dextrose Agar

3.2.3. Dekontaminasyon ve homojenizasyon

Örnekler içinde Sodyum Hidroksit - Sodyum Sitrat çözeltisinin olduğu tüpe aktarılır. Vorteks ile çalkalanarak örneğin homojenize olması sağlanarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Örneğin üzerine 50 ml kadar fosfat tamponu doldurup 15 dakika 4000 rpm' de santrüfjü edilir. Üst sıvı dökülür alt kısım alınarak üzerine 5 ml fosfat tamponu ilave edilerek homojen hale getirilir

3.2.4. MGIT 960 çalışma akışı

MGIT 7 ml tüpüne 0,8 ml Growth Supplement /MGIT PANTA Antibiyotik Karışımı ilave edilir. Dekontaminasyon yapılmış materyalden (0,8 ml Growth Supplement /MGIT PANTA Antibiyotik karışımı eklenmiş) MGIT tüpüne 0,5 ml ilave edilir. Tüpün kapağı sıkıca kapatılıp bir defa alt üst edilir ve cihaza yerleştirilir. Üreme saptandıktan sonraki 1-2 günde antimikrobiyal aktivite için tüpler hazırlanır. Fosfozen bileşikler dioxan çözücüsü ile 10 000, 5 000, 2 500, 1 000 µM olacak şekilde seyreltilir. MGIT tüplerine kayıtları yapılır.

3.2.5. Tip tayini ve *M. tuberculosis* üretilmesi

Pozitif MGIT tüpünden 1 ml örnek alınarak steril bir tüp içerisinde 4 ml steril distile su ile sulandırılır. GC kontrol ve NAP (P-nitro-alfa-acetyl-amino-beta-hydroxypropionate, kloramfenikol) (TB kompleksine ait mikobakterileri inhibe eder.) testi için 2 yeni MGIT tüpüne hasta kaydı yapılır. GC kontrolü ve NAP tüpleri içersine Growth Supplemant / MGIT PANTA Antibiyotiği (çözülmüş) karışımından 0,5' er ml eklenir. NAP işaretlenmiş şişe içersine 0,1 ml p-NBA reaktifi eklenir. Pozitif MGIT tüpünden ¼ oranında steril distile su ile sulandırılıp hazırlanmış süspansiyondan her iki tüpe 0,5 ml eklenir ve cihaza yerleştirilir. Cihaz kontrol(GC) MGIT Tüpünün GU (üreme ünitesi) 400'e ulaşınca cihaz pozitif sinyali verir. NAP test tüpünün GU< 10 ise hassastır. *Mycobacterium tuberculosis* olarak değerlendirilir. Üreme saptandıktan sonra

tüpteki bulanıklığın 0,5 McFarland'ı geçip geçmediği kontrol edilir ve distile su ile ayarı yapılır. Antimikrobiyal etki testimiz için bu tip tayini yapılmış suş kullanılır.

3.2.6. BACTEC MGIT sistemi ile duyarlılık testi ve madde ile etkileşimi

BACTEC MGIT 960 duyarlılık testi, 4-13 günde sonlanan kalitatif bir testtir. Test Tuberculosis izolatlarının ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki üremelerinin karşılaştırılması esasına dayanır. MGIT 960 cihazı tüplerdeki floresans artışını sürekli izler. Cihaz yardımıyla ilaçlı ve ilaçsız tüplerdeki floresans analizleri sürekli karşılaştırılarak duyarlılık sonuçları belirlenir. BACTEC MGIT 960 cihazı otomatik olarak bu sonuçları yorumlar ve duyarlı ya da dirençli olarak bildirir [62].

Öncelikle 7 farklı fosfazen bileşiği NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddeleri dioksan çözücüsünde çözülerek 10 000 mikromolar stok çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra 5 000, 2 500, 1 250 ve 1 000 mikromolar olacak şekilde seri seyreltmeleri yapılmıştır. Her bir bakteri suşuna; 7 farklı fosfazen bileşiğinin 5 farklı seyreltmesi için toplam 35, dioksan bileşiğinin 5 farklı seyreltme için 5 ve kontrol için 1 olmak üzere, toplam 41 tüp hazırlanmıştır. Bütün tüplere Growth Supplement karışımından 0,8' er ml eklenmiştir. Farklı seyreltmelerdeki fosfazen ve dioksan maddeleri etiketlenmiş tüplere 0,1'er ml eklendikten sonra kontrol tüpüne 1/100 lük, diğer tüplere ise 1/5 lik bakteri süspansiyonundan 0,5 ml eklenmiştir. Son olarak tüm tüpler sıkıca kapatılıp 3-4 kez hafifçe alt üst edilerek karıştırıldı ve MGIT 960 Cihazına kayıtları yapıp yerleştirilmiştir. Cihaza yerleştirilen kontrol tüpünün pozitif sinyal vermesi ile birlikte testin süresi dolar (4-13 gün). Seyreltilmiş fosfazen ve dioksan bileşiklerinin olduğu tüplerdeki floresans, kontrol tüpündekinden daha az olduğunda, cihaz sonuçları duyarlı olarak yorumlar. Seyreltilmiş fosfozen ve dioksan bileşiklerinin olduğu tüplerdeki floresans kontrol tüpündekine eşit ve daha fazla olduğunda ise sonuçlar dirençli olarak cihaz tarafından sonuçlandırılır. MGIT 960 cihazının yorumu esas alınarak sonuç

"duyarlı" veya "dirençli" olarak rapor edilir.

3.2.7. Sonuçların yorumlanması

MGIT 960 Sistemindeki duyarlılık testinden 4 ilaç tek kritik konsantrasyonda değerlendirilmekte iken, çalışmamızda 7 fosfazen bileşiği için 5 seyreltme MIK Yöntemi ile sonuçlar değerlendirilmeye çalışılmıştır. Cihaza yerleştirilen kontrol tüpünün pozitif sinyal vermesi ile birlikte test (4-13 gün) MIK YÖNTEMİ; Minimal İnhibisyon konsantrasyonu eldeki bir antimikrobik preparatının etkinliğinin ölçülmesi amacıyla kullanılır. İnhibisyonun (üremenin saptanmadığı ilk konsantrasyon) saptandığı ilk seyreltme MIK değeri olarak bildirilir [63].

Antimikrobiyal preparatın hassas veya dirençli yorumu yapılmasını sağlayan hassas bir yöntemdir. Burada çalışmadaki değerlendirme kriterimiz üreme kontrolümüzün ürettiği gün yani 9. gündür.

Preparatın

10 000'de üreme var ise MIK >10 000 ise R, (diğer tüm konsantrasyonlarda üreme tespit edilmeli)

1 000, 1 250, 2 500, 5 000'de üreme var ise MIK >10 000

1 000, 1 250 ve 2 500'de üreme var ise MIK = 5 000

1 000, 1 250'de üreme var ise MIK=2 500

1 000'de üreme var ise MIK = 1 250

Hiçbirinde üreme yok ise MIK ≤ 1 000

Antimikrobiyal aktivite sonuçları incelendiğinde maddelerin bakteri ve mayalar üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Fosfozenlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri

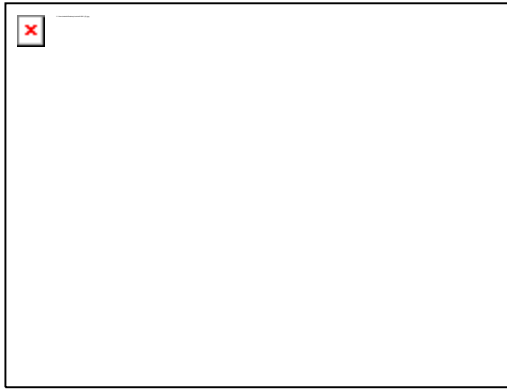
NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddeleri dioksan çözücüsünde çözülerek 10 000 mikromolar stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra 5 000, 2 500, 1 250 ve 1 000 mikromolar olacak şekilde seri seyreltmeleri yapıldı. Bu maddeler için disk difüzyon kullanılarak antimikrobiyal aktiviteleri belirlendi. Bu yöntem ile yapılan antimikrobiyal aktivite sonuçları (Çizelge 4.1 ve 4.2) de verilmiştir.

Çizelge 4.1. NA7, 8, 9 ve 12 nin antimikrobiyal aktivite sonuçları
(Antibiotikler, Amp= Ampicilin and C= Kloramfenikol, antifungal Ketoconazol)

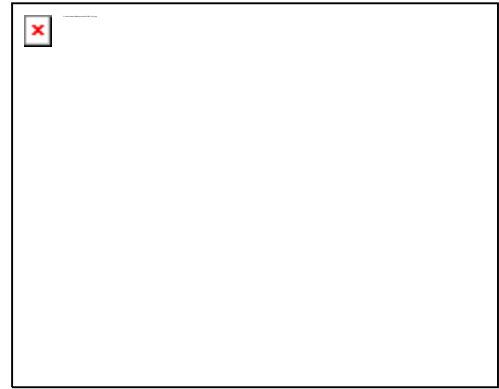
Disk difüzyon inhibisyon zon çapları (mm)								
Maddeler						Antibiyotik		Anti fungal
Bakteriler	NA7	NA8	NA9	NA12	Dioksan	Amp*	C**	Keto#
<i>E. feacalis</i> ATCC 292112	16,6 ±1,5	10,3 ±1,5	14,6 ±0,5	11,6 ±0,5	-	30,0 ±0,0	29,0 ±1,0	NS
<i>E.coli</i> ATCC 25922	11,0 ±0,5	-	11,0 ±1,0	15,0 ±1,0	11,0 ±0,0	20,3 ±0,5	26,6 ±1,1	NS
<i>E.coli</i> ATCC 35218	10,6 ±0,5	10,5 ±0,7	13,3 ±0,5	14,3 ±0,5	10,6 ±0,5	R	10,5 ±0,7	NS
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	18,9 ±0,5	18,6 ±0,5	19,5 ±1,2	12,3 ±0,5	10,0 ±0,0	35,0 ±0,0	29,6 ±0,5	NS
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	12 ±0,0	12,5 ±0,7	17,0 ±2,0	20,0 ±0,0	10,3 ±0,5	R	R	NS
<i>B. cereus</i> NRRL-B-3711	16,6 ±0,5	13,0 ±0,0	25,6 ±1,1	10,0 ±0,0	-	10,0 ±1,0	23,4 ±0,7	NS
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	18,0 ±1,0	16,0 ±1,0	22,0 ±0,0	13,0 ±1,0	10,1 ±0,7	30,3 ±0,5	31,0 ±1,0	NS
<i>P. vulgaris</i> ATCC 8427	10,3 ±0,5	12,0 ±1,0	13,3 ±1,1	14,6 ±0,5b	11,0 ±1,0	R	30,3 ±0,5	NS
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	11,0 ±0,0	18,0 ±0,0	15,5 ±1,2	10,5 ±1,2	10,0 ±0,0	NS	NS	30,0 ±0,0
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	12,0 ±0,0	19,0 ±0,0	23,6 ±1,0	10,0 ±0,8	10,5 ±0,5	NS	NS	29,0 ±0,5

Çizelge 4.2. E1, E2 ve E3 maddelerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları

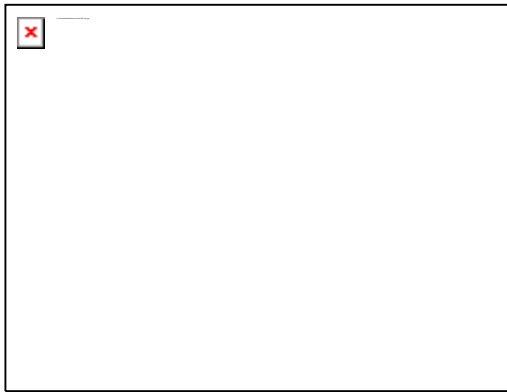
Disk difizyon inhibisyon zon çapları (mm)							
Bakteriler	Maddeler				Antibiyotik		Anti fungal
	E1	E2	E3	Dioxan	Amp*	C**	Keto#
<i>E. feacalis</i> ATCC 92112	24,7 ±0,9	23,0 ±0,0	22,2 ±0,5	-	30,0 ±0,0	29,0 ±1,0	NS
<i>E.coli</i> ATCC 25922	10,0 ±0,0	-	9,3 ±0,4	11,0 ±0,0	20,3 ±0,5	26,6 ±1,1	NS
<i>E.coli</i> ATCC 35218	10,0 ±0,0	10,0 ±0,0	-	10,6 ±0,5	R	10,5 ±0,7	NS
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	19,5 ±1,2	24,7 ±0,5	16,5 ±0,8	10,0 ±0,0	35,0 ±0,0	29,6 ±0,5	NS
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	10,2 ±0,5	11,0 ±0,0	10,0 ±0,0	10,3 ±0,5	R	R	NS
<i>B. cereus</i> NRRL-B-3711	16,7 ±0,2	15,6 ±0,5	12,2 ±0,2	-	10,0 ±1,0	23,4 ±0,7	NS
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	18,0 ±0,0	15,0 ±0,0	15,2 ±0,5	10,1 ±0,7	30,3 ±0,5	31,0 ±1,0	NS
<i>P. vulgaris</i> ATTC 8427	10,0 ±0,0	9,7 ±0,2	-	11,0 ±1,0	R	30,3 ±0,5	NS
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12,8 ±0,2	19,4 ±0,5	19,5 ±0,5	10,1 ±0,7	NS	NS	30,0 ±0,0
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	21,7 ±0,3	23,9 ±0,6	23,0 ±0,0	10,3 ±0,8	NS	NS	29,0 ±0,5



(a)



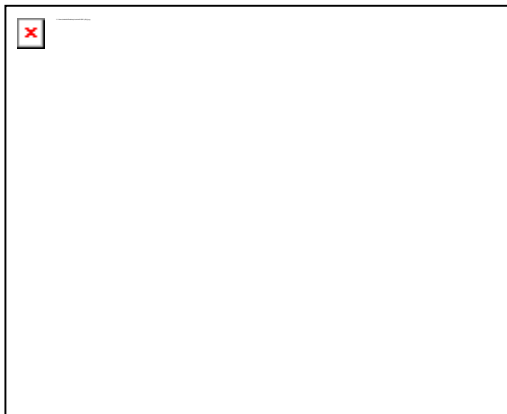
(b)



(c)



(d)



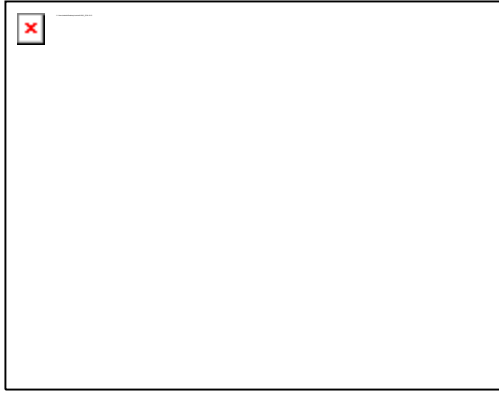
(e)



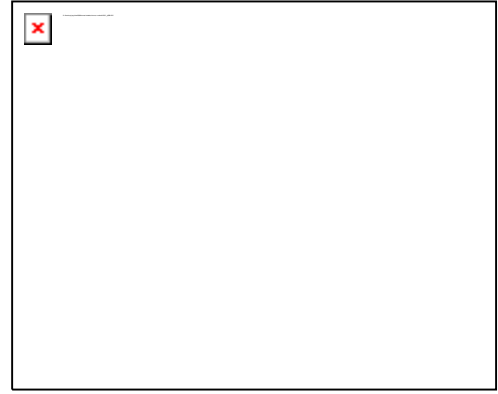
(f)

Şekil 4.1. Bazı maddelerin antimikrobiyel aktivite sonuçları (a-l)

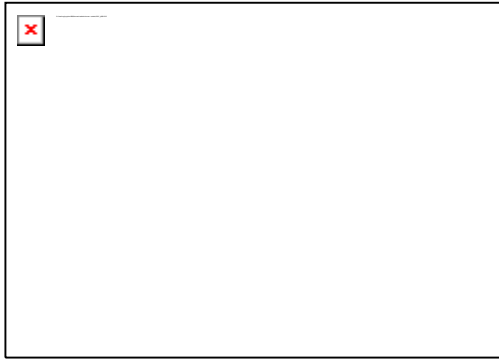
(a) *E.fecalis* NA12 etkileşimi, (b) *C.albicans* NA7 etkileşimi, (c) *P.bulgaris* NA8 etkileşimi, (d) *E.coli* NA12 etkileşimi, (e) *S.aureus* NA12 etkileşimi, (f) *B.cereus* NA8 etkileşimi



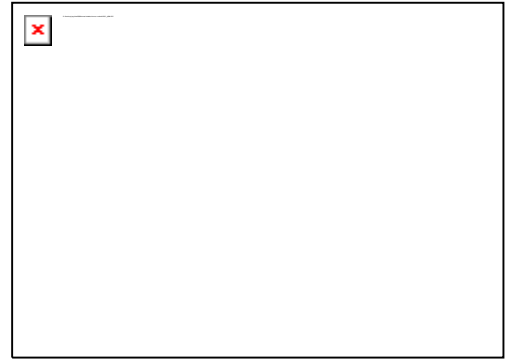
(g)



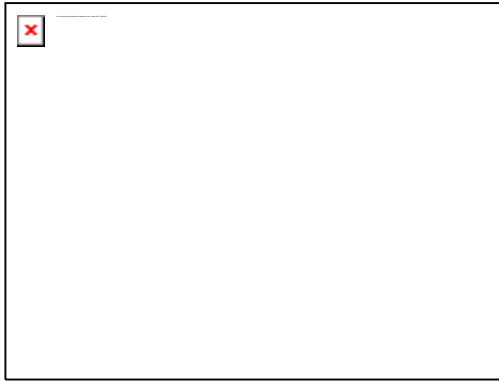
(h)



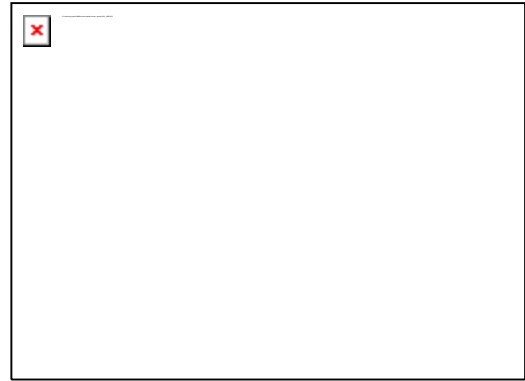
(i)



(i)



(k)



(l)

Şekil 4.1 (Devam). Bazı maddelerin antimikrobiyal aktivite sonuçları (a-l)
 (g) *C.tropicalis* NA9 etkileşimi, (h) *B.subtilis* NA12 etkileşimi, (i) *B.cereus*
 E2 etkileşimi, (i) *B.cereus* NA12 etkileşimi (k) *B.subtilis* NA12 etkileşimi,
 (l) *P.aeruginosa* E3 etkileşimi

4.2. Fosfazenlerin Antitüberküloz Aktivitesi

NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin antitüberküloz aktivitesi için Reference suş *M. tuberculosis* H37Rv ve çoklu dirençliliğe sahip 6 klinik suş kullanılmıştır. Bu suşların antitüberküloz ilaçlara karşı etkinliği (Çizelge 4.3). de gösterilmiştir.

Çalışmada 6 klinik suşun ve kontrol suşun duyarlılık testi sonucunda 2,4 ve 5 numaralı suşlar sadece isoniazid, rifampisine, 1 ve 6 numaralı suşlar isoniazid, rifampisin ve etambutole, 3 numaralı suşun ise tüm ilaçlara dirençli olduğu belirlendi. Suşların hepsi çoklu antibiyotik dirençliliği göstermiştir. İsoniazid ve rifampisinin ikisine birden dirençlilik çoklu antibiyotik dirençliliğini ifade eder. Kontrol suşu (*M.tuberculosis* H37rv) ise bütün ilaçlara karşı duyarlılık göstermiştir. MGIT 960 Sistemindeki duyarlılık testinden 4 ilaç tek kritik konsantrasyonda değerlendirilmekte iken, çalışmada 7 fosfazen bileşiği için 5 seyreltmede MIK Yöntemi ile sonuçlar değerlendirilmeye çalışılmıştır. Cihaza yerleştirilen kontrol tüpünün pozitif sinyal vermesi ile birlikte test antimikrobiyal preparatın hassas veya dirençli yorumu yapılmasını sağlayan hassas bir yöntemdir. Burada çalışmadaki değerlendirme kriteri üreme kontrolünün ürettiği gün yani 9. gündür.

Kullanılan tüm suşların dioksan bileşiğine ve E1, E2, E3 fosfazen bileşiklerine karşı dirençli olduğu görüldü. Çalışmamızda kullanılan NA7 fosfazen bileşiğine karşı ; 1, 2, 3, 4 ve 5 nolu suşlar ilk 3 seyreltmede duyarlı daha sonraki 2 seyreltmede ise dirençli,. 6 nolu suşumuz ilk 2 seyreltmede duyarlı, son 3 seyreltmede dirençli, kontrol suşumuz (*M.tuberculosis* H37Rv) ise ilk 4 seyreltmede duyarlı iken son seyreltmede dirençli sonuçlandı. NA8 fosfazen bileşiğine karşı ; 2, 5, ve 6 nolu suşlar ilk 3 seyreltmede duyarlı daha sonraki 2 seyreltmede dirençli, 1, 3, 4, nolu suşlar ilk 2 seyreltmede duyarlı diğer 3 seyreltmede dirençli, kontrol suşumuz ise ilk 4 seyreltmede duyarlı, son seyreltmede dirençli sonuçlandı. NA9 fosfazen bileşiğine karşı ; 1, 2, 3

nolu suşlar ve kontrol suşunun ilk seyreltmeye duyarlı diğer bütün suşlarında seyreltmeleri dahil olmak üzere hepsi dirençli sonuçlandı. NA12 fosfazen bileşiğine karşı ise ; 1 ve 5 nolu suşun ilk 2 seyreltmeyi duyarlı diğer 3 seyreltme dirençli, 2, 6, ve kontrol suşu ilk seyreltmede duyarlı, diğerlerinde dirençli, 3 ve 4 nolu suşda ise ilk 3 seyreltmede duyarlı son 2 seyreltmede dirençli sonuçlandı (Çizelge 4.4- 4.10). Klinik suşlar üzerine etkileşimde en etkili maddenin NA7 olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.3. Referans suş ve çoklu ilaç dirençli klinik suşların antibiogramı

Referans suş ve klinik izolatlar	Streptomisin	Isoniazid	Rifampin	Etambutol
H37Rv	S	S	S	S
klinik <i>M. tuberculosis</i> izolat 1	S	R	R	R
klinik <i>M. tuberculosis</i> izolat 2	S	R	R	S
klinik <i>M. tuberculosis</i> izolat 3	R	R	R	R
klinik <i>M. tuberculosis</i> izolat 4	S	R	R	S
klinik <i>M. tuberculosis</i> izolat 5	S	R	R	S
klinik <i>M. tuberculosis</i> izolat 6	S	R	R	R

Çizelge 4.4. NA7, NA8, NA9, NA 12, E1, E2 ve E3 maddelerinin *M. tuberculosis* H37Rv suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri

Bileşik	10 000µM	5 000µM	2 500µM	1 250µM	1000µM
NA7	S	S	S	S	R
NA8	S	S	S	S	R
NA9	S	R	R	R	R
NA12	S	R	R	R	R
E1	R	R	R	R	R
E2	R	R	R	R	R
E3	R	R	R	R	R
DİOXAN	R	R	R	R	R

Çizelge 4.5. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin *M. tuberculosis* çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 1 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri

Bileşik Adı /derişim	10 000µM	5 000µM	2 500µM	1 250µM	1 000µM
NA7	S	S	S	R	R
NA8	S	S	R	R	R
NA9	S	R	R	R	R
NA12	S	S	R	R	R
E1	R	R	R	R	R
E2	R	R	R	R	R
E3	R	R	R	R	R
DİOXAN	R	R	R	R	R

Çizelge 4.6. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin *Micobacterium tuberculosis* çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 2 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri

Bileşik Adı /derişim	10 000µM	5 000µM	2 500µM	1 250µM	1 000µM
NA7	S	S	S	R	R
NA8	S	S	S	R	R
NA9	S	R	R	R	R
NA12	S	R	R	R	R
E1	R	R	R	R	R
E2	R	R	R	R	R
E3	R	R	R	R	R
DİOXAN	R	R	R	R	R

Çizelge 4.7. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin *M. tuberculosis* çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 3 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri

Bileşik Adı /derişim	10 000µM	5 000µM	2 500µM	1 250µM	1 000µM
NA7	S	S	S	R	R
NA8	S	S	R	R	R
NA9	S	R	R	R	R
NA12	S	S	S	R	R
E1	R	R	R	R	R
E2	R	R	R	R	R
E3	R	R	R	R	R
DİOXAN	R	R	R	R	R

Çizelge 4.8. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin *M. tuberculosis* çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 4 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri.

Bileşik /derişim	Adı	10 000µM	5 000µM	2 500µM	1 250µM	1 000µM
NA7		S	S	S	R	R
NA8		S	S	R	R	R
NA9		R	R	R	R	R
NA12		S	S	S	R	R
E1		R	R	R	R	R
E2		R	R	R	R	R
E3		R	R	R	R	R
DİOXAN		R	R	R	R	R

Çizelge 4.9. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin *M. tuberculosis* çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 5 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri

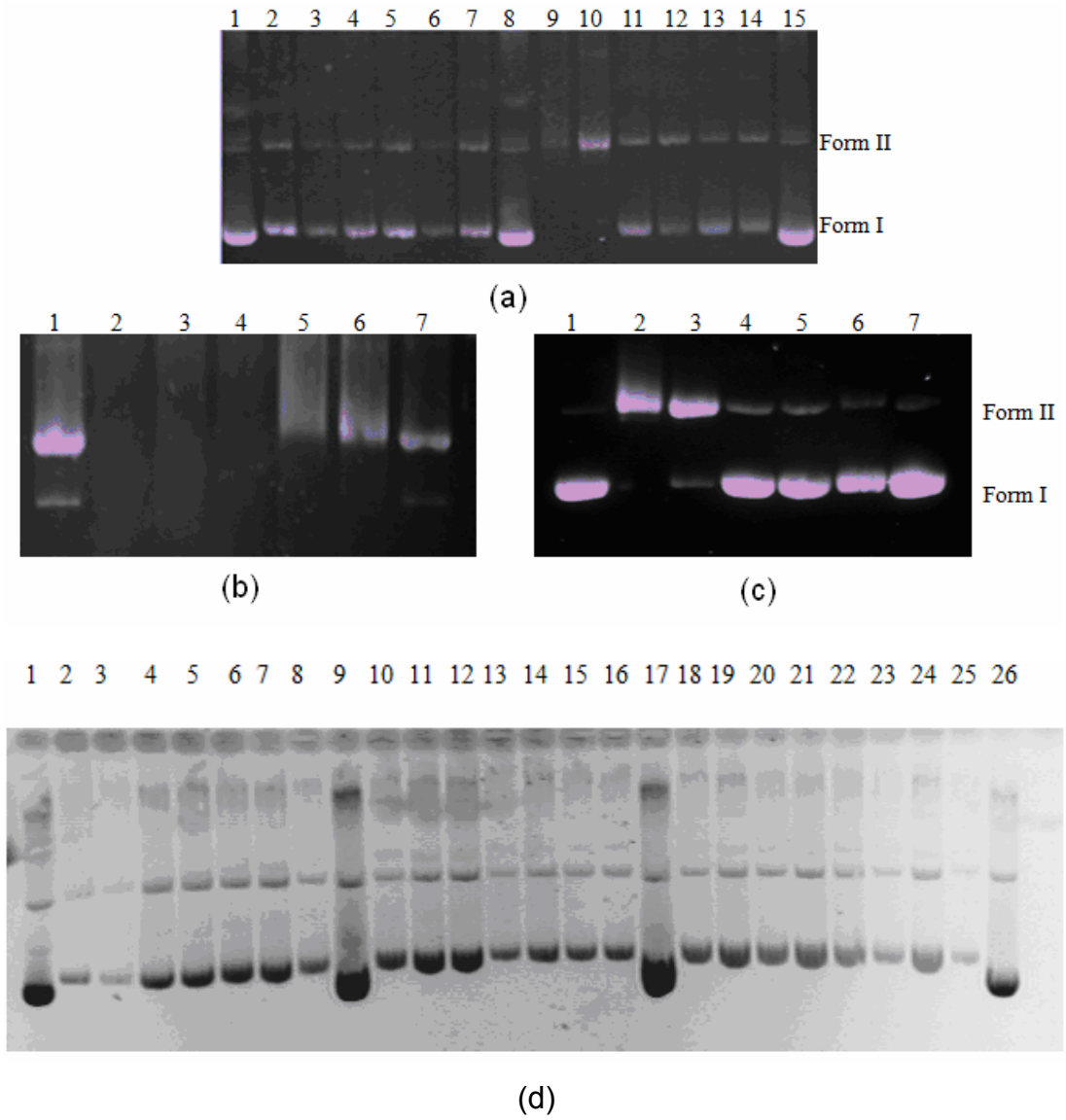
Bileşik /derişim	Adı	10 000µM	5 000µM	2 500µM	1 250µM	1 000µM
NA7		S	S	S	R	R
NA8		S	S	S	R	R
NA9		R	R	R	R	R
NA12		S	S	R	R	R
E1		R	R	R	R	R
E2		R	R	R	R	R
E3		R	R	R	R	R
DİOXAN		R	R	R	R	R

Çizelge 4.10. NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin *M. tuberculosis* çoklu antibiyotik dirençli klinik suş 6 suşuna karşı antitüberküloz aktiviteleri

Bileşik /derişim	Adı	10 000µM	5 000µM	2 500µM	1 250µM	1 000µM
NA7		S	S	R	R	R
NA8		S	S	S	R	R
NA9		R	R	R	R	R
NA12		S	R	R	R	R
E1		R	R	R	R	R
E2		R	R	R	R	R
E3		R	R	R	R	R
DİOXAN		R	R	R	R	R

4.3. Madde DNA Etkileşimi

NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddeleri 10 000, 5 000, 2 500, 1 250 ve 1 000 mikromolar çözeltileri dioksan içinde hazırlanmıştır. Bu maddeler ve DNA +37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra %1 lik agoroz jel elektroforezde yürütülerek DNA üzerine maddelerin etkisi belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. DNA ve NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3 maddelerinin etkileşimi (a). NA7 ve NA8, (b). NA12, (c). NA9, (d). E1,E2, E3 Şekil 4.2 a da NA7 ve NA8 in DNA üzerine etkisi görülmektedir. NA7 DNA'nın

hareketliliğini çok az azaltmıştır. NA8, de iki yüksek konsantrasyonda form I DNA kaybolmuştur, hareketlilik ise çok az etkilenmiştir. En yüksek konsantrasyonda form II de kaybolmuştur. Şekil 4.2 b de NA12 maddesinin DNA üzerine etkisi görülmektedir. Yüksek 3 konsantrasyonda hem form I hem de form II de DNA tamamen parçalanmış ve şekilde gözlenememektedir. Diğer konsantrasyonlarda da form I DNA gözlenmemiştir. DNA hareketliliği değişmiştir. Şekil 4.2 c de NA9 un DNA üzerine etkisi görülmektedir. Yüksek iki konsantrasyonda form I etkilenirken diğer konsantrasyonlarda form II'nin yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. Şekil 4.2 d de E1, E2, ve E3 maddelerinin DNA üzerine etkisi görülmektedir her 3 maddenin de DNA' nın hareketliliğine ve yoğunluğuna etkisi olduğu gözlenmiştir. DNA üzerine etkileşimde en etkili maddenin NA12 olduğu gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Enfeksiyon hastalıkları ve özellikle bakteriyel enfeksiyonlar insanlar için en önemli sorunlardan biridir. Hemen her gün yeni bir antibiyotik geliştirilmesine rağmen bu sorun gündemden düşmemektedir. Çünkü bakteriler her geçen gün yapı değiştirerek değişik suşlar meydana gelmekte veya antibiyotiklere karşı direnç kazanmakta ve mevcut antibiyotik tedavileri zaman zaman yetersiz kalmaktadır.

Tüberküloz da ülkemizde ve tüm Dünyada en önemli bulaşıcı hastalıklar arasında hala yerini korumakta ve her yıl milyonlarca insanın hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Bununla birlikte tüberküloz tedavisinde kullanılan ilaçlar konusunda ne yazık ki ciddi bir gelişme görülmemektedir. Hastalığın tedavisinde kullanılan beş ana ilaç olan; isoniazid, rifampisin, pirazinamid, etambutol ve streptomisin'e bir yenisi eklenememektedir. Tüberküloz basilinin direnç geliştirme özelliği nedeniyle, bu direnç gelişimini önlemek amacıyla ülkemiz gibi tüberküloz prevelansının ve direnç gelişiminin yüksek olduğu ülkelerde yeni tüberküloz olgularında bu beş major ilaçtan, dördü birden hastaya verilmeye başlanmakta ve tedavinin ikinci ayından itibaren ikili tedaviye geçilmektedir [45]. Bütün bu çabalara rağmen Dünyada ve ülkemizde tüberküloz direnci hızla artmakta ve yeni ilaçta geliştirilmemesinden dolayı bu dirençli olguların tedavisi önemli bir toplumsal sağlık problemi oluşturmaktadır. Bu nedenle tüberküloz hastalarında ve özellikle de dirençli tüberküloz olgularında kullanılmak üzere yeni ve etkili ilaçların geliştirilmesine gereksinim vardır. Yeni ilaç geliştirilmesinde ilk basamağı, söz konusu mikroorganizmaya karşı etkili bir maddenin geliştirilip etkinliğinin invitro ortamda gösterilmesi oluşturmaktadır. Dirençli tüberküloz vakalarının artışı ile tüberkülozda standart tedavi protokollerinin her toplum için ayrı ayrı belirlenmesi zorunlu hale gelmiştir. Bir ülkedeki tüberküloz direnç oranlarının bilinmesi, o ülkede uygulanan tüberküloz kontrol programının başarısı açısından önemlidir. Epidemiyolojik araştırmalar bu sorunun büyüklüğünü ve niteliğini anlamamıza ve standart tedavilerin

belirlenmesine yardımcı olmaktadır. Bir ülkede başlangıç direnç oranlarının yüksek olması geçmişte uygulanmış olan tüberküloz kontrol programlarının başarısızlığını, kazanılmış direnç oranlarının yüksekliği ise uygulanmakta olan tüberküloz kontrol programlarının başarısızlığını göstermektedir. Tüberküloz hastalığı bulaşıcılığı nedeniyle bir toplum sağlığı sorunu olduğundan ülkemiz için hazırlanmış olan standart, çağdaş, ülke özellikleri ve deneyimlerini esas alan tüberküloz kontrol programına verem savaşında görev alan herkesin uyması gereklidir. Tüberküloz ile gerçekten savaşmak istiyorsak her bir tüberküloz hastasını bulup tedavi etmeliyiz. Ancak o zaman bu yüksek direnç oranlarını gelişmiş ülkeler düzeyine indirebiliriz.

Çalışmamızda bazı fosfazen bileşiklerinin (NA7, NA8, NA9, NA12, E1, E2 ve E3) ; insan patojeni bakteriler olan, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus vulgaris* (ATCC 8427), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711), *Candida albicans* (ATCC 10231) ve *Candida tropicalis* (ATCC 13803) mayası, *M. tuberculosis* ATCC H37 Rv referans suşu ve çoklu antibiyotik direnci gösteren 6 farklı klinik *M. tuberculosis* suşu üzerindeki biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Buna ek olarak, bileşiklerin, DNA üzerine etkileri de araştırılmıştır. Bulgular kısmında da ayrıntılı olarak gösterildiği gibi bu maddelerin bazılarının, patojen bakteriler üzerinde etkili, tüberküloz referans suşa ve klinik suşlara da oldukça etkili olduğu saptanmıştır.

Literatür incelendiğinde, fosfazen bileşiklerinin antimikrobal özelliklerinin araştırıldığı çalışmaların oldukça sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. Bu çalışmalardan biri olan, Konar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bazı monofosfazen bileşiklerinin (SM, BOMPHOS, and PHOMPHOS) bakteriler ve bazı mantarlar üzerine antimikrobal ve biyolojik etkileri araştırılmış ve etkinlikleri gösterilmiştir [57]. Bu çalışmada SM bileşiğinin antimikrobal etkinliği yapısındaki klor atomlarının antiseptik etkisi üzerinden gerçekleştirdiği, BOMPHOS un ise yapısındaki benzen halkası sayesinde bu

etkiyi gösterdiği bildirilmiştir. Allock ve arkadaşları da, suda çözünen bazı fosfazen bileşiklerinin bazı bakteriler üzerine antibakteriyel etki gösterdiğini saptamışlardır. Ancak bu etkinin yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkarken düşük konsantrasyonlarda bu etkiyi göstermediğini bildirmişlerdir [64]. Brandt ve arkadaşlarının çalışmasında da bazı fosfazen bileşiklerinin HIV virüsü üzerine etkili olduğu gösterilmiştir [58].

Durmaz ve arkadaşlarının, çeşitli fosfazen bileşiklerinin antimikrobal özelliklerini araştırdıkları bir başka çalışmada; *S.aureus*, MRSA, MRCNS, *S.pneumoniae*, *E.faecalis*, *B.cereus*, VRE, *E.coli*, *E.aerogenes*, *S.typhimurium*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *C.albicans* gibi birçok mikroorganizmalar kullanılmış ve bu bileşiklerin antibiyotik direnci yüksek olanlar da dahil, kullanılan tüm gram pozitif suşlar üzerinde kuvvetli inhibisyon etkisi gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan patojen bir maya olan *C.albicans*'ın da bu bileşiklere hassas olduğu gösterilmiştir [65].

Az sayıda da olsa yapılan çalışmalarda bazı fosfazen bileşiklerinin çok sayıdaki mikroorganizmaya duyarlılık sonuçlarının olumlu alınması ile bu bileşiklerin daha ileriki çalışmalar için araştırılabileceği nitelikte olduğunu ortaya koymuştur ve özellikle de tüberküloz basili üzerine olan etkinliği, bu bileşiklerden yeni bir ilaç geliştirilmesi konusunda umutlu olunabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, fosfazen bileşikleri ile çok daha fazla sayıda invitro çalışma yapılması ve ilerleyen aşamalarda hayvan deneyleri ile invivo şartlarda etkinlik ve güvenilirlik çalışmalarının yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Streevatsan, S., Strockbauer, K.E., Connel, N.D., Kreiswirth, B.N., et al."Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination", **Proc Natl Acad Sci USA**, 94:9869-9874 (1997).
2. Saman, G., Roche, P., Spencer, J., et al., "Tuberculosis notifications in Australia, 2002". **Commun Dis Intell**, 27:449-458 (2003).
3. Denman, A.M., Roger,B., Zisman, B., "Viruses and Auto-immune Diseases Adapting Koch's Pastulates". **Autoimmune Review**, 355-361 (2004).
4. James, W.D., Berger, TG., Elston, D.M., eds., "Andrews' Diseases of the Skin". Clinical Dermatology, 10th ed. **Saunders Elsevier**, Canada 333-342 (2006).
5. Kılıçaslan, Z., "Dünyada ve Türkiye'de tüberküloz epidemiyolojisi ve kontrolü".Güncel bilgiler ışığında enfeksiyon hastalıkları, cilt 2, eds. Uzun Ö, Ünal S. **Bilimsel Tıp Yayınevi**, 821-833 (2002).
6. Bilgiç, H., "Türkiye'de tüberkülozun durumu ve eradikasyon programı" **21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu**, Samsun,18-33 (2003).
7. Kocabaş, A., "Akciğer tüberkülozu" Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, cilt 1, eds. Wilke Topcu A, Söyletir G, Doğanay M. **Nobel Tıp Kitabevleri**, 538-591 (2002).
8. Barış, İ., "Dünyada Tüberkülozun Tarihçesi", **Toraks Dergisi**, 3(3):338-340 (2002).
9. Shree, K.K., Chan, C.C., "Mycobacterium related Ocular Inflammatory Disease", **Diagnosis and management Ann A cad Med Singapore**, 35:203 -209 (2006).

10. Karadağ, M., "Türkiye'de Tüberkülozun Dünü Bugünü." 25.yıl Akciğer Günleri Kongre Kitabı, **Editör prof.Dr Nihat Özyardımcı**, Bursa 15-22 (2000).
11. Koçyiğit, E., "Yurdumuzda erişkin tüberkülozu, Tüberküloz; tanı, direnç, tedavi" Ed.Ang Ö, Uzun M. İstanbul, **Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını**, 26: 45-52 (1996).
12. Unat, EK., "Tüberküloz epidemiyolojisi "Temel Mikrobiyoloji, **İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Üniversite Yayınları**, No:4018,3:233 (1997).
13. Le Coutour, C., Delecour, M., Leroy, J.L., Puech ,F., "Does genital tuberculosis stil exist? Current review" .**J Gynecol Obstet Biol Reprod**, 13(4):419-423 (1984).
14. Enarson, DA., Chiang, C.Y., Murray, J.F., "Global epidemiology of tuberculosis" Tuberculosis, eds.In :Rom WR,Saray M, **Lippincott Williamsand Wilkins**, Philadelphia, 3-29, 2nd ed. (2004).
15. Barbagallo, J., Ingleton, R., et al., "Cutaneous tuberculosis : diagnosis and treatment". **Am J Clin Dermatol**, 3:319-328 (2002).
16. Gupta, A., Gupta, Y., "Tubercular posterior uveitis". **Int Ophthalmol Clin**, Spring ; 45(2): 71-88 Review, (2005).
17. McAleer, S.J., Johnson, C.W., Johnson, W.D.," Tuberculosis and parasitic and fungal infections of the genitourinary system" Campbell-Walsh Urology, (eds): in Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA Volume 1, Ninth ed, **Saunders Elsevier**, Philadelphia,pp:436-447 (2007).
18. Bilgehan, H., "Mikrobiyolojik morfolojiyi inceleme yöntemleri" Klinik Mikrobiyoloji. Ed. Bilgehan H. **Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları**, İzmir, 71-95 (1995).

19. Hopewell, P.C., Bloom, B.R.,” Tüberculous and other mycobacterial diseases” Textbook of respiratory medicine, In: Murray JF, Nadel JA.: **WB Saunders**, Vol 1. Philadelphia 1094-1102 (1994).
20. Öğretensoy, M.” Mikobakterilerin yapısı ve antijenik özellikleri” **Solunum Hastalıkları**, 5: 149-157 (1994).
21. Kocabaş, A.” Mikobakterilerin yapısal ve antijenik özellikleri ” Kocabaş, A. **Tüberküloz tanısı e kliniği**, Adana: Emel Mat. 47-3:55 (1991)
22. Mackaness, G.B.,” The Immunology of antituberculosis immunity” **Am Rev Resp Dis**, 97: 337-344 (1968).
23. Zuber, P.L., McKenna, M.T., Binkin, N.J., Onorato, I.M., Castro, K.G.,” Long-term risk of tuberculosis among foreign-born persons in the United States” **JAMA**, Jul; 278(4):304-7 (1997).
24. Mitchison, D.A.,” The Action of antituberculosis drug in short-course chemotherapy”. **Tubercle**, 66: 219-225 (1985).
25. Rattan, A., Kishore, K., Singh, S., et al.,” Evaluation of a safe sputum processing method for detecting tuberculosis” **J Clin Pathol**, 47:411-413 (1994).
26. Çelenk, M.,” Tüberküloz epidemiyolojisi” **Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi**, 14: 391-403 (1994).
27. Shinnick, T.M., Good, R.C.,”Diagnostic mycobacteriology laboratory practices”. **Clin Infect Dis**, 21:291-299 (1995).
28. Murray, S.J., Barrett, A., Magee, J.G., Freeman, R.,” Optimisation of acid fast smears for the direct detection of mycobacteria in clinical samples”. **J Clin Pathol**, 56:613-615 (2003).

29. Barret, A., "The role of microbiology laboratory in diagnosing mycobacterial diseases", *Am J Clin Pathol*, 101 (1994).
30. Somoskovi, A., Ködmön, C., Lantos, A., Partfai, Z., Tamasi, L., Füzy, J., Magyar, P., "Comparison of recoveries of Mycobacterium tuberculosis using the automated Bactec MGIT 960 system, and Löwestein-Jensen medium", *J Clin Microbiol*, 38:2395-7 (2000).
31. Watterson, S.A., Drobniewski, F.A., "Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections", *J Clin Pathol*, 53:727-732 (2000).
32. Özkara, Ş., Kılıçarslan, Z., Öztürk, F., ve ark., "Bölge verileriyle Türkiye'de tüberküloz" *Toraks Dergisi*, 3: 178-87 (2002).
33. Bass, J.B., Farer, L.S., Hoppewell, P.C., et al., "Treatment of Tuberculosis infection in adults and children". *Am J Respir Clin Care Med*, 149 : 1359-74 (1994).
34. Mitchison, D.A., "Drug Resistance in Mycobacteria". *British Medical Bulletin*, 40:84-90 (1984).
35. WHO, "Global tuberculosis control". Surveillance, Planning, Financing. *Geneva World Health Organisation*, WHO/HTM/TB 349 (2005).
36. Oktun, M., "Tüberküloz tedavisinde temel ilkeler ve direnç sorunu". *Klinik dergisi*, 14: 71-82 (2001).
37. Nuemberger, E., Grosset, J., "Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of mycobacterial infections". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23:243-250 (2004).
38. Khan, M., Akhtar, W.N., Siner, A., Bouchama, M., Bazarbashi, C.T., "guided fine needle aspiration biopsy in the diagnosis of mediastinal tuberculosis", *Chest*, 106:1329-32 (1994).

- 39.Özkara,Ş., Aktaş, Z., Özkan, S., Ecevit,H., " Tüberküloz ve kontrolü" T.C.Türkiye' de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı **Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı**, Ankara,18-26 (2003).
- 40.Tahaoğlu, K., Törün,T., Sevim,T., et al.,"The treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Turkey" **N Engl J Med**, 375:170-74 (2001).
- 41.Mitchison, DA.," The Action of antituberculosis drug in short-course chemotherapy". **Tubercle**, 66: 219-225 (1985).
- 42.Mitchison, DA.," Drug Rezistance in Mycobacteria". **British Medical Bulletin**, 40:84-90 (1984).
- 43.Davidson, PT.," Drug resistance and the selection of therapy for Tuberculosis " **Am Rev Respir Dis**, 136: 255-257 (1987).
- 44.Costello, H.D., Caras, G.J., Snider, D.E.," Drug Resistance Among Previously Treated Tuberculosis Patients, a Brief Report". **Am Rev Respir Dis**, 121 :313-316 (1980).
- 45.Ediger, D.,"Tüberküloz kemoterapisinde kullanılan ilaçlar". Akciğer ve Akciğer Dışı Organ Tüberkülozları. Ed: Özyardımcı N. **Uludağ Üni. Basımevi**, Bursa,S:143-152 (2004).
- 46.Kaplan, G., Post F.A., Moreia A.L., Wanwright. H., Kreiswirth, B.N., Tanverdi, M., "Mycobacterium tuberculosis growth at the cavity surface: a microenvironment withfailed immunity". **Inspect Immun**, 71:7099-108 (2003).
- 47.Dunlap, N.E., Briles, D.E.," Immunology of Tuberculosis". **Med Clin North Am**, 77:1235-51 (1993).
- 48.Dye, C., Williams, B.G.,"Criteria for the control of drug-resistant tuberculosis". **Proc Natl Acad Sci USA**, 97(14):8180-5 (2000).

49. Güler, N., Önes, Ü., Somer, A., et al., "The effect of prior BCG vaccination on the clinical and radiographic presentation of tuberculosis meningitis in children in İstanbul", Turkey. **Int J Tuberc Lung Dis**, 2(11): 885-90 (1991).
50. Özkara, Ş., Aktaş, Z., Özkan, S., Ecevit, H., "Tüberküloz ve kontrolü" T.C. Türkiye' de Tüberkülozun Kontrolü için Başvuru Kitabı **Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı**, Ankara, 65-112 (2003).
51. Bilgiç, H., "Tüberküloz epidemiyolojisi". Tüberküloz kliniği ve kontrolü. Kocabaş A, **Çukurova Üniversitesi Basımev**, Adana, 401-37 (1991).
52. ATS., "Diagnostic standarts and classification of tuberculosis in adult and children". **Am J Respir Crit Care Med**, 161: 1376-95 (2000).
53. Goble, M., Hersburg, C.R., Waite, D., "Treatment of isoniazid- and rifampin-resistant tuberculosis". **Am Rev Respir Dis**, 137:24-28 (1988).
54. Özyardımcı, N., Burgazlıoğlu, B., "Yetişkin tipi tüberküloz." **Akciğer ve Akciğer Dışı Organ Tüberkülozları**, ed. Özyardımcı N. Bursa 70 (2008).
55. Wohler, F., Liebig, J., **Ann. Chem**, 11 :139 (1834).
56. Allcock, H.R., Kugel, R.L., **J. Am. Chem. Soc**, 87: 4216-4217 (1965).
57. Konar, V., Yılmaz, Ö., Öztürk, A.İ., Kirbağ, S., Arslan, M., **Bioorg. Chem**, 28 : 214-225 (2000).
58. Brandt, K., Kruszynski, R., Bartzak, T.J., Czomperlik, I.P., **Inorg. Chim. Acta**, 322: 138-144 (2001).
59. Beak, H., Cho, Y., Lee, C., Shon, Y., **Anti Cancer Drugs**, 11:15-725 (2000).
60. Bickley, J.F., Bonar-Law, R., Lawson, G.T., Richards, P.I., Rivals, F., Steiner, A., Zacchini, S., **Dalton Trans**, 1235-1244 (2003).

61. Yan, J.J., Huang, A.H., Tsai, SH., "Comparison of the MB/BacT and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens". **Diagn Microbiol Infect Dis**, 37:25-30 (2000).
62. Williams-Bouyer, N., Yorke, R., Lee, H.I., Woods, G.L., " Comparison of the Bactac MGIT 960 and ESP Culture system II for growth and detection of mycobacteria". **J Clin Microbiol**, 38: 4167-70 (2000).
63. Bilgehan, H., " Antimikrobiyal aktivite", **Klinik mikrobiyolojik Tanı**, ed 3. baskı, Bölüm 8.2, S, 151 (2002).
64. Allcock, H.R., Pucker, S.R., Fitzpatrick, R.J., Rasid, K., **Biomaterial**, 13: 12, 857-863 (1992).
65. Durmaz, G., Ateş, B., Alataş, S., Çetin, M.Ş., Beğçe, S., "Merkatopirimidin sübstitüye fosfazen türevi bileşiklerin antimikrobiyal özellikleri", **21. Ulusal Kimya Kongresi**, (2007).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YAVUZ, Makbule
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 15.04.1967 Çankırı
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (262) 3116930
e-mail : Makbule_yavuz@hotmail.com

Eğitim Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Biyoloji Bölümü	2010
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	1991
Lise	Halide Edip Lisesi	1985

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2005-2010	Kocaeli Üniversitesi	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce