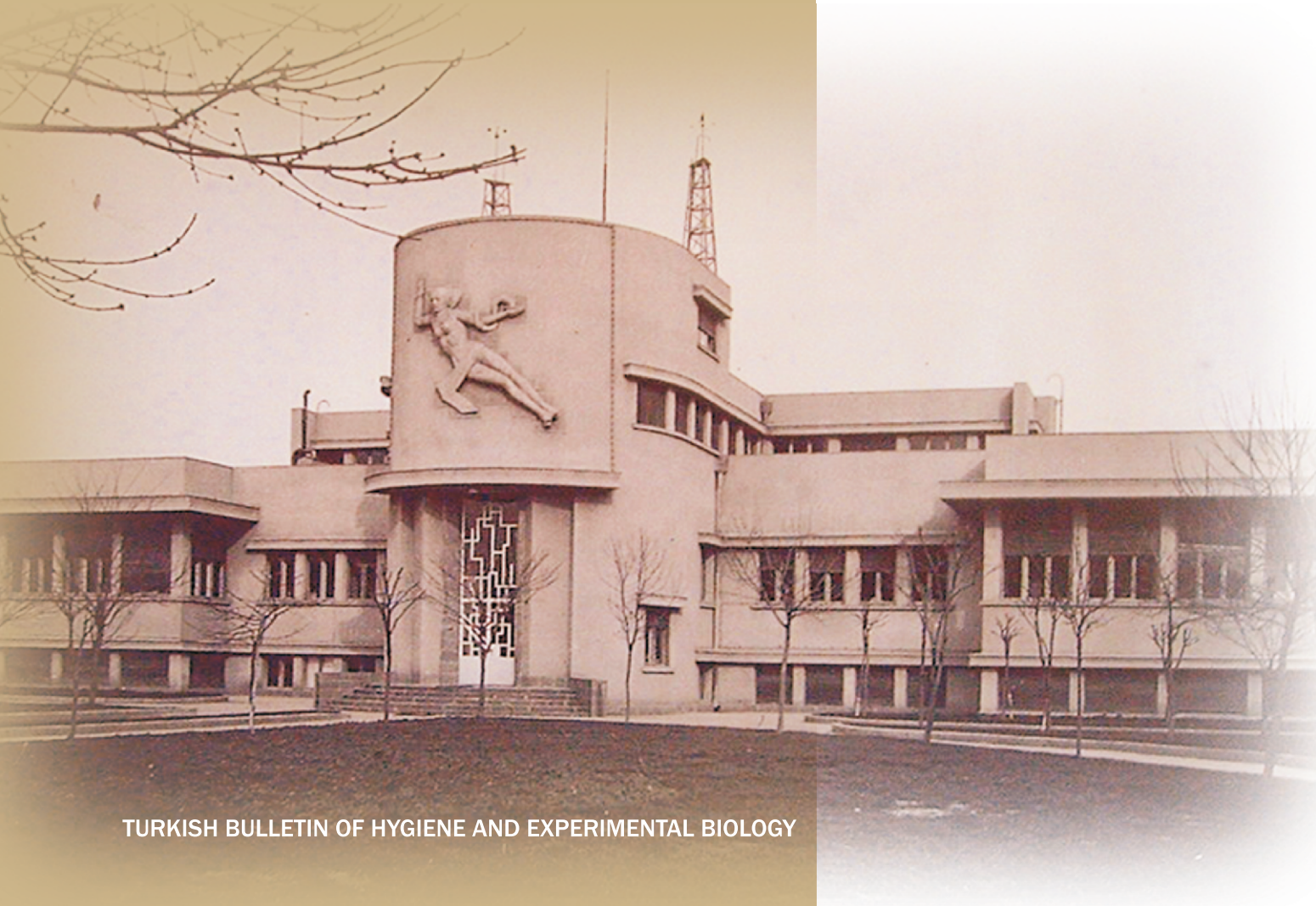




T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
REFİK SAYDAM HIFZISSIHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 67 ■ Sayı/Number 2 ■ Yıl/Year 2010





T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI

THE MINISTRY OF HEALTH OF TURKEY
REFİK SAYDAM NATIONAL PUBLIC HEALTH AGENCY

ISSN 0377-9777
e-ISSN 1308-2523

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 67 ■ Sayı/Number 2 ■ Yıl/Year 2010

**TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY**

Türk Hij Den Biyol Derg

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı adına
On behalf of Refik Saydam National Public Health Agency

Başkan Doç. Dr. Mustafa ERTEK
Assoc. Prof. Dr. Mustafa ERTEK, President

EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Demet CANSARAN-DUMAN
Yavuz UYAR

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Sühendan ADIGÜZEL
Canan BAYAR
Fatih BAKIR
Arsun ESMER
Sibel KARACA
Nesrin KARACA
Selçuk KILIÇ
Ayşe PEKER-ÖZKAN
Özcan ÖZKAN
Saime ŞAHİNÖZ
Pınar ÜNAL
Gerard A. van ZOELLEN

TEKNİK YÖNETMEN / TECHNICAL MANAGER

Nevzat IŞIK

TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Murat BAYRAM
Murat DUMAN
Hasan KAYA
Zeynep KÖSEOĞLU
Selahattin TAŞOĞLU

REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI
REFİK SAYDAM NATIONAL PUBLIC HEALTH AGENCY
ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayınlanır / Published four times per year
Asitsiz kağıt kullanılmıştır / Acid free paper is used

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :
RSHMB / RSNPHA
Yayın ve Dokümantasyon
Müdürlüğü / Department of
Publication and Documentation

Baskı ve Cilt / Press and Binding :
Kayıhan Ajans
Hoşdere Cad. No: 201/9 Çankaya-ANKARA
Tel: 0312 442 72 72
e-posta: kayihanajans@gmail.com

Yayın Türü / Type of Publication :
Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication
Basım Tarihi / Date of Publication :
Temmuz 2010 / July 2010

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Adil ALLAHVERDİYEV, Yıldız Tek. Üniv., Kimya Fak., İstanbul

Ahmet KART, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Akçahan GEPEĞİREMEN, Abant İzzet Baysal Üniv., Tıp Fak., Bolu

Ali ALBAY, GATA, Ankara

Ali MİRAZMİ, Swedish Inst. for Infect. Dis. Control, Sweden

Alper AKÇALI, 18 Mart Üniv., Tıp Fak., Çanakkale

Aşkın YAŞAR, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

Ayhan FİLİZİ, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

Aykut ÖZKUL, Ankara Üniv., Vet Fak., Ankara

Ayşen GÜNEL-ÖZCAN, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Aziz SANCAR, Univ. North Carolina, Dep Biophem & Biophysics, USA

Bahadır GÖNENÇ, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

Banu ÇAKIR, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Berrin ESEN, RSHMB, Ankara

Bülent ALTEN, Hacettepe Üniv., Fen Fak., Ankara

Celal GÖKÇAY, ODTÜ, Çevre Müh., Ankara

Çağatay GÜLER, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Daniel MOTLHANKA, Botswana College of Agriculture, Botswana

Delia Teresa SPONZA, Dokuz Eylül Üniv., Çevre Müh., İzmir

Diler ASLAN, Pamukkale Üniv., Tıp Fak., Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara Eğ. & Arş. Hast., Ankara

Dürdal US, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Dwight D. BOWMAN, Cornell Univ., College of Vet. Med., USA

Ender YARSAN, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

Fatih KÖKSAL, Çukurova Üniv., Tıp Fak., Adana

Gönül ŞAHİN, Hacettepe Üniv., Eczacılık Fak., Ankara

Gülberk UÇAR, Hacettepe Üniv., Eczacılık Fak., Ankara

Gülnur TARHAN, Ahievran Üniv., Sağlık MYO, Kırıkkale

Hakan LEBLEBİCİOĞLU, 19 Mayıs Üniv., Tıp Fak., Samsun

Haluk VAHABOĞLU, Kocaeli Üniv., Tıp Fak., Kocaeli

Hürrem BODUR, Numune Eğ. & Arş. Hast., Ankara

Işıl MARAL, Gazi Üniv., Tıp Fak., Ankara

İ.Mehmet Ali ÖKTEM, Dokuz Eylül Üniv., Tıp Fak., İzmir

İrfan EROL, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

İsmail CEYHAN, RSHMB, Ankara

Johan LINDH, Swedish Ins. for Infections Dis. Cont., Sweden

Kosta Y. MUMCUOĞLU, Hebrew Univ., Israel

Levent AKIN, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Mahinur AKKAYA, ODTÜ, Kimya Müh., Ankara

Manfred WEIDMANN, Göttingen Univ., Virology Ins., Germany

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Mehmet Ali ONUR, Hacettepe Üniv. Fen Fak., Ankara

Metin KORKMAZ, Ege Üniv., Tıp Fak., İzmir

Mithat ŞAHİN, Kafkas Üniv., Vet. Fak., Kars

Murat DİZBAY, Gazi Üniv., Tıp Fak., Ankara

Murat GÜLMEZ, Kafkas Üniv., Vet. Fak., Kars

Murat GÜNAYDIN, 19 Mayıs Üniv., Tıp Fak., Samsun

Murat HÖKELEK, 19 Mayıs Üniv., Tıp Fak., Samsun

Murat ÖZSAN, Ankara Üniv., Tıp Fak., Ankara

Mustafa KAVUTÇU, Gazi Üniv., Tıp Fak., Ankara

Mükerrem KAYA, Atatürk Üniv., Ziraat Fak., Erzurum

Nazmi ÖZER, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Nilay ÇÖPLÜ, RSHMB, Ankara

Nur Münevver PINAR, Ankara Üniv., Fen Fak., Ankara

Oğuz GÜRSOY, Pamukkale Üniv., Gıda Müh., Denizli

Orhan BAYLAN, GATA, Ankara

Orhan YILMAZ, KBB, Dışkapı Eğ. & Arş. Hast., Ankara

Osman GÜNAY, Erciyes Üniv., Tıp Fak., Kayseri

Paul HEYMAN, Queen Astrid Military Hospital, Belgium

Pauline MWINZI, Medical Research Inst., Kenya

Pınar OKYAY, Adnan Menderes Üniv., Tıp Fak., Aydın

Rahmet ÇAYLAN, Atatürk Eğ. & Arş. Hast., Ankara

Recep AKDUR, Ankara Üniv., Tıp Fak., Ankara

Recep ÖZTÜRK, İstanbul Üniv., Cerrahpaşa Tıp Fak., İstanbul

Rıza DURMAZ, İnönü Üniv., Tıp Fak., Malatya

Roberto Canete VILLAFRANCE, Centre for Hygiene, Cuba

S. Aykut AYTAÇ, Hacettepe Üniv. Gıda Müh., Ankara

Sami AYDOĞAN, Erciyes Üniv., Tıp Fak., Kayseri

Sema BURGAZ, Gazi Üniv., Eczacılık Fak., Ankara

Sercan ULUSOY, Ege Üniv., Tıp Fak., İzmir

Sıraç DİLBER, Karolinska Univ., Medical School, Sweden

Suzan ÖZTÜRK-YILMAZ, Sakarya Üniv., Müh. Fak., Sakarya

Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Celal Bayar Üniv., Tıp Fak., Manisa

Takashi AKAMATSU, Prof. Emeritus, Japan

Tevfik PINAR, Kırıkkale Üniv., Tıp Fak., Kırıkkale

Yesim ÖZBAŞ, Hacettepe Üniv. Gıda Müh., Ankara

Yeşim ÇETİNKAYA-ŞARDAN, Hacettepe Üniv., Tıp Fak., Ankara

Yeşim TUNÇOK, Dokuz Eylül Üniv., Tıp Fak., İzmir

Zafer KARAER, Ankara Üniv., Vet. Fak., Ankara

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

Dergide yayınlanmak üzere gönderilen makaleler, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi yazım kurallarına göre hazırlanmalıdır. Başvurular www.turkhijyen.org adresinden "Çevrimiçi Makale Gönder, Takip Et, Değerlendir Programı" aracılığıyla online olarak yapılabilir.

Gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallar aranır:

1- "Telif hakkı devir formu" (Copyright Release Form) tüm yazarlarca imzalanarak onaylandıktan sonra Dergimize iletilmelidir. Bu forma www.turkhijyen.org adresinden ulaşılabilir.

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

- Yazının başlığı kısa olmalı ve büyük harfle yazılmalıdır.
- Sayfa başlarında konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.
- Akademik unvan kullanılmadan meslek unvanı belirtilebilir.
- Makale birden fazla yazar tarafından yazılmış ise, aynı üniteye çalışan yazarların kurumlarının sıralaması göz önünde bulundurularak soyadları sonuna numara verilmelidir (Örnek; Duman 1, Yılmaz 2, Çetin 1,).

e) Çalışma bilimsel bir kuruluş ve/veya fon ile desteklenmişse dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka belirtilmelidir.

f) Makale, kongre/sempozyumda sunulmuşsa sunum türü ile birlikte dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka belirtilmelidir.

3- Yazılardaki terimler mümkün olduğunca Türkçe ve Latince olmalı, dilimize yerleşmiş kelimelere yer verilmeli ve Türk Dil Kurumu'nun güncel sözlüğü kullanılmalıdır. Öz Türkçeye özen gösterilmeli ve Türkçe kaynak kullanımına önem verilmelidir.

4- Metin içinde geçen Latince mikroorganizma isimleri ilk kullanıldığında tam ve açık yazılmalı, daha sonraki kullanımda kısaltılarak verilmelidir. Mikroorganizmaların orijinal Latince isimleri italik yazılmalıdır: Örneğin; *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa* gibi. Yazıda sadece cins adı geçen cümlelerde stafilokok, streptokok gibi dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir. Antibiyotik isimleri dil bütünlüğü açısından okunduğu gibi yazılmalıdır. Antibiyotik isimleri uluslararası standartlara uygun olarak kısaltılmalıdır.

5- Metin içerisinde bahsedilen birimlerin sembolleri "The Système International" (SI)'e göre verilmelidir.

6- Yazılar bir zorunluluk olmadıkça "mişli geçmiş" zaman edilgen kip ile yazılmalıdır.

7- A4 kağıtların yalnız bir yüzü kullanılmalı, her bir kenarlarından 2,5'ar cm boşluk bırakılmalıdır. 12 punto, "Times New Roman" yazı karakteri ve iki satır aralığı (double space) kullanılmalıdır.

8- Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, yazarlardan araştırma ve yayın etiğine uyumlu olunmasını istemektedir. İnsan araştırmalarında, çalışmaya katılanlardan bilgilendirilmiş olurun (yazılı veya sözlü) alındığının gereç ve yöntem bölümünde belirtilmesi gerekmektedir. Gönüllü ya da hastalara uygulanacak prosedürlerin özelliği tümüyle anlatıldıktan sonra, kendilerinin bilgilendirilip onaylarının alındığını gösterir bir cümle bulunmalıdır. Yerel etik kurullarına sahip olmayan yazarlar, Helsinki Bildirgesinde (www.wma.net/e/policy/pdf/17c.pdf) ana hatlarını çizilen ilkeleri izlemelidirler. Yazarlar, bu tür bir çalışma söz konusu olduğunda, uluslararası alanda kabul edilen kılavuzlara ve "İlaç Araştırmaları Hakkında Yönetmelik" ve daha sonra yayınlanan diğer yönetmelik ve yazılarda belirtilen hükümlere uyulduğunu belirtmeli ve kurumdan aldıkları "Etik Kurul Onayı"nı göndermelidirler.

9- Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar için de gereken izinler alınmalı; yazıda deneklere ağır, acı ve rahatsızlık verilmemesi için neler yapıldığı açık bir şekilde belirtilmelidir.

10- Hasta kimliğini tanıyacak fotoğraf kullanıldığında, hastanın yazılı onayı gönderilmelidir.

11- Makale yazımında dikkat edilecek hususlar şunlardır:

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

Türkçe Özet: Amaç, Yöntem, Bulgular ve Tartışma alt başlıklarından oluşmalıdır (yapılandırılmış özet) ve en az 300, en fazla 500 sözcük içermelidir.

İngilizce Özet (Abstract): Başlığı İngilizce olmalıdır. Türkçe özet bölümünde belirtilenleri birebir karşılayacak şekilde "Objective, Method, Results, Conclusion" olarak yapılandırılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Türkçe ve İngilizce özetlerin altında verilmelidir. Anahtar kelime sayısı 3-8 arasında olmalı ve Tıp Konuları Başlıkları (Index Medicus Medical Subject Headings-MeSH)'nda yer alan sözcükler kullanılmalıdır. MeSH için şu internet adresine başvurulabilir: www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html

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

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

Bulgular: Sadece elde edilen bulgular açık bir şekilde belirtilmelidir.

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

Teşekkür Bölümü: Teşekkür bölümü, ana metnin sonunda kaynaklardan hemen önce yer almalı ve bir paragrafı geçmemelidir.

Kaynaklar: Yazarlar kaynakların eksiksiz ve doğru yazılmasından sorumludur. Kaynaklar, metnin içinde geçiş sırasına göre numaralandırılmalıdır. Numaralar, parantez içinde cümle sonlarında verilmelidir. Kaynakların yazılımı ile ilgili aşağıda örnekler verilmiştir. Daha detaylı bilgi için "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997; 277: 927-934) (<http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>) bakılmalıdır.

Sürelî yayın: Yazar(lar)ın Soyadı Adının baş harf(ler)i (altı veya daha az yazar varsa hepsi yazılmalıdır; yazar sayısı yedi veya daha fazla yalnız ilk altısını yazıp "et al." veya "ve ark." eklenmelidir). Makalenin başlığı, Derginin Index Medicus'a uygun kısaltılmış ismi, Yıl; Cilt (Sayı): İlk ve son sayfa numarası.

• Standart dergi makalesi için örnek: Demirci M, Ünlü M, Şahin Ü. A case of hydatid lung cyst diagnosed by kinyoun staining of bronco-alveolar fluid. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 2001; 25 (3): 234-5.

• Yazarı verilmemiş makale için örnek: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the panceras (Editorial). *Br Med J*, 1981; 283:628.

• Dergi eki için örnek: Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: Demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood*, 1979; 54 (Suppl 1): 26a.

Kitap: Yazar(lar)ın soyadı adının baş harf(ler)i. Kitabın adı. Kaçınca baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı.

• Örnek: Eisen HN. Immunology: an Introduction to Molecular and Cellular Principles of the Immune Response. 5th ed. New York: Harper and Row, 1974.

Kitap bölümü: Bölüm yazar(lar)ın soyadı adının başharf(ler)i. Bölüm başlığı. İT: Editör(ler)in soyadı adının başharf(ler)i ed/eds. Kitabın adı. Kaçınca baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı: Bölümün ilk ve son sayfa numarası.

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

Web adresi: Eğer doğrudan "web" adresi referans olarak kullanılacaksa adres ile birlikte parantez içinde bilgiye ulaşılan tarihe de belirtilmelidir. Web erişimli makalelerin referans olarak metin içinde verilmesi gerektiğinde DOI (Digital Object Identifier) numarası verilmesi şarttır.

Kongre bildirisi: Entrala E, Mascaro C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, Izmir-Turkey. 1994.

Tez: Bilhan Ö. Labirent savakların hidrolik karakteristiklerinin deneysel olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.

GenBank/DNA dizisi analizi: Gen kalıtım numaraları ve DNA dizileri makale içinde kaynak olarak gösterilmelidir. Konuyla ilgili ayrıntılı bilgi için "National Library of Medicine" adresinde "National Center for Biotechnical Information (NCBI)" bölümüne bakınız.

Şekil ve Tablolar: Her tablo veya şekil ayrı bir sayfaya basılmalı, alt ve üst çizgiler ve gerektiğinde ara sütun çizgileri içermelidir. Tablolar, "Tablo 1." şeklinde numaralandırılmalı ve tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne yazılmalıdır. Açıklayıcı bilgiye başlıkta değil dipnotta yer verilmeli, uygun simgeler (*,+,++, v.b.) kullanılmalıdır. Fotoğraflar "jpeg" formatında ve en az 300 dpi olmalıdır. Baskı kalitesinin artırılması için gerekli olduğu durumlarda fotoğrafların orijinal halleri talep edilebilir.

b) **Derleme türü yazılarda;** tercihen yazar sayısı ikiden fazla olmamalıdır. Yazar(lar) daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olmalı; bu deneyimlerini derleme yazısında tartışmalı ve kaynak olarak göstermelidir. Derlemelerde Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet ve anahtar sözcükler bulunmalıdır.

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

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

12- Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

13- Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
Yayın ve Dokümantasyon Müdürlüğü

Tel : (0312) 458 23 64 Faks : (0312) 458 24 08 e-posta : turkhijyen@rshm.gov.tr

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

- Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı yayın organıdır. Dergi üç (3) ayda bir çıkar ve dört (4) sayıda bir cilt tamamlanır.
- Dergide mikrobiyoloji, immünoloji, farmakoloji, toksikoloji, parazitoloji, entomoloji, biyokimya, gıda güvenliği, çevre sağlığı, halk sağlığı, epidemiyoloji, patoloji, fizyopatoloji, molekuler biyoloji ve genetik ile ilgili alanlardaki özgün araştırma, olgu sunumu, derleme, editöre mektup türündeki makaleler Türkçe ve İngilizce olarak yayımlanır.
- Dergide, daha önce başka yerde yayınlanmamış ve yayınlanmak üzere başka bir dergide inceleme aşamasında olmayan makaleler yayımlanır.
- Dergi Yayın Kurulu ve Bilimsel Danışma Kurulu tarafından uygun görülen yazılar, konu ile ilgili en az iki Bilimsel Danışma Kurulu Üyesinden olumlu görüşü alındığında yayımlanmaya hak kazanır. Bu kurulların, yazının içeriğini değiştirmeyen her türlü düzeltme ve kısaltmaları yapma yetkileri vardır.
- Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlarına aittir.
- Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.
- Dergide yayınlanan yazıların yayın hakkı Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne aittir. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

YAZAR İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

- Bütün yazarlarca isim sırasına göre imzalanmış telif hakkı devir formu eksiksiz olarak dolduruldu.
 - Yazar isimleri açık olarak yazıldı.
 - Her yazarın bağlı bulunduğu kurum adı, yazar adının yanına numara verilerek başlık sayfasında belirtildi.
 - Yazışmalardan sorumlu yazarın adı, adresi, telefon-faks numaraları ve e-posta adresi verildi.
 - Türkçe ve İngilizce başlıklar ile kısa başlık yazıldı.
 - Türkçe ve İngilizce özetlerin kelime sayısı (300-500 arası) kontrol edildi.
 - Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler (MeSH'e uygun) verildi.
 - Tüm kısaltmalar gözden geçirildi ve standart olmayan kısaltmalar düzeltildi.
 - Metin içerisinde geçen orijinal Latince mikroorganizma isimleri italik olarak yazıldı.
 - Metin içerisinde bahsedilen birimlerin sembolleri the Système International (SI)'e göre verildi.
 - Yazılar "miş'li geçmiş" zaman edilgen kip ile yazıldı.
 - Metnin tamamı 12 punto Times New Roman karakteri ile çift aralıkla yazıldı.
 - Metin sayfanın yalnız bir yüzüne yazılarak her bir kenardan 2.5 cm boşluk bırakıldı.
 - Tablolar, şekiller yazım kurallarına uygun olarak ve her biri ayrı bir sayfada verildi.
 - Fotoğraflar JPEG formatında aktarıldı.
 - Kaynaklar cümle sonlarında parantez içinde ve metin içinde kullanım sırasına göre ardışık sıralandı.
 - Kaynaklar, makale sonunda metin içinde verildiği sırada listelendi.
 - Kaynaklar gözden geçirildi ve tüm yazar adları, ifade ve noktalamalar yazım kurallarına uygun hale getirildi.
- Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız.**
- Etik kurul onayı alındı.
 - Bilimsel kuruluş ve/veya fon desteği belirtildi.
 - Kongre/Sempozyumda sunumu ve sunum türü belirtildi.
 - Varsa teşekkür bölümü oluşturuldu.

YAZARLARIN DİKKATİNE

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

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi online makale kabulüne başlamıştır.

Ayrıntılı bilgi için :

www.turkhijyen.org

**Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi;
CABI Index, Index Copernicus ve Google Scholar
tarafından dizinlenmektedir.**

İLETİŞİM

**Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi
Yayın ve Dokümantasyon Müdürlüğü**

**Cemal Gürsel Caddesi No: 18
06100 Sıhhiye/ANKARA**

Tel: +90 0312 458 23 64

Faks: +90 0312 458 24 08

e-posta: turkhijyen@rshm.gov.tr

[http: www.rshm.gov.tr](http://www.rshm.gov.tr)

www.turkhijyen.org

İÇİNDEKİLER

■ Araştırma Makalesi

- 1. Piliç Kümesleri ve Kesimhanelerinde *Campylobacter jejuni* Kontaminasyonunun Belirlenmesi** 57-64
Ahmet KOLUMAN
 - 2. Sentetik Piretroid Bir İnsektisit Olan Tetrametrin'in Albino Fare (*Mus musculus*)'lerin Serum Proteinleri Üzerine Etkileri** 65-71
Mustafa ÇALIŞKAN
 - 3. Bir Lisede Öğrenim Gören Yabancı Uyruklu Erkek Öğrencilerde Selofan-Bant Yöntemi ile *Demodex* sp. Araştırılması** 73-77
Muhittin KAYA, Berna HAMAMCI, Ülfet ÇETİNKAYA, Ozan YAMAN, Süleyman YAZAR
 - 4. Seröz ve Müsinöz Over Kanserleri ile Ki-67 İlişkisi** 79-84
Faruk ABİKE, Sema ZENGEROĞLU, Osman TEMİZKAN, Ahmet PAYASLI, Ömer Lütfi TAPISIZ
- ### ■ Derleme
- 5. Genomik, Proteomik, Metabolomik Kavramlarına Genel Bakış ve Uygulama Alanları** 85-96
Esin BAŞARAN, Sümer ARAS, Demet CANSARAN-DUMAN
 - 6. Organofosfatlı Pestisit Zehirlenmeleri ve Serum Paraoksonaz 1 (PON1) Enziminin Organofosfat Metabolizmasındaki Rolü** 97-112
Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

CONTENTS

■ Original Article

- 1. Detection of *Campylobacter jejuni* Contamination in Poultry Houses and Slaughterhouses** 57-64
Ahmet KOLUMAN
 - 2. The Effects of the Synthetic Pyrethroid Insecticide Tetrametrin on the Serum Proteins of Albino Mice (*Mus musculus*)** 65-71
Mustafa ÇALIŞKAN
 - 3. Investigation of *Demodex* sp. Using Cellophane Tape Method in Foreign Male Students in a High School** 73-77
Muhittin KAYA, Berna HAMAMCI, Ülfet ÇETİNKAYA, Ozan YAMAN, Süleyman YAZAR
 - 4. Correlation Between Ki-67 and Serous-Mucinous Ovarian Carcinomas** 79-84
Faruk ABİKE, Sema ZENGEROĞLU, Osman TEMİZKAN, Ahmet PAYASLI, Ömer Lütfi TAPISIZ
- ### ■ Review
- 5. General Outlook and Applications of Genomics, Proteomics and Metabolomics** 85-96
Esin BAŞARAN, Sümer ARAS, Demet CANSARAN-DUMAN
 - 6. Organophosphate Pesticide Poisonings and the Role of Serum Paraoxonase 1 (PON1) Enzyme in Organophosphate Metabolism** 97-112
Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

PİLİÇ KÜMESLERİ VE KESİM HANELERİNDE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* KONTAMİNASYONUNUN BELİRLENMESİ

Detection of *Campylobacter jejuni* Contamination in Poultry Houses and Slaughterhouses

Ahmet KOLUMAN¹

¹ Tarım Bakanlığı,
Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı,
Mikrobiyoloji Laboratuvarı,
ANKARA

Geliş Tarihi: 19.03.2010
Kabul Tarihi: 06.06.2010

İletişim:

Ahmet KOLUMAN
T.C. Tarım Bakanlığı,
Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı,
Mikrobiyoloji Laboratuvarı,
Fatih Sultan Mehmet Bulvarı,
No: 70, Yenimahalle-ANKARA

Tel : +90 312 327 41 81
E-posta : ahmetkoluman@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, piliç kesimhanelerinde yeni kesilmiş piliç karkaslarından alınan piliç boyun derileri ve bağırsak içeriği ile piliçlerin kesimhaneye getirildiği kümeslerden alınan yem ve su örneklerinde termofilik *Campylobacter* türlerini kültür tekniği ile belirlenmesi ve *Campylobacter jejuni* olarak saptanan suşların PCR tekniği ile doğrulanması amaçlanmıştır.

Yöntem: İki farklı piliç kesimhanesinden sıcak (Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos) ve soğuk aylarda (Kasım, Aralık, Ocak, Şubat) 160 adet piliç boyun derisi, 160 adet bağırsak içeriği ile 32'şer adet yem ve su örneği olmak üzere toplam 384 örnek alınmıştır. Alınan tüm örneklerde, termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyon ve identifikasyonunda zenginleştirme işlemine dayalı ISO (The International Organization for Standardization, 10272) yöntemi kullanılmıştır. Suşlar *ceuE* geni ile doğrulanmıştır.

Bulgular: Toplam 384 örneğin 248 (% 64.58)'inin termofilik *Campylobacter* türleri ile kontamine olduğu saptanmıştır. 160 boyun derisi örneğinin 138 (% 86.25)'i, 160 bağırsak içeriği örneğinin 106 (% 66.25)'i ve 32 su örneğinin dördünde (% 12.5) termofilik *Campylobacter* türleri saptanmıştır. Yemlerden yapılan analizlerde ise her hangi bir etken bulunamamıştır. *Campylobacter* türleri saptanan 138 boyun derisi örneğinden 82 (% 51.25)'sinin, 106 bağırsak içeriği örneğinden 122 (% 76.25)'sinin ve dört kümes suluk örneğinden üçünün *C. jejuni* olduğu belirlenmiştir. Suluklardan saptanan tüm etkenler kase tipi olanlardan izole edilmiş olup damla tipi olanlardan alınan örneklerin hiçbirinde *Campylobacter* türü belirlenmemiştir. Her iki işletmeden alınan 80'er boyun ve bağırsak içeriği ile 16'şar su ve yem örneği olmak üzere toplam 192'şer örneğin sıcak aylarda 116 (% 60.42)'sında soğuk aylarda ise 91 (% 47.40)'inde *C. jejuni* saptanmıştır. Sıcak aylarda alınan örneklerdeki kontaminasyon oranı soğuk aylara oranla % 14.20 daha yüksek bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu ($p=0.0021$) belirlenmiştir. Klasik kültür yöntemleriyle tanımlanan 207 *C. jejuni* suşu, 171 (% 82.00)'i PCR tekniği ile de doğrulanmıştır. Toplam 384 örnekten 1220 adet termofilik *Campylobacter* suşu izole edilmiş ve bunların ISO yöntemine göre yapılan tanımlama testleri sonucunda 649'unun *C. jejuni*, 515'inin *C. coli*, 56'sının *C. lari* olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Piliç kümeslerinden kesimhaneye getirilen piliçlerin, kesim işlemine bağlı olarak *C. jejuni* ile kontamine olduğu ve izolasyon ve tanımlamada *ceuE* ile yapılan doğrulanmanın uygun olduğu düşünülmektedir. Elde edilen verilerin ışığında *Campylobacter jejuni*'nin kanatlı etlerinde bulunduğu ve bunun halk sağlığı yönünden önem gösterdiği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: PCR, Piliç, *Campylobacter*

ABSTRACT

Objective: This study was designed to determine the presence of thermophilic *Campylobacter spp.* using the conventional cultural technique from neck skin, intestinal contents of slaughtered chickens, and water, feed samples of same flock taken at the farm level. *C. jejuni* strains obtained using conventional cultural techniques were confirmed using the PCR technique.

Method: 384 samples consisting of 160 chicken neck skin, 160 intestinal content, 32 feed, and 32 water samples were obtained from two different slaughterhouses in hot (May, June, July, August) and cold months (November, December, January, February). The enrichment based ISO (The International Organization for Standardization, 10272) method was used for the isolation and identification of thermophilic *Campylobacter spp.* in all samples. Strains were verified by *ceuE* gene.

Results: 248 (64.58%) of the 384 samples were found to be contaminated with thermophilic *Campylobacter* species. 138 (86.25%) of the 160 chicken neck skin, 106 (66.25%) of the intestinal content and 4 (12.5%) of the 32 water samples were contaminated with thermophilic *Campylobacter* species. Nothing was found in the analysis of feed. *C. jejuni* was the species of *Campylobacter* determined in 82 (51.25%) of the 138 neck skin samples, 122 (76.25%) of the 106 intestinal contents samples and three of the four sets of drinker samples. All the factors identified in the drinkers were isolated from bowl type ones and *Campylobacter* species could not be determined in none of the samples of nipple type watering system. *C. jejuni* was determined in 116 (% 60.42) of the samples in hot months and 91 (% 47.40) in cold months of the 192 samples in total taken from each farm, 80 intestinal content, 80 neck, 16 water and 16 feed samples). Contamination rate for the samples taken in warmer months was 14.20% higher than in colder months and the difference was statistically significant ($p = 0.0021$). 171 (82.00%) of the 207 *C. jejuni* strains defined by classical culture methods were also confirmed with PCR technique. 1220 thermophilic *Campylobacter* strains isolated from 384 samples in total and they were identified in 649 as *C. jejuni*, 515 as *C. coli* and 56 as *C. lari* according to ISO methods.

Conclusion: It was determined that *C.jejuni* contamination of chicken flocks in slaughter houses occurs during the processing. *ceuE* gene is found to be a good primer for confirmation of the presence of thermophilic *Campylobacter spp.* in the strains. Data acquired from this study underlines that *Campylobacter jejuni* found in poultry meat is an important public health hazard.

Key Words: PCR, Chicken, *Campylobacter*

GİRİŞ

Diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye’de de beyaz et üretiminde kanatlı yetiştiriciliği ve kanatlı eti üretim sektörlerinde çok hızlı bir büyüme meydana gelmiştir. Ancak, piliç eti tüketimindeki artışa bağlı olarak gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarında da belirgin bir artış olduğu ve özellikle piliç eti tüketiminden kaynaklanan gıda enfeksiyonlarında *Campylobacter jejuni*’nin birinci derecede rol oynadığı bildirilmiştir (1-3). Bunun sonucunda oluşan gastroenterit ve Guillain Barré Sendromu gibi komplikasyonların hem iş gücü kaybına hem de tedavi masraflarına yol açarak önemli ekonomik kayıplara neden olduğu bildirilmektedir (4).

Klasik kültür tekniklerinin hem pahalı olması hem de çok zaman almalarından dolayı tanımlamada daha duyarlı ve hızlı tanımlama tekniklerinin geliştirildiği kaydedilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR), invivo koşullarda gerçekleşen DNA replikasyon işleminin, invitro koşullara taşınması olarak tanımlanmıştır. Gonzalez ve ark., *C. jejuni* ve *C. coli*’nin ayırımında her iki türde farklı dizilim gösteren ve siderofor taşıma proteinini kodlayan *ceuE* genini kullandıklarını bildirmişlerdir (5).

Bu çalışmada piliç kümesleri ve kesimhanelerinden alınan örneklerde termofilik *Campylobacter* türlerinin

varlığı saptanarak mevsimsel dağılımı incelenmiş ve elde edilen kültürlerden *C. jejuni*'nin *ceuE* geni kullanılarak PCR ile doğrulanmasının yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiş ve iki aşamadan oluşmuştur. Birinci aşamada, örneklerde termofilik *Campylobacter* türlerinin varlığı klasik kültür tekniği ile belirlenmiş, ikinci aşamada ise klasik kültür tekniği ile *C. jejuni* olarak belirlenen izolatların, PCR tekniği ile doğrulanması yapılmıştır. Bu amaçla, çalışmanın birinci aşamasında farklı iki 160 adet piliç boyun derisi ile 160 bağırsak içeriği alınmıştır. Ayrıca piliçlerin kesime geldiği kümeslerden alınan 32'şer adet yem ve su örneğini içeren toplam 384 materyalde, klasik kültür tekniği kullanılarak termofilik *Campylobacter*'lerin varlığı araştırılmıştır. Mevsimsel farklılığın etkisini belirlemek amacıyla kümeslere sıcak (Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos) ve soğuk aylarda (Kasım, Aralık, Ocak, Şubat) ikişer kez gidilmiş ve her bir gidişte 10 boyun derisi, 10 bağırsak içeriği ile ikişer adet yem ve su örneği alınmıştır. Alınan tüm örneklerde, termofilik *Campylobacter* türlerinin izolasyon ve identifikasyonda zenginleştirme işlemine dayalı ISO (The International Organization for Standardization, 10272) yöntemi kullanılmıştır (6). Bu kapsamda, 25g örnek 225ml Bolton broth içerisinde 24 saat 42°C'de mikroaerofilik olarak inkübe edilmiştir. Inkübasyonu takiben bir öze dolusu ön zenginleştirme alınarak CCD (Charcoal Cephaperazon Deoxycholate) agara çizilmiş ve mikroaerofilik olarak 48 saat 42°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Takiben *Campylobacter spp* açısından tipik koloniler kanlı agara aktarılmış 24 saat 42°C'de mikroaerofilik olarak inkübe edilmiş ve buradan da Mueller Hinton Agar'da nalidiksik asit ve sefalotin antibiyotik dirençlilikleri yönünden incelenmiştir. Takiben hippurat analizi yapılarak hippurat pozitif, nalidiksik asite duyarlı sefalotine dirençli suşlar *C. jejuni* olarak kabul edilmiştir. Tüm

aşamalarda pozitif kontrol amacıyla *C. jejuni* (ATCC 33291,) ve negatif kontrol amacıyla *Escherichia coli* (ATCC 25922,) kullanılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında, klasik kültür tekniği ile *C. jejuni* olarak belirlenen suşların PCR tekniği ile doğrulanması yapılmıştır. PCR işlemi için Gonzales ve ark. (1997) tarafından önerilen *ceuE* geni JEJ1:5'CCTGCTACGGTAAAGTTTTGC'3 JEJ2:5'GATCTTTTGTGGTGCTGC'3 amplifikasyonu kullanılmıştır (5).

Bu amaçla, -70°C'de muhafaza edilen suşlar çözündükten sonra, 1-2 öze dolusu materyal ön zenginleştirme CCD agara geçilerek, 42°C'de 24-48 saat süreyle mikroaerofilik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. CCD agarda üreyen koloniler 1 ml steril bidistile su içerisinde süspanse edilip, 95°C'de 10 dakika süreyle su banyosunda tutulmuştur. Su banyosundan çıkartılan örnekler, 4°C'de 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek DNA ekstraksiyonu sağlanmıştır. Gonzales ve arkadaşları'nın önerdiği protokol gereği toplam 25 µl hacimde optimum konsantrasyonlar şu şekilde kullanılmıştır (5): 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM deoksiribonükleotid karışımı, 1 µM her bir primerden, 0.5 U Taq polymerase. Tüm karışım bir ependorf tüpe konularak, üzerine 2 µl DNA örneği ilave edilerek mineral yağ ile kapatılmıştır. Örnekler ısı döngüsü cihazında (Biometra Personel Cycler) 30 döngü (94 °C'de 30 saniye, 57 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 dakika, 94 °C'de 3 dakika ve son aşamada 72 °C'de 5 dakika, 4°C'de muhafaza) geçirecek biçimde tutulmuştur. Bunu takiben PCR amplifikasyon ürünlerinden 10 µl alınarak, 2 µl fikol brom fenol mavisi ile boyanmıştır. Elektroforez (Biometra Agagel Maxi, B15359) işlemi, 1 µl/ml etidyum bromid içeren % 1.5 agaroz jelde, 100 volt altında (Biometra Powerpack P25) bir saat yürütülerek yapılmıştır. Daha sonra agaroz jel transilüminatöre (Biometra TI1 UV) aktarılmış, DNA Marker yardımıyla *ceuE*'nin 793 bp'lik amplifikasyon ürünleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (5).

Mikrobiyolojik analiz bulgularının istatistiksel değerlendirilmesi için Ki Kare Testi kullanılmıştır. Bu amaçla SPSS (11.5) istatistik hazır paket programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler örneklerden izole edilen *C. jejuni* verileri dikkate alınarak mevsimsel ve işletmeler arasındaki farklılıklar yönünden yapılmıştır (SPSS, versiyon 11.5, Ref. No:9024147)

BULGULAR

Bu çalışma, 2004 ve 2005 yıllarında sıcak aylar (Mayıs, Haziran, Temmuz, Ağustos) ve soğuk aylarda (Kasım, Aralık, Ocak, Şubat) iki farklı piliç kesimhanesinde gerçekleştirilmiştir. Alınan toplam 384 örnekte (160 adet piliç boyun derisi, 160 adet piliç bağırsak içeriği, 32 adet su ve 32 adet yem örneği) klasik kültür yöntemi kullanılarak termofilik *Campylobacter* türlerinin varlığı araştırılmıştır. Klasik kültür yöntemiyle *C. jejuni* olarak belirlenen izolatlarının PCR tekniği ile doğrulanması yapılmıştır.

Bu kapsamda incelenen toplam 384 örneğin 248 (% 64.58)'inin, termofilik *Campylobacter* türleri ile kontamine olduğu saptanmıştır.

160 boyun derisi örneğinin 138 (% 86.25)'i termofilik *Campylobacter* türleri ile kontamine olduğu ve bunların da 122 (% 76.25)'sinin *C. jejuni* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 160 bağırsak içeriği örneğinin 106 (% 66.25)'sinin termofilik *Campylobacter* türleri ile kontamine olduğu ortaya konulmuş, bunlardan 82 (% 51.25)'sinde *C. jejuni* olduğu saptanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Piliçlerden alınan örneklerde termofilik *Campylobacter* ve *C. jejuni* kontaminasyon düzeyleri

Örnek Tipi (n)	Pozitif örnek/Analiz edilen örnek (%)	
	<i>Campylobacter</i> spp. saptanan örnek sayısı (%)	<i>C. jejuni</i> saptanan örnek sayısı (%)
Boyun Derisi (n=160)	138 (86.25)	122 (76.25)
Barsak İçeriği (n=160)	106 (66.25)	82 (51.25)
Toplam (n=320)	244 (76.25)	204 (63.75)

Kümeslerden toplanan sekizi kase suluk, 24'ü damla suluk sisteminden olmak üzere alınan toplam 32 su örneğinin dördünde (% 12.5) termofilik *Campylobacter* türleri saptanmıştır. Kase suluklardan alınan sekiz örneğin dördünün (% 50), termofilik *Campylobacter* türleri ile kontamine olduğu saptanmasına karşın damla suluklardan alınan örneklerin hiçbirinde (% 0) termofilik *Campylobacter* türü belirlenememiştir. Kümes suluklarından saptanan dört termofilik *Campylobacter* türünden üçünün *C. jejuni* olduğu ortaya konmuştur.

Yemlerden yapılan analizlerde hiç termofilik *Campylobacter* bulunamamıştır.

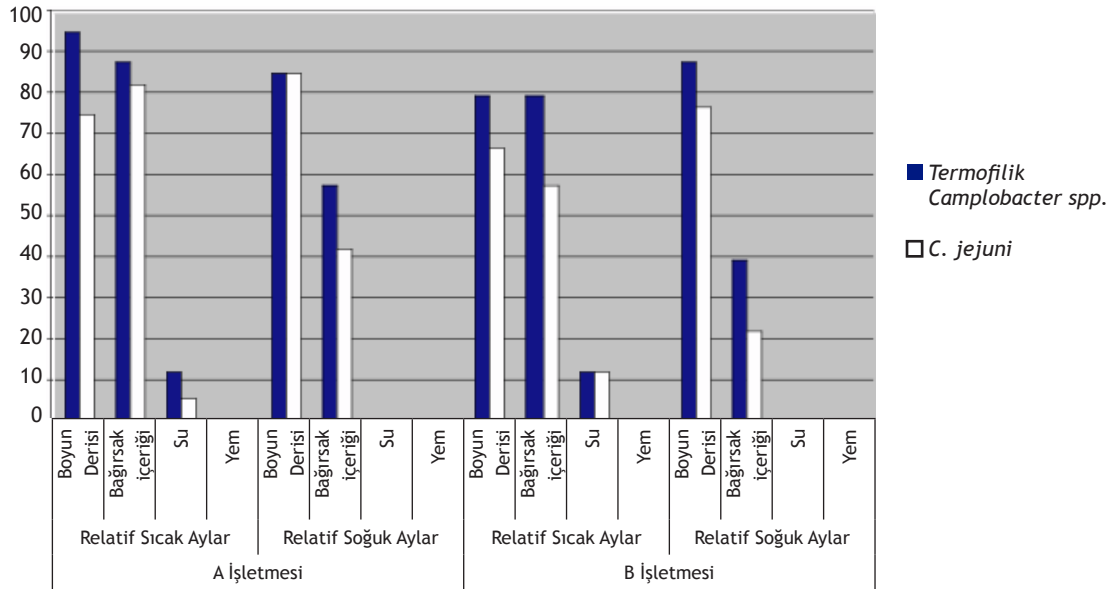
Her iki işletmeden alınan 80'er boyun ve bağırsak içeriği ile 16'şar su ve yem örneği olmak üzere toplam 192'şer örneğin sıcak aylarda 116 (% 60.42)'sında soğuk aylarda ise 91 (% 47.40)'inde *C. jejuni* saptanmıştır (Tablo 2). Sıcak aylarda alınan örneklerde *C. jejuni* kontaminasyonu, soğuk aylara oranla daha yüksek düzeyde (% 14.20) bulunmuştur. İstatistiksel yönden yapılan analizde de mevsimsel farklılığın önemli olduğu (p=0.0021) belirlenmiştir.

İşletmelerden farklı aylarda toplanan örneklerin kontaminasyon durumu Şekil 1'de özetlenmiştir.

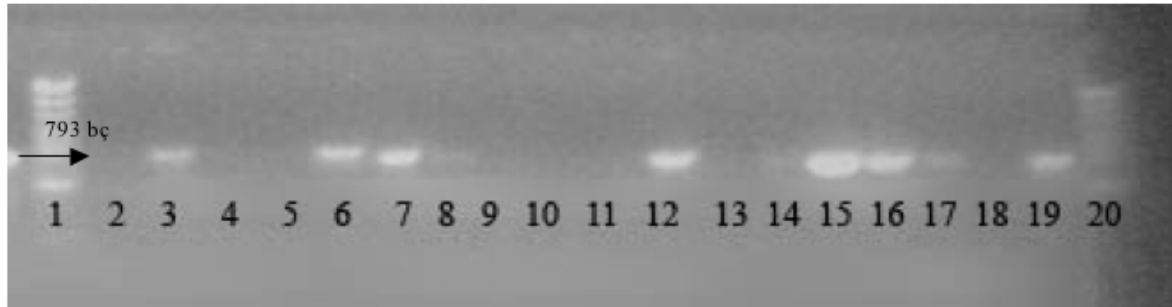
Bu çalışmanın ikinci aşamasında, klasik kültür tekniği ile *C. jejuni* olarak belirlenen suşların PCR tekniği ile doğrulanması yapılmıştır. Klasik kültür yöntemleriyle identifiye edilen 207 *C. jejuni* suşunun 171 (% 82.00)'i PCR tekniği ile de doğrulanmıştır. Elde edilen PCR sonuçlarından bazıları örnek olarak Şekil 2'de sunulmuştur.

Tablo 2. Piliçlerden alınan örneklerde saptanan *C. jejuni* kontaminasyonunun mevsimsel dağılımı

Örnek tipi	Pozitif örnek/Analiz edilen örnek (%)	
	Sıcak Aylar	Soğuk Aylar
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
Boyun derisi	57/80 (71.25)	65/80 (81.25)
Bağırsak içeriği	56/80 (70.0)	26/80 (32.50)
Suluk örnekleri	3/16	0/16
Yem örnekleri	0/16	0/16
Toplam	116/192 (60.42)	91/192 (47.40)



Şekil 1. İki farklı piliç kesimhanesinde ve farklı örneklerde saptanan termofilik *Campylobacter* türleri ve *C.jejuni* kontaminasyonunun mevsimsel dağılımı.



Şekil 2. Piliçlerde saptanan *C.jejuni* suşlarından elde edilen PCR amplifikasyon ürünleri örnekleri. [1 ve 20 DNA marker, 2-4-5-9-10-11-13-18 negatif sonuç, 3-6-7-8-12-16-17-19 pozitif sonuçlar, 15 pozitif kontrol, 14 negatif kontrol (bidistile su)].

Toplam 384 örnekten 1220 adet termofilik *Campylobacter* suşu izole edilmiştir. İzole edilen suşların ISO yöntemine göre yapılan tanımlama testleri sonucunda 649'unun *C. jejuni*, 515'inin *C. coli*, 56'sının *C. lari* olduğu saptanmıştır.

TARTIŞMA

Jorgensen ve ark. yaptıkları çalışmada, 181 boyun derisi örneğinin 157 (% 86.74)'sinde termofilik *Campylobacter* türlerinin varlığını rapor etmişlerdir (7). Benzer şekilde, Berndtson ve ark. kesim sırasında

örnekledikleri 100 adet pilice ait boyun derisi, karn boşluğu ve göğüs etinde termofilik *Campylobacter* türlerinin ortalama %83 düzeyinde bulunmasına karşın, boyun derisi örneklerinde termofilik *Campylobacter* türlerinin % 89 düzeyinde bulunduğunu bildirmişlerdir (8). Berrang ve ark. svap tekniği ile aldıkları 120 göğüs derisi örneğinin 95 (% 79.16)'inin termofilik *Campylobacter* türleri ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir (9). Rivoal ve ark. 10'ar adet piliç boyun derisi örneğini gruplandırarak, tek örnek olarak kabul ettikleri çalışmada 20 grup incelemişler ve bu

gruplardan 18 (% 90)'inin termofilik *Campylobacter* türleri ile kontamine olduğunu bildirmişlerdir (10).

Rivoal ve ark. 10'arlı gruplar halinde aldıkları 20 adet boyun derisi örneğinin (n=200) 16 (% 80)'sında *C. jejuni* kontaminasyonu saptamışlardır (28). Ono ve Yamamoto ise, piliç kesimhanesinden iç organ çıkartma işlemini takiben aldıkları, 44 piliç karkas örneğinde *C. jejuni* kontaminasyonunun % 77.8 düzeyinde olduğunu bildirmişlerdir (11).

Bu çalışmanın bulgularıyla uyum gösteren, Cox ve ark. tarafından yapılan çalışmada 35 adet sürüden alınan toplam 875 adet dışkı örneğinin, 542 (% 62)'sinin termofilik *Campylobacter* türleri ile kontamine olduğu bildirilmiştir (12). Kesimhanelerden alınan bağırsak içeriği örneklerinde termofilik *Campylobacter* türleriyle kontaminasyon üzerine yapılan çalışmalarda, Musgrove ve ark. % 63.30, Saleha (13, 14) % 72.63 düzeylerinde kontaminasyon bildirilmiş olup, bu çalışmanın sonuçları ile uyumludur.

Bağırsak içeriği örneklerinde *C. jejuni*'nin Diker ve ark. % 42.70, Diker ve ark. % 50.70, Beery ve ark. % 55.60, Diker ve Yardımcı % 39.10, Stern ve ark. % 40.90, Saleha % 51.50, Shreeve ve ark. % 53, Herman ve ark. % 54 ve Berrang ve ark. % 63 düzeyinde bulunduğu bildirilmiş olup, araştırmacıların sonuçları ile bu çalışmanın bulguları genelde uyum göstermektedir (15-23).

Berndtson ve ark. yaptıkları çalışmada, 18 piliç kümesine ait kase suluk ve damla suluk sistemlerinden aldıkları su örneklerinden sadece kase suluklarda % 21.00 düzeyinde kontaminasyon olduğunu rapor etmişlerdir (24). Yapılan başka bir çalışmada ise piliç kümeslerindeki kase suluklardan alınan 300 adet svap örneğinin 90 (% 31.00)'ünün, termofilik *Campylobacter* türleri ile kontamine olduğu bildirilmiştir (9). Bu çalışmada, damla suluk sistemlerinden alınan örneklere ilişkin bulgular, başka bir çalışmada damla suluk sistemlerinden alınan örneklere ilişkin bulgularla uyumludur (24). Aynı şekilde, bu çalışmada kase suluklarda saptanan bulgular (% 50.00), Berndtson

ve ark. ile Berndtson ve ark. (25) bulgularından (% 21-31) yüksek olup, bu farklılığın muhtemelen örnek sayısı ile kümes hijyeninden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür (24-25). Benzer şekilde, yapılan bazı çalışmalarda da (24-26) kase suluklardan alınan su örneklerinin hiçbirinde termofilik *Campylobacter* türünün bulunmadığı rapor edilmiştir. Ancak, Jones ve ark. çalışmalarında kase su örneklerinde termofilik *Campylobacter* türünün bulunmamasının beklenmedik bir sonuç olduğunu ve bunun kümes içerisindeki ölü piliçlerin bulundurulmamasıyla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (25). Aynı şekilde, Evans ve Sayers'de 100 sürüye ait kümeslerden alınan, kase klorlu su örneklerinin hiçbirinde termofilik *Campylobacter* türünün bulunmadığını bildirmişlerdir (27).

Berndtson ve ark. piliç kümeslerindeki kase suluklardan aldıkları, 300 adet sürüntü örneğinin 72 (% 24)'sinde *C. jejuni* saptamışlardır (9). Aynı şekilde başka bir çalışmada da 18 piliç kümesinin kase suluk ve damla suluk sistemlerinden alınan su örneklerinden sadece, kase suluklarda % 18 düzeyinde *C. jejuni* kontaminasyonu olduğu bildirilmiştir (24). Bu çalışmada, kümeslerden alınan 32 adet yem örneğinin hiçbirinde termofilik *Campylobacter* türü bulunamamıştır. Benzer şekilde yapılan çalışmalarda, Jones ve ark. ile Pearson ve ark. kümeslerden aldıkları sırasıyla 10 ve 18 adet yem örneğinde, termofilik *Campylobacter* türü saptayamamışlardır (9, 26). Yine, Berndtson ve ark. da 18 adet kümeden aldıkları yem örneklerinin hiçbirinde, termofilik *Campylobacter* türünün bulunmadığını rapor etmişlerdir (9).

Klasik kültür tekniği ile *C. jejuni* olarak belirlenen suşların, PCR tekniği ile doğrulandığı çalışmalarda elde edilen veriler arasında farklılıklar bulunduğu görülmektedir. Bazı araştırmacılar, PCR tekniği ile doğrulamasını yaptıkları *C. jejuni* suşlarının PCR tekniğinde % 100 düzeyinde olduğunu bildirmişlerdir. Bu bağlamda, Gonzalez ve ark. *ceuE* genine özgü primer ile yaptıkları çalışmalarında, 12 adet *C. jejuni* suşunun tamamını (% 100) PCR tekniğinde saptamışlardır (5). Aynı şekilde başka bir çalışmada kültür tekniği ile piliç

bağırsak içeriği ve karaciğerlerden izole ettikleri *C. jejuni* suşlarının tamamının (% 100) *ceuE* gen sekansını taşıdıklarını belirlemişlerdir (29). Benzer şekilde, Wang ve ark. da *ceuE* genine özgü primer ile yaptıkları çalışmada, 70 adet *C. jejuni* suşunun tamamının (%100) multipleks PCR ile doğrulandığını bildirmişlerdir (30). Nayak ve ark. piliç kesimhanelerinden aldıkları bağırsak içeriği, karaciğer ile diyareli hastaların dışkı örneklerinden izole edilen *C. jejuni* suşlarının, *ceuE* gen sekansını kullanarak PCR işlemiyle % 97'sini doğrulamışlardır (30). Araştırmacılar ayrıca, yüksek MgCl₂ konsantrasyonları (3.5 mM) ile elde edilen PCR ürünlerinin, elektroforez sonucunda daha belirgin bantlar oluşturduğunu vurgulamışlardır. Wang ve ark. *ceuE* genine özgü primer kullanarak yaptığı PCR işlemi sonucunda, kültür tekniğinde pozitif olarak belirlenen suşların % 8'nin PCR tekniğinde doğrulanmadığını bildirmişlerdir (31). Araştırmacılar negatif sonuçların nedenini, muhtemelen ekstraksiyon sırasında koloniyle alınan besiyerlerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Nitekim Ng ve ark. da besi yeri içeriğinde bulunan pepton ve agar kalıntısının, PCR ürünlerinin oluşmasını inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (31).

Çalışma sonucunda, klasik kültür tekniğinde *C. jejuni* olarak belirlenen 207 suşun 171 (% 82)'i PCR tekniğinde de doğrulanmıştır. *C. jejuni*'nin tanımlamasında önem arz eden hippurat hidrolizi ve antibiyotik dirençlilik testlerinin, güvenilirliği düşük olduğundan yanıltıcı sonuçlar olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, termofilik *Campylobacter* türlerinin belirlenmesinde, türlere özgü primerler ile PCR tekniğinin daha hızlı ve güvenilir olacağı düşünülmektedir. Halk sağlığı yönünden ucuz protein kaynağı olan kanatlı etine olan talep yükselmekte buna karşılık bu talebi karşılayacak hijyenik üretilmiş arz sağlanamamaktadır. Çiftlikten sofraya bulaşma kaynaklarının ortaya konulması halk sağlığı yönünden katma değer sağlamaktadır.

Teşekkür ve Bilgi

Mahmut TATLİDEDE'ye maddi katkılarından dolayı teşekkür ederim. Bu çalışmanın tamamı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda yürütülen "Piliç karkaslarına ait boyun derilerinde termofilik *Campylobacter* türlerinin varlığı ve *C. jejuni*'nin PCR tekniği ile saptanması" başlıklı doktora tezinden alınmıştır.

KAYNAKLAR

1. Anonymous. Control of *Campylobacter* species in the food chain. 2002; Erişim Adresi: <http://www.fsai.ie> Erişim Tarihi: 22.11.2004.
2. Anonymous. UK-wide survey of Salmonella and *Campylobacter* contamination of fresh and frozen chicken on retail sale. Food Standards Agency. 2002.
3. Anonymous. Institute of Food Science and Technology: Campylobacteriosis and how to safe guard against it? 2003b; Erişim adresi: <http://www.ifst.org/hottop3.htm> Erişim tarihi:02.02.2004.
4. Anonymous. A review of campylobacteriosis in humans and animals from the eastern region 1999; ERHA Zoonosis Committee. Erişim adresi: <http://www.erha.org> Erişim tarihi: 18.05.2006.
5. Gonzalez I, Grant KA, Richardson PT, Park SF, Collins, MD. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. J Clin Microbiol, 1997; 35: 759-63.
6. Anonymous. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for detection of thermotolerant *Campylobacter*. The International Organization for Standardization 10272. 1995.
7. Berndtson E, Tivemo M, Engvall A. Distribution and numbers of *Campylobacter* in newly slaughtered broiler chickens and hens. Int J Food Microbiol, 1992; 15: 45-50

8. Berndtson E, Danielsson-Tham ML, Engwall A. *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Food Microbiol*, 1996; 32: 35-47.
9. Berndtson E, Emanuelson U, Engwall A, Danielsson-Tham ML. A one year epidemiological study of *campylobacters* in 18 Swedish chicken farms. *Prev Vet Med.*, 1996; 26: 167-85.
10. Rivoval K, Denis M, Salvat G, Colin P, Ermel G. Molecular characterization of the diversity of the *Campylobacter* spp. isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross contamination. *Lett Appl Microbiol*, 1999; 29:370-74.
11. Ono K, Yamamoto K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *Int J Food Microbiol*, 1999; 47:211-29.
12. Cox N, Stern N, Musgrove M, Bailey JS, Craven SE, Fedorka-Cray P, Buhr R, Hiatt R. Prevalence and level of *Campylobacter* in commercial broiler breeders (parents) and broilers. *J Appl Poult Res*, 2002; 11: 187-90.
13. Musgrove MT, Berrang ME, Byrd JA, Stern NJ, Cox NA. Detection of *Campylobacter* spp. in ceca and crops with or without enrichment. *Poult Sci*, 2001; 80:825-8.
14. Saleha AA. Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* from broiler chickens in Malaysia. *Int J Poult Sci*, 2002; 1:94-7.
15. Diker S, Aydın N, Yardımcı H, Arda M. Isolation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lariidis* from intestine of broilers. *AÜ Vet Fak Derg*, 1987; 34: 207-15.
16. Diker S, Yardımcı H, Aydın N. Location of thermophilic *Campylobacter* spp. in various parts of chicken intestines. *AÜ Vet Fak Derg*, 1987; 34: 570-76.
17. Beery JT, Hugdahl MB, Doyle MP. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 1988; 54: 2365-70.
18. Diker S, Yardımcı H. Isolation and characterization of *Campylobacter* species from chickens. *Doğa. Tu J Vet Sci*, 1989; 13: 257-64.
19. Stern NJ, Cray PF, Bailey JS, Cox NA, Craven SE, Hiatt KL, Musgrove MT, Ladely S, Cosby D, Mead GC. Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S. poultry production and processing operations. *J Food Prot*, 2001; 11:1705-10.
20. Shreeve JE, Toszegky M, Ridley A, Newell DG. The carry over of *Campylobacter* isolates between sequential poultry flocks. *Avi Dis*, 2002; 46: 378-85.
21. Herman L, Heyndrickx M, Grijspeerd K, Vandekerchove D, Rollier I, Zutter LD. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: Epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol Infect*, 2003; 131: 1169-80.
22. Berrang ME, Dickens JA. Presence and level of *Campylobacter* spp. on broiler carcasses throughout the processing plant. *J Appl Poultry Res*, 2000; 9:43-7.
23. Berrang ME, Buhr RJ, Cason JA, Dickens JA. Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. *J Food Prot*, 2001;64:2063-66.
24. Jones DM, Sutcliffe EM, Fox AJ, Curry A. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J Gen Microbiol*, 1991 ; 137: 2477-82.
25. Jones FT, Axtell RC, Rives DV, Scheideler SE, Tarver JR, Walker RL, Wineland MJ. A survey of *Campylobacter jejuni* contamination in modern broiler production and processing systems. *J Food Prot*, 1991; 54: 259-62.
26. Pearson AD, Greenwood M, Healing D, Rollins D, Shahamat M, Donaldson J, Colwell RR. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 1993; 59:987-96.
27. Ng LK, Kingombe IB, Yan W, Taylor DE, Hiratsuka K, Garcia MM. Specific detection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA hybridisation and PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1997; 63:4558-63.
28. Jørgensen F, Bailey R, Williams S, Henderson P, Wareing DRA, Bolton FJ, Frost JA, Ward L, Humprey TJ. Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw whole chickens in relation to sampling methods. *Int J Food Microbiol*, 2002; 76:151-64.
29. Ertaş HB, Çetinkaya B, Muz A, Öngör H. Tavuk orijinli *Campylobacter coli* ve *Campylobacter jejuni*'nin Polymerase Zincir Reaksiyonu ile tanımlama. *Türk J Vet Anim Sci*, 2002; 26:1447-52.
30. Wang G, Clark C, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus subs. fetus*. *J Clin Microbiol*, 2002; 40:4744-47.
31. Nayak R, Stewart TM, Nawaz M. PCR identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by partial sequencing of virulence genes. *Mol Cellular Prob*, 2005; 19:187-93.

SENTETİK PİRETROİD BİR İNSEKTİSİT OLAN TETRAMETRİNİN ALBİNOFARE (*Mus musculus*)'LERİN SERUM PROTEİNLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ*

The Effects of the Synthetic Pyrethroid Insecticide Tetrametrin on the Serum Proteins of Albino Mice (*Mus musculus*)*

Mustafa ÇALIŞKAN¹

¹Gazi Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri MYO,
ANKARA

Geliş Tarihi: 19.04.2010
Kabul Tarihi: 06.06.2010

İletişim:
Mustafa ÇALIŞKAN
Gazi Üniversitesi,
Sağlık Hizmetleri MYO,
Çevre Sağlığı Programı,
Gölbaşı-ANKARA
Tel : +90-312 484 56 35/130
E-posta : mcaliskan@gazi.edu.tr

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, insan ve hayvan vücudu ile bitkiler üzerinde veya çevresinde yaşayan, besin kaynaklarının üretim, depolanma ve tüketimi sırasında besin değerini düşüren ya da zarara uğratan böcek, kemirici, yabani ot, mantar gibi canlı formlarının yıkıcı etkilerini azaltmak için kullanılan kimyasal maddeler olan sentetik pestisitlerden piretroid insektisit tetrametrinin, albino fare (*Mus musculus*)'lerde serum proteinleri (albumin, α -globulin, β -globulin ve γ -globulin) üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Tetrametrinin subletal dozları (250 ve 500 mg/kg/gün) 4-8 haftalık farelere 13 hafta süreyle ve ağız yoluyla verilmiştir. Deney sonunda, farelerin kalplerinden alınan kan örnekleri Durham tüplerine konarak, 20-25 °C'de 45 dakika boyunca pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra, soğutmalı santrifüjde (+4 °C), 7000-7500 rpm'de ve 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra elde edilen yaklaşık 20-30 μ l serum örneklerindeki serum proteinlerinin analizi selüloz asetat elektroforez yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Çalışma sonunda, kontrol grubu, aseton grubu ve tetrametrinin uygulandığı T1 ve T2 gruplarının serumlarındaki albumin, α -globulin, β -globulin ve γ -globulin düzeyi bakımından dişi ve erkek bireyler arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığından ($p>0.05$) gruplar arası karşılaştırmalarda cinsiyet farkı göz önüne alınmamıştır. Aseton uygulanan farelerin serum protein sonuçlarının da kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$). Tetrametrin uygulanan grupların (250 ve 500 mg tetrametrin/kg/gün) sonuçları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; albumin, α -globulin ve β -globulin miktarlarında meydana gelen değişikliğin istatistiksel açıdan önemsiz; buna karşın her iki grupta da γ -globulin miktarında, kontrol grubuna göre meydana gelen azalmanın istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenmiştir. T1 ve T2 gruplarının sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise albumin, α -globulin ve β -globulin miktarları bakımından farkın önemsiz ($p>0.05$), T2 grubundaki γ -globulin miktarındaki azalmanın, T1 grubuna göre istatistiksel açıdan önemli ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur.

Sonuç: Bu çalışmada tetrametrinin, test grubu deneklerinin serum proteinlerinden γ -globulin'in miktarında azalmaya neden olduğunun saptanmıştır. γ -globulin miktarındaki gözlenen değişikliğin, söz konusu insektisit'in canlı vücudunda humoral bağışıklığı olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülmektedir. Düşük dozlarda da olsa bilinçsiz ev içi insektisit kullanımının insan sağlığına zararları konusunda daha ileri araştırmalar yapılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Sentetik piretroid, tetrametrin, *Mus musculus*, serum proteinleri

* Bu çalışma bilim uzmanlığı tezinin bir bölümüdür.

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to determine the effects of the synthetic pyrethroid insecticide tetramethrin, which is one of the chemicals used to minimize the negative effects (decrease of nutritional value during production, storage and consumption of food sources) of insects, rodents, wild herbs and fungus living on and/or around human and animal body and plants, on serum proteins (albumin, α -globulin, β -globulin and γ -globulin) of albino mice (*Mus musculus*).

Method: Sub lethal dosages (250 and 500 mg/kg/day) of tetramethrin were given orally to mice of 4-8-weeks, for a period of 13 weeks. At the end of the study, blood was collected by heart puncture, and then put into Durham tubes to coagulate at 20-25°C for 45 minutes. Tubes were centrifuged (+4 °C) at 7000-7500 rpm for 15 minutes, after which approximately 20-30 μ l serum was collected. The analysis of the serum proteins was established by cellulose acetate electrophoresis assay.

Results: At the end of the study, gender gap analysis was not taken into consideration between male and female mice, since there were no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the levels of the albumin, α -globulin, β -globulin in the serum of the control group, acetone group and tetramethrin applied T1 and T2 groups. It was determined that the results of serum proteins of mice in the acetone applied group were not statistically different from the control group ($p > 0.05$). Changes of the amounts of the serum albumin, α -globulin and β -globulin in the tetramethrin applied groups (250 and 500 mg tetramethrin / kg / day) compared to the control group were statistically insignificant, whereas the results of the γ -globulin were statistically significant in both groups. The results of albumin, α -globulin and β -globulin quantities are compared between T1 and T2 groups and it were statistically insignificant ($p > 0.05$). On the other hand it was found that decrease in the amount of γ -globulin was statistically significant in T2 group compared to the T1 group results ($p < 0.05$).

Conclusion: In this study it was found that tetramethrin causes a decrease on the amount of γ -globulin in the test group. It is thought that the alteration of γ -globulin caused by this insecticide has specifically a critical impact upon humoral immunity and further investigations should be done about the harmful effects of the unconscious use of this household insecticide, even at low doses, to the human health.

Key Words: Synthetic pyrethroid, tetramethrin, *Mus musculus*, serum proteins

GİRİŞ

Pestisitler, yerinde, uygun dozlarda ve bilinçli olarak kullanıldığında, halk sağlığı ve tarımsal ürünlerin korunması bakımından açlıkla savaşta, ekonomik faydalar sağlayan kimyasallardır. Buna karşın, geniş alanlarda bıraktıkları kalıntılarla su, toprak ve hava kirliliğine neden olarak ekolojik dengeyi bozmaktadırlar. Ayrıca çeşitli yollarla (ağız, solunum ve deri) canlı vücuduna girerek çok düşük miktarlarında dahi zamanla çeşitli organlarda birikmek suretiyle organizmanın normal işleyişini olumsuz yönde etkileyerek istenmeyen bazı durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Pestisitler içinde zararlılara karşı en yaygın olarak kullanılan grup, insektisitlerdir. Dünyada kullanılan insektisitlerin %30'unu sentetik piretroidler

oluşturmaktadır ve hedef organizmaya karşı çok toksik, kuşlar ve memelilere karşı az toksik olmaları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedirler (1). Sentetik piretroidler, toksik etkilerini memeliler ve/veya böceklerdeki sodyum kanalları üzerinde göstererek, periferik ve merkezi sinir sistemlerindeki aksonları etkileyen sinir sistemi zehirleridir (2).

Sentetik piretroid grubundan bir insektisit olan tetrametrin, 1964 yılında sentezlenmiş ve ilk kez 1965 yılında piyasaya sürülmüştür. Çoğunlukla ev zararlılarının kontrolü için aerosol ve spiral sinekkovar şeklinde kullanılmaları, ayrıca diğer insektisitler ve sinerjistler ile kombine olarak hazırlanmaları nedeniyle insanların bu insektisitlere maruz kalması kaçınılmazdır (2).

Kanın 100 gramında 7 g kadar plazma proteini vardır ve bunun %93'ünü serum proteinleri oluşturmaktadır. Bu proteinler, serum albumin ve serum globulinlerdir. Kan plazmasının osmotik basıncını sağlayan en önemli proteinlerinden biri olan serum albumin; ilaç, pigment, kation, anyon vb. maddelerin taşınmasında rol oynar. Ayrıca çözünmeyen globulinlerin çözünmesine ve dengelenmesine de yardım eder. Kan plazmasının osmotik basıncını sağlayan ikinci derecede önemli proteinler olan serum globulinleri, elektroforez ile α , β ve γ -globulin olarak üç fraksiyona ayrılırlar. Bunlardan γ -globulinler, immünoglobulin (Ig) olarak adlandırılan proteinleri içerirler ve bu proteinler vücut savunmasında humoral (sıvısal) bağışıklıkta önemli rol oynarlar (3-5).

Bilimsel literatürde, değişik insektisit gruplarının, çeşitli deney hayvanlarının serum proteinleri veya humoral bağışıklık sistemi üzerine etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına karşın (6-9), sentetik piretroid grubu insektisitlere ait çalışma sayısı daha azdır (10-12). Bu nedenle çalışmada, sentetik piretroid grubu bir insektisit olan tetrametrinin, albino farelerde serum proteinleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yetiştirilen, 19-27 g ağırlıklarındaki erkek ve dişi albino fareler kullanılmış; beslenmelerinde deney süresince pelet yem ve çeşme suyu kullanılmıştır. Çalışma süresince laboratuvarın sıcaklığı $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ve nisbi nem $\%65 \pm 5$ olarak ayarlanmıştır.

Bu çalışmada kontrol, aseton ve tetrametrin grupları olmak üzere dört farklı deney grubu oluşturulmuştur. Çalışmada tetrametrinin, 250 mg/kg (T1 grubu) ve 500 mg/kg (T2 grubu) olmak üzere farklı iki subletal dozu denenmiştir. Tetrametrinin aktif maddesi asetonla çözülerek 250 ve 500 mg/kg'lık dozlar hazırlanmış, farelerin ağırlıklarına göre,

her gün yemlerine toplam 0.1 ml emdirilerek günlük olarak ağız yoluyla verilmiştir. Her iki doz için üç dişi ve üç erkek olmak üzere toplam altı adet fare kullanılmıştır. Çiftleşmeyi önlemek için erkek ve dişiler ayrı ayrı kafeslere konulmuş, bir kafeste en fazla üç fare bulunduğundan, her doz için iki kafes kullanılmıştır. Aynı uygulama, kontrol ve aseton grupları için de yapılmıştır. Kontrol grubu farelerde sadece yem ve çeşme suyu kullanılırken, aseton grubu farelere çeşme suyu ile birlikte aseton emdirilmiş yem verilmiştir. Tetrametrin ve aseton grupları için önceden hazırlanan yemler soğuk ve karanlık bir odada muhafaza edilmiş; çözücü olarak kullanılan asetonun buharlaşması sağlanmıştır.

Çalışma sonunda, fareler dietil eter ile anestezi altına alınmış ve kalplerinden 0.5-1.0 ml arasında kan alınmıştır. Alınan kan örnekleri; Durham tüplerine konmuş, $20-25^\circ\text{C}$ 'de, 45 dakika pıhtılaşmaya bırakıldıktan sonra, soğutmalı santrifüjde ($+4^\circ\text{C}$), 7000-75000 rpm'de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen kan örneklerinden elde edilen yaklaşık 20-30 μl 'lik serum, elektroforez işlemine kadar -20°C 'lik soğutucuda saklanmıştır.

Serum örneklerinin analizi için, Kohn tarafından geliştirilen "Selüloz Asetat Elektroforez Yöntemi" kullanılmıştır (5).

Serum proteinlerine göre; dozları, cinsiyetleri ve hem doz hem de cinsiyet faktörlerinin etkisi altındaki grupları karşılaştırmak amacıyla, "Tek ve İki Yönlü Varyans Analizi" uygulanmıştır. Kontrol, aseton ve deney grupları arasında fark saptandığı zaman, farklı olan grup veya grupları saptamak amacıyla "Duncan Testi" kullanılmıştır. Önem derecesi bütün testler için $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir (13).

BULGULAR

13 haftalık çalışma sonunda, selüloz asetat elektroforez yöntemi ile saptanan serum protein miktarları, Tablo 1'de gösterilmiştir. Buna göre kontrol grubu, aseton grubu ve tetrametrinin uygulandığı T1

ve T2 gruplarında serumdaki albumin, α -globulin, β -globulin ve γ -globulin düzeyi bakımından dişi ve erkek bireyler arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu nedenle gruplar arası yapılan karşılaştırmalarda cinsiyet farkı göz önüne alınmamıştır. Gruplar arasındaki değerlendirme sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler Tablo 2'deki sonuçlara göre yapılmıştır.

Aseton grubu: Bu gruba ait farelerin serum protein sonuçları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli bir farkın olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Tablo 2).

Tetrametrin grubu: T1 ve T2 grubu serum protein sonuçları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında albumin, α -globulin ve β -globulin miktarları bakımından farkın önemsiz ($p>0.05$), buna karşın γ -globulin miktarında meydana gelen azalmanın istatistiksel açıdan önemli ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur (Tablo 2).

T1 ve T2 grubu serum protein sonuçları kendi aralarında karşılaştırıldığında, albumin, α -globulin ve β -globulin miktarları bakımından farkın önemsiz ($p>0.05$), T2 grubundaki γ -globulin miktarındaki azalmanın, T1 grubuna göre istatistiksel açıdan önemli ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur (Tablo 2).

TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonuçları, tetrametrinin T1 ve T2 gruplarının albino farelerin serum albumin, α -globulin, β -globulin ve γ -globulin miktarlarında bir takım değişiklikler meydana getirdiğini göstermiştir. Bu değişikliklerden sadece, γ -globulin miktarında meydana gelen azalmanın istatistiksel açıdan önemli olduğu, diğer değişikliklerin ise istatistiksel açıdan önemsiz olduğu bulunmuştur.

Yapılan literatür araştırmalarında, tetrametrinin albino farelerde, doğrudan serum proteinleri

üzerine etkileriyle ilgili, herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bundan dolayı çalışma sonuçları, başka insektisit grupları ve diğer sentetik piretroid grubu insektisitlerle yapılan benzer çalışmalarla karşılaştırılmıştır.

Wassermann ve arkadaşlarının klorluhidrokarbonlu insektisitlerden dieldrin ve gama BHC ile yaptıkları çalışma, bulgularımızı destekler niteliktedir. Bu araştırmacılar erkek tavşanlara *Salmonella typhi* enjekte edildikten sonra, serum γ -globulin miktarının arttığını, hayvanlara dieldrin ve gama BHC uygulamasından sonra ise γ -globulin miktarında azalma olduğunu tespit etmişlerdir (6). Benzer bir çalışma Street ve Sharma tarafından DDT ve Arachlor 1254 ile yapılmış, bu ilaçların subletal dozlarıyla (0.184, 0.92, 2.10 ve 6.54 mg/kg/gün), dört hafta boyunca beslenen tavşanlarda, γ -globulin miktarının azaldığı tespit edilmiştir (7). Klimova, heptaklor uygulanan sıçanlarda γ -globulin miktarında azalma olduğunu belirtmiştir (8). Sunulan bu çalışmada da yukarıdaki çalışmalara benzer olarak, tetrametrinin T1 ve T2 gruplarının her ikisinde de, γ -globulin miktarında azalma olduğu saptanmıştır.

Birçok araştırmacının, pestisitlerin deney hayvanlarında bağışıklık sistemi üzerine etkileri ile ilgili çalışmalarında elde ettikleri bulgular, buradaki sonuçlarla paralellik göstermektedir. Wassermann ve arkadaşları'nın yaptıkları çalışmada, *Salmonella* ve koyun kırmızı kan hücrelerine karşı bağışıklanmış tavşanlar, 38 gün süresince p,p-DDT ile beslenmiş, bu süre sonunda tavşanlarda immün cevabın yavaşladığı; sadece *Salmonella* aşılınmış tavşanlarla, p,p-DDT ve *Salmonella*'ya maruz kalmış tavşanlar karşılaştırıldığında, p,p-DDT ve *Salmonella* grubunda, toplam serum γ -globulin miktarının önemli derecede azaldığı saptanmıştır (9). Sentetik piretroidlerden sipermetrinin (cypermethrin) tavşan bağışıklık sistemine etkileri ile ilgili çalışmada, Desi ve arkadaşları, bu ilacın doza bağlı olarak serum antikor

Tablo 1. Cinsiyetlere göre serum protein değerleri (mg/kg)

	SERUM PROTEİNLERİ							
	Dişi				ERKEK			
	Albumin	α -globulin	β -globulin	γ -globulin	Albumin	α -globulin	β -globulin	γ -globulin
Kontrol (n=3)	58.200 \pm 0.500	16.200 \pm 0.264	14.133 \pm 0.288	11.400 \pm 0.608	58.267 \pm 1.604	15.833 \pm 1.040	14.100 \pm 1.000	11.800 \pm 0.435
Aseton (n=3)	55.367 \pm 1.700	17.900 \pm 2.137	15.633 \pm 1.463	11.100 \pm 0.200	56.667 \pm 6.123	17.433 \pm 2.150	14.333 \pm 1.703	10.567 \pm 0.723
T1 (n=3)	58.200 \pm 3.815	17.333 \pm 2.307	15.000 \pm 2.165	9.467 \pm 0.756	57.933 \pm 3.590	17.100 \pm 4.992	16.200 \pm 1.571	8.767 \pm 0.288
T2 (n=3)	61.333 \pm 9.592	17.333 \pm 9.757	13.933 \pm 0.610	7.433 \pm 0.832	61.867 \pm 5.687	16.933 \pm 1.761	14.400 \pm 3.100	6.800 \pm 1.915

Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir (p>0.05).

n= Hayvan sayısı

Tablo 2. Kontrol ve uygulama gruplarındaki farelere ait serum protein değerleri (mg/kg)

GRUPLAR	SERUM PROTEİNLERİ			
	Albumin	α -globulin	β -globulin	γ -globulin
Kontrol (n=6)	58.233 \pm 1.063	16.017 \pm 0.708	14.117 \pm 0.998	11.600 \pm 0.521 ^a
Aseton (n=6)	56.017 \pm 2.236	17.667 \pm 1.934	14.983 \pm 1.589	10.833 \pm 1.578 ^a
T1 (n=6)	58.067 \pm 3.317	17.217 \pm 3.481	15.600 \pm 1.815	9.117 \pm 0.6409 ^b
T2 (n=6)	61.600 \pm 7.058	17.133 \pm 6.274	14.167 \pm 2.014	7.117 \pm 1.365 ^c

Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

a,b,c Aynı sütündeki farklı harfler arasında ortalama fark p<0.05 düzeyinde anlamlıdır.

n= Hayvan sayısı

miktarında azalmaya neden olduğunu bulmuşlardır (10). Tulinska ve arkadaşları, super sipermetrinin subakut dozlarına (12.5, 8.75 ve 4.38 mg/kg/gün) maruz bırakılan sıçanlarda, ilacın düşük dozlarının bağışıklık sistemi üzerine hiçbir olumsuz etkisinin olmamasına karşın, yüksek dozlarda önemli olumsuz etkilerinin olduğunu saptamışlardır (11).

Bilgili ve arkadaşları, bir sentetik piretroid türeviden olan deltametrinin albino farelerde humoral bağışıklık ve bazı kan parametreleri üzerine etkileri ile ilgili çalışmalarında, 30 gün süre ile verilen deltametrinin, bağışıklık sistemini baskıladığını, fakat lökosit dışında kan parametrelerini etkilemediğini belirlemişlerdir (12). Bilgili ve arkadaşları'nın yaptıkları bir diğer çalışmada, belirli süre (28 gün) ve dozlarda verilen organik fosforlu insektisit klorprifos (10, 20, 40 ve 80 mg/kg.ca/gün) ve diklorvosun (30, 60 mg/kg.ca/gün) albino farelerde humoral bağışıklık üzerine etkisi araştırılmış ve deney sonunda içme suyu ile birinci dönemde, 80 mg/kg.ca/gün klorprifos, ikinci dönemde 40 ve 80 mg/kg.ca/gün klorprifos ile 60 mg/kg.ca/gün diklorvos verilen grupların humoral bağışıklık sisteminde anlamlı bir baskılanma tespit edilmiştir (14).

Das ve Mukherjee, sipermetrinin iki sub-letal konsantrasyonuna (0.014 ve 0.003 ppm), 15, 30 ve 45 gün süresince maruz bırakılan büyük hint sazanlarında (*Labeo rohita*), her iki konsantrasyonda da 30 ve 45 gün sonunda toplam serum protein düzeyinde azalma olduğunu saptamışlardır (15).

Al Sahhaf, 12 gün süresince organik fosforlu insektisitlerden sumithiona (fenitrothion) maruz

bıraktığı (60 mg/kg/gün) albino farelerde, toplam serum protein miktarında düşüş olduğunu belirtmektedir (16).

Devens ve arkadaşları, pestisitlere maruz kalan canlılarda herhangi bir zehirlenme belirtisi görülmesi dahi, bağışıklık sisteminin baskılanabileceğini, bunun da viral, bakteriyel ve diğer bulaşıcı hastalıklara yakalanma tehlikesini arttırabileceğini, ayrıca bağışıklık sisteminin baskılanmasının, tümör oluşumunu etkilemesi bakımından önemli olduğunu ileri sürmektedir (17).

Thomas ve House, pestisitlerin toksik etkileri bakımından bağışıklık sisteminin geçerliliği ispat edilmiş önemli bir hedef organ olduğunu ileri sürmektedirler. Ayrıca hayvanlarla yapılan çalışmalarında, nispeten kısa süreli de olsa pestisitlere maruz kalmanın, bağışıklık sisteminin fonksiyonunu bozduğunu, dolayısıyla bu hayvanlarda tümör oluşumu ve enfeksiyona duyarlılığı arttırdığını belirtmektedirler. Buna karşın, aşırı duyarlılık reaksiyonları hariç, pestisitlere maruz kalmayla, bağışıklık sisteminde meydana gelen fonksiyon bozukluğuna bağlı olumsuz sağlık etkilerinin, insanlarla olan bağlantısını gösteren kanıtların yetersiz olduğunu bildirmektedirler (18).

Bu çalışma sonunda, çoğunlukla ev zararlılarının kontrolü için aerosol ve spiral sinekkovar şeklinde evlerde yoğun olarak kullanılmakta olan tetrametrinin, farelerde humoral bağışıklıktan sorumlu serum γ -globulin miktarının azalmasına neden olmasının, doza bağlı olarak bağışıklık sistemini baskılayabilmesi bakımından önemli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Mazmancı B, Tamer L, Aşkın A. Sıçanlarda lambda-cyhalothrin'in akut toksik etkisinin araştırılması. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2008; 1(1): 15-9.
2. International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 98 Tetrametrin, World Health Organization, Geneva, 1990.
3. Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 15. Baskı. Ankara: Meteksan; 2004; 1157.
4. Gelman Instrument Company, Gelman Serum Protein Electrophoresis System. Technical Bull, 1975; 20: 1-19.
5. Kohn J. Cellulose acetate electrophoresis and immunodiffusion techniques, Smith I, chromatographic and electrophoretic techniques, Vol II, International Publishers, NY, 1960; 56-78.
6. Wassermann M, Wassermann D, Kedar E, Djavaheerian M. Effect of dieldrin and gamma BHC on serum proteins. Bull Environ Contam Toxicol, 1972; 8 (3): 177-8.
7. Street JC, Sharma RP. Alteration of induced cellular and humoral immune responses by pesticides and chemicals of environmental concern: Quantitative studies of immunosuppression by DDT, Aroclor 1254, Carbaryl, Carbofuran, and Methyl Parathion. Toxicol Appl Pharmacol, 1975; 32: 587-602.
8. Klimova LK. SH Group content in blood serum and liver of rats poisoned with heptaclor. Gig Tr Prof Zabol 1970; 14 (3): 56-7.
9. Wassermann M, Wassermann D, Kedar E, Djavaheerian M. Immunological and detoxication interaction in p,p-DDT fed rabbits. Bull Environ Contam Toxicol, 1971; 6 (5): 426-35.
10. Desi I, Dobronyi I, Varga L. Immuno-, neuro-, and general toxicologic studies on a synthetic pyrethroid: Cypermethrin. Ecotoxicol Environ Safety 1986; 12: 220-32.
11. Tulinska J, Kubova J, Janota S, Nyulassy S. Investigation of immunotoxicity of supercypermethrin forte in the wistar rat. Hum Exp Toxicol 1995; 14: 399-403.
12. Bilgili A, Yarsan E, Eraslan G, Eşsiz D, Kutlu İ, Saltaş H. Deltametrinin farelerde humoral bağışıklık ve bazı kan parametreleri üzerine etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 2002; 16(1): 37-40.
13. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik: 8. Baskı. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi; 1998; 269.
14. Bilgili A, Eraslan G, Eşsiz D, Kutlu İ, Saltaş H. Farelerde klorprifos ve diklorvosun humoral immün yanıt üzerine etkisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 2004; 18(1):1-4.
15. Das BK, Mukherjee SC. Toxicity of cypermethrin in Labeo rohita fingerlings: Biochemical, enzymatic and haematological consequences. Comp Biochem Physiol Part C. 2003; 134: 109-21.
16. Al Sahaf ZY. Toxicity of sumithion in albino rats: Hematological and biochemical studies. J Appl Sci 2006; 6 (14): 2959-62.
17. Devens, BH, Grayson MH, Imamura T, Rodgers KE. O,O,S- trimethyl phosphorothioate effects on immunocompetence. Pestic Biochem Physiol 1985; 24: 251-59.
18. Thomas PT, House RV. Pesticide-induced modulation of the immune system: Ragsdale NN, Menzer RE, eds. Carcinogenicity and Pesticides: University of Maryland: 1989; Chapter 6: 94-106.

BİR LİSEDE ÖĞRENİM GÖREN YABANCI UYUKLU ERKEK ÖĞRENCİLERDE SELOFAN-BANT YÖNTEMİ İLE *DEMODEX SP.* ARAŞTIRILMASI

Investigation of *Demodex sp.* Using Cellophane Tape Method in Foreign Male Students in a High School

Muhittin KAYA¹, Berna HAMAMCI¹, Ülfet ÇETİNKAYA¹, Ozan YAMAN¹, Süleyman YAZAR¹

¹Erciyes Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı
KAYSERİ

Geliş Tarihi: 06.05.2010
Kabul Tarihi: 06.06.2010

İletişim:
Süleyman YAZAR
Erciyes Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Parazitoloji Anabilim Dalı,
KAYSERİ
Tel : +90-352 437 49 10-11/2301
E-posta : syazar@erciyes.edu.tr

ÖZET

Amaç: *Demodex sp.*, insanların özellikle yüz bölgesinde yaygın olarak bulunan, erişkini solucana veya puroya benzeyen patojenik mekanizması tam olarak bilinmeyen insanın kalıcı ektoparazitidir. Çalışmamız bir lisede öğrenim gören yabancı uyruklu erkek öğrencilerde *Demodex sp.* yaygınlığını araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Yöntem: Çalışma, Kayseri Germirli Anadolu İmam-Hatip Lisesi'nde öğrenim gören yabancı uyruklu erkek öğrenciler üzerinde yürütülmüştür. Çalışma öncesi parazit ve yöntem hakkında her bir öğrenciye bilgi verilmiştir. Bilgilendirme sonrası, öğrencilerin yüzlerinden; özellikle burun kökü, çene altı ve alın bölgesinden selofan-bant yöntemi ile alınan örneklerin mikroskopik incelemesi yapılmıştır. Verilerin istatistiksel analizi için Pearson ki-kare testi kullanılmış ve $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya alınan öğrencilerden Arnavutluk, Gana, Gürcistan, Kamerun ve Kırgızistan'dan gelenlerde parazit saptanmış diğerlerinde ise saptanamamıştır. Yaşları 15 ile 21 (yaş ortalaması: 17.52 ± 1.36) arasında değişen, 347 erkek öğrenci incelenmiştir ve dokuz (%2.7)'unda *Demodex sp.* belirlenmiştir. 19 yaş ve üzeri öğrencilerde parazit görülme oranı 18 yaş altı öğrencilere göre daha yüksek bulunmakla birlikte, yaş ile parazit görülmesi arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$).

Sonuç: İnsandan insana yakın temas ile bulaşan bu parazit sağlıklı bireylerde de bulunabilmektedir.

Anahtar Sözcükler: *Demodex sp.*, yabancı uyruklu öğrenciler, Kayseri.

ABSTRACT

Objective: *Demodex sp.*, permanent ectoparasite of human, is especially found in the face of people and the adult mites are like worm and cheroot shape. Pathogenic mechanism is not known exactly. Our study was carried out in order to investigate the frequency of *Demodex sp.* among foreign male students in a high school.

Method: The study was conducted Germirli high school in Kayseri among foreign male students. Before the study, information about parasite and study methods were given to each student. After informed consent, cellophane-tape preparations were taken from student's face, especially from the base of the nose, underside of the jaw and the sides of the forehead were examined microscopically. Pearson's chi-square test was used for statistically analyze and $p < 0.05$ value was considered significant.

Results: *Demodex* sp. was found in the student's from Albanian, Ghana, Georgia, Cameroun and Kirghizistan, not found in students from other countries. 347 male students, ages between 15 and 21 (average: 17.52±1.36), were investigated and *Demodex* sp. was found in 9 (2.7%). Incidence of *Demodex* sp. was higher in the students older than 19 years than in the students under the age of 18. However, correlation between the ages and parasite incidence was not statistically significant ($p>0.05$).

Conclusion: This parasite transmitted by close contact from person to person can be found in healthy individuals.

Key Words: *Demodex* sp., foreign students, Kayseri

GİRİŞ

Demodex sp. tüm dünyada insanların özellikle yüz bölgesinde yaygın olarak bulunan, patojenik mekanizması tam olarak bilinmeyen bir akaraktır. Erişkini solucana veya puroya benzeyen bu akar, insanın kalıcı ektoparazitidir. Bu cinsin *Demodex folliculorum* ve *Demodex brevis* olma üzere iki türü insan vücudunda yerleşmektedir. Bu akarların insandan insana yakın temas ile bulaştığı bildirilmiştir (1-4).

Patojenik rolü hala tartışmalı olmakla birlikte rosecea, akne vulgaris, perioral dermatit, seboreik dermatit ve blefarit patogenezinde önemli rolleri oldukları bildirilmiştir. Bununla birlikte birçok yazar tarafından kısmen non-patojen olarak değerlendirilen bu akarların deride meydana gelen hastalıklara zemin hazırlama açısından potansiyel bir risk olabileceği kanısı yaygındır (1,3-5). İmmun sistemin baskılandığı, immunsupressif ilaç kullanan hastalarda ve immünolojik reaktivitenin düşük olduğu orta yaşlı ve yaşlı kişilerde enfeksiyonun ağır olabileceği bildirilmiştir (6).

İnsan vücudunda yanak, çene, alın, boyun, dış kulak yolu, sırt, kalça, göğüs, meme ucu ve genital bölgelerdeki kıl foliküllerinde, kıl diplerinde ve derinin yağ bezlerinde yaşadığı bildirilmiştir. Tamda selofan-bant, deri kazıntısı, punch biyopsisi ve standart yüzeyel deri biyopsisi (SYDB) gibi yöntemler kullanılmaktadır (1,4,6).

Çalışmamız, farklı ülkelerden gelip Kayseri'de bir lisede öğrenim gören öğrencilerde *Demodex* sp.

yaygınlığını araştırmak ve elde edilen sonuçları ülkemizde yapılan çalışmalarla karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, sadece yabancı uyruklu erkek öğrencilerin öğrenim gördüğü Kayseri Germirli Anadolu İmam-Hatip Lisesi öğrencileri üzerinde yürütülmüştür. Çalışmaya başlamadan önce her öğrenciye parazit ve yöntem hakkında bilgi verilmiş ve öğrencilerin yüzlerinden, selofan-bant yöntemi ile örnek alınmıştır.

Selofan-bant yöntemi için daha iyi yapışan ve daha iyi sonuç alındığını saptadığımız şeffaf koli bandı kullanılmıştır. Koli bandı yaklaşık 1x5 cm ebadında kesilerek kişinin yüz derisine özellikle burun kökü ve alın bölgesine yapıştırılıp çıkarıldıktan sonra kişinin kimlik bilgilerinin yazılı olduğu temiz bir lam üzerine yapıştırılmıştır. Toplanan selofan-bant preparatları, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı'nda ışık mikroskopunda x100 ve x400 büyütmede incelenmiştir.

Verilerin istatistiksel analizi için Pearson ki-kare testi kullanılmış ve $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

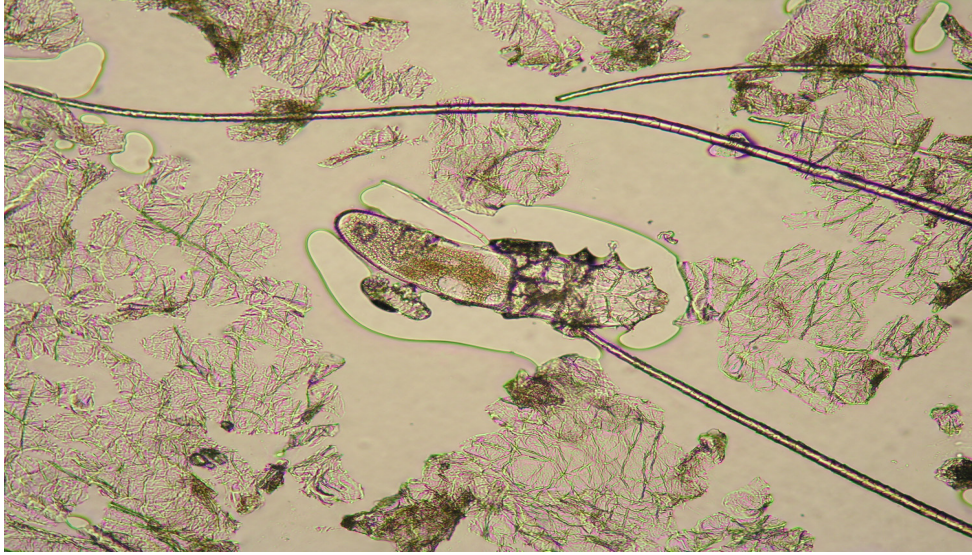
BULGULAR

Çalışmamıza, yaşları 15 ile 21 (yaş ortalaması: 17,5±1,3) arasında değişen, 347 erkek öğrenci katılmıştır. Öğrencilerin yüzlerinden; özellikle burun

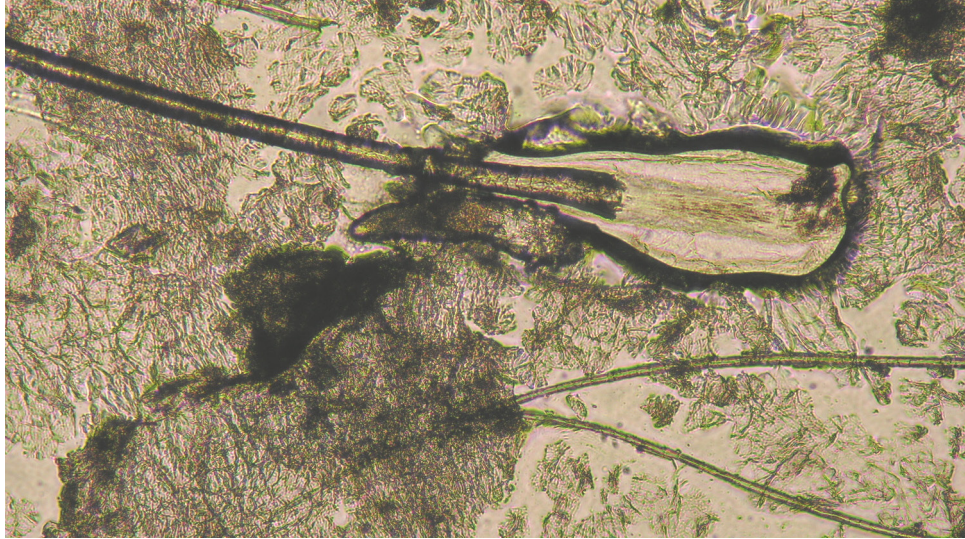
kökü, çene altı ve alın bölgesinden alınan örneklerin mikroskopik incelemesi yapılmış ve dokuz (%2,7)'unda *Demodex* sp. saptanmıştır (Şekil 1,2).

Çalışmaya alınan öğrenciler içerisinde; Arnavutluk, Gana, Gürcistan, Kamerun ve Kırgızistan'dan gelen öğrencilerde parazit saptanmış diğerlerinde ise saptanamamıştır. *Demodex* sp. görülme sıklığının öğrencilerin uyruklarına göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki öğrenciler 18 yaş üstü ve altı olmak üzere iki gruba ayrılarak yaşa göre parazit varlığı da araştırılmış ve elde edilen görülme oranları Tablo 2'de gösterilmiştir. 19 yaş ve üzeri öğrencilerde parazit görülme oranı daha yüksek bulunmakla birlikte, yaş ile parazit görülmesi arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($X^2=0,550$; $p=0,458$).



Şekil 1. Selofan-bant preparatında *Demodex* sp.(x 100 büyütme)



Şekil 2. Selofan-bant preparatında *Demodex* sp.(x 40 büyütme)

Tablo1. Uyrıklarına göre öğrencilerde *Demodex* sp. görülme sıklığı

Ülke	Toplam	<i>Demodex</i> sp. (+)	
		n	%
Afganistan	34	-	-
Arnavutluk	30	1	3,3
Azerbaycan	16	-	-
Bosna-Hersek	18	-	-
Bulgaristan	5	-	-
Burkina Faso	1	-	-
Endonezya	10	-	-
Gana	8	2	25
Gürcistan	60	3	5
Hindistan	5	-	-
Kamerun	2	1	50
Karadağ	1	-	-
Kazakistan	21	-	-
Kenya	7	-	-
Kırgızistan	16	1	6,25
KKTC	23	-	-
Kongo	1	-	-
Kosova	10	-	-
Madagaskar	4	-	-
Makedonya	15	1	6,6
Moğolistan	12	-	-
Nijerya	7	-	-
Pakistan	9	-	-
Raunda	5	-	-
Sırbistan	12	-	-
Tanzanya	3	-	-
Tayland	9	-	-
Uganda	3	-	-
Toplam	347	9	2,7

Tablo 2. Yaşa göre öğrencilerde *Demodex* sp. görülme sıklığı

Yaş	<i>Demodex</i> sp. görülen	
	n	%
18 yaş ve altı (n: 267)	6	2.24
19 yaş ve üstü (n: 80)	3	3.75
Toplam (n: 347)	9	2.59

$$\chi^2=0,550; \quad p=0,458$$

TARTIŞMA

Demodex enfestasyonunun bütün dünyada yaygın olduğu, ırk ve cinsiyet farkı göstermediği ancak yaşla doğru orantılı olarak arttığı belirtilmiştir (7). İlk olarak 1841 yılında Henle ve Berger tarafından bildirilmiş olup, 1982 yılında Simon tür özelliklerini tanımlamıştır (2,8). Yurdumuzdaki ilk olgu Saygı ve arkadaşları (9) tarafından perianal bölgeden selofan-bant yöntemi ile hazırlanan preparatın incelenmesi ile saptanmıştır.

Türk ve arkadaşları (10), kronik blefarit ve *D.folliculorum* ilişkisini araştırmak amacıyla 48 blefaritli, 48 sağlıklı olmak üzere 96 kişiden kirpik örnekleri almışlar ve sağlıklı bireylerin %4.16'sında *D.folliculorum* saptamışlardır. Emre ve arkadaşlarının (11) Behçet hastalığı ve *D.folliculorum* arasındaki ilişkiyi araştırmak için yaptıkları bir çalışmada kontrol grubu olarak sistemik ve oküler bir rahatsızlığı olmayan 131 kişinin yanağından SYDB yöntemi ile örnek almışlar ve kontrol grubunda %10 pozitiflik bulmuşlardır.

Özçelik ve arkadaşlarının (6), kronik böbrek yetmezliği olan ve immun sistemi baskılanmış kişilerde *D.folliculorum* görülme sıklığının araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada 47 hasta ile aktif spor yapan 38 sağlıklı kontrol grubunda yanak ve kirpiklerinden örnekler alarak incelemiştir. Çalışmaya alınan 47 hastanın altısının (% 12,76) gözkapığı kirpik folikülünde, 12'sinin (% 25,53) yüzünde *D.folliculorum* gözlenirken, kontrollerde 38 bireyin ikisinin (% 5,26) gözkapığı kirpik folikülünde, yedisinin (% 18,42) ise yüzünde *D.folliculorum* saptamışlardır. Baysal ve arkadaşlarının (12) 101 akne vulgarisli ve 50 sağlıklı bireyden selofan-bant yöntemi ile aldıkları örneklerde, akne vulgarisli hastaların %11.8'inde *D.folliculorum* saptadığı, fakat kontrol grubunda hiçbirinde *D.folliculorum* bulunmadığı bildirilmiştir. Yazar ve arkadaşları (13), 171 üniversite öğrencisi üzerinde selofan-bant yöntemiyle yaptıkları bir çalışmada % 2,9'luk pozitiflik saptarken, Ding ve

Huang (14), 613 lise öğrencisinin dış kulak yolu salgısını incelemiş ve % 11.58'lik pozitiflik saptamışlardır.

Çalışmamızda, 347 lise öğrencisinin %2,7'sinde *Demodex* sp. saptanmıştır. Kontrol ve çalışma gruplarından elde edilen benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında bu oran selofan-bant yöntemi kullanılan çalışmalara göre yüksek olmasına karşın deri biyopsisi yöntemi kullanılan çalışmalara göre düşük bulunmuştur. Yazar ve arkadaşlarının aynı yaş grubunda, aynı bölgeden, aynı yöntemi kullanarak

yaptıkları çalışmada saptadıkları yaygınlık, bu çalışmada elde edilen pozitiflikle uyumluluk gösterirken, Ding ve Huang'ın (14) elde ettiği oran bu çalışmadaki orandan oldukça düşüktür. Bu farkın, örneğin alındığı bölgenin ve yöntemin farklı oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, yabancı uyruklu öğrencilerde saptanan demodiosis oranının ülkemizde daha önce yapılan benzer çalışmalardaki sağlıklı gruplardan elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7th. Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Comp. 1992: 348.
2. Nutting WB. Hair follicle mites (Acari:Demodicidae) of man. Int J Dermatol, 1976; 15: 78-9.
3. Özçelik S. Alerji ve Dermatit Nedeni Olabilen Akarlar. Özcel MA, Daldal N edt. Parazitolojide Artropod Hastalıklar ve Vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını. 1997: 349-53.
4. Unat EK, Yücel A, Aktaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. Baskı Cerr Tıp Fak. Vakfı Yay: 1995: 206-8.
5. Akdeniz S, Bahceci M, Tuzcu AK, Harman M, Alp S, Bahceci S. Is *Demodex folliculorum* larger in diabetic patients. J Europ Acad Dermatol Venereol, 2002; 16(5): 539.
6. Özçelik S, Sümer Z, Değerli S, Özyazıcı G, Berksoy Hayta S, Akyol M, Candan F. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda *Demodex folliculorum* görülme sıklığı. Türkiye Parazitol Derg, 2007; 31 (1): 66-8.
7. Domonkos AN, Arnold HL, Odom RB. Diseases of the Skin, W.B. Saunders Comp. Philadelphia, 1982; 570-1.
8. Forton F, Seys B. Density of *Demodex folliculorum* in Rosacea: A case control study using standardized skin-surface biopsy. Br J Dermatol, 1993; 128: 650-9.
9. Saygı G, Mafuri M, Köylüoğlu Z. Biri selofan bant preparatı ile saptanan üç *Demodex folliculorum* olgusu. Türkiye Parazitol Derg, 1984; 7: 137-44.
10. Türk M, Öztürk I, Şener AG, Küçükbay S, Afşar İ, Maden A. Blefaritli hastalar ve sağlıklı bireylerin kirpik folikülünde *Demodex folliculorum* sıklığının karşılaştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 2007; 31(4): 296-7.
11. Emre S, Aycan ÖM, Atambay M, Bılak S, Daldal N, Karıncaoğlu Y. *Demodex folliculorum*'un Behçet hastalığındaki önemi nedir? Türkiye Parazitol Derg, 2009; 33(2): 158-61.
12. Baysal V, Aydemir M, Yorgancıgil B, Yıldırım M. Akne vulgaris etyopatogenezinde *Demodex folliculorum*'ların rolünün araştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 1997; 21: 265-8.
13. Yazar S, Özcan H, Çetinkaya Ü. Üniversite öğrencilerinde selofan-bant yöntemi ile *Demodex* sp. araştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 2008; 32(3): 238-40.
14. Ding Y, Huang X. Investigation of external auditory meatus secretion *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* infection in college students. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi, 2005; 19(4): 176-7.

SERÖZ VE MÜSİNÖZ OVER KANSERLERİ İLE KI-67 İLİŞKİSİ

Correlation Between Ki-67 and Serous-Mucinous Ovarian Carcinomas

Faruk ABİKE¹, Sema ZENGEROĞLU¹, Osman TEMİZKAN¹, Ahmet PAYASLI¹, Ömer Lütfi TAPISIZ¹

¹ Dr. Zekai Tahir Burak Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ANKARA

Geliş Tarihi: 06.05.2010
Kabul Tarihi: 06.06.2010

İletişim:
Faruk ABİKE
Bayındır Hastanesi,
Kadın Doğum Kliniği,
Söğütözü, ANKARA
Tel : +90 312 287 90 00
E-posta : farukabike@gmail.com

ÖZET:

Amaç: Ki-67, tümör içerisindeki proliferatif hücreleri gösterebilen bir antikordur. Ki-67 fraksiyonunun daha yüksek olduğu tümörler, daha agresif seyretme eğilimindedirler ve bu vakalarda vasküler invazyona, kötü proliferasyona ve metastaza daha sık rastlanır. Bu çalışmada kolorektal ve mesane kansinomlarında proliferasyon belirteci olarak kullanılan Ki-67'nin seröz ve müsinöz over kanserlerinde tümör proliferatif indeksi olarak kullanılabilirliği ve prognoza etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada, 1996-2000 yılları arasında, yaşları 17-82 arasında, jinekolojik onkoloji kliniğinde opere edilen, patolojik olarak seröz veya müsinöz over kansinomu tanısı alan 51 olgu değerlendirilmiştir. Patolojideki materyaller rutin doku takip işlemlerinden geçirildikten sonra hazırlanan parafin bloklardan 5 mm'lik kesitler yapılmış ve hematoksilin eozinle (HE) boyanarak değerlendirilmiştir. Operasyon sonrası alınan tümör örneklerinin rutin patolojik işlemlerden sonra streptoavidin-biotin ortamında primer antikolar ile Ki-67 immünreaktivitesi değerlendirilmiştir.

Bulgular: Patolojik olarak seröz over kansinomu tanısı alan 29 olgu ve müsinöz over kansinomu tanısı alan 22 olgu, stage, grade ve lenf nodu tutulumu açısından değerlendirilmiştir. Seröz tümörlerin % 48'i (n=14) Ki67 pozitif saptanırken, müsinöz tümörlerde % 68 (n=15) Ki 67 pozitifliği saptanmıştır. Seröz tümörlerde Ki-67 indeksi 13,05; müsinöz tümörlerde ise 22,2 olarak tespit edilmiştir (p=0,072). Tümörün histolojik tipi ile Ki-67 indeksleri arasında korelasyon saptanamamıştır. Ki-67 immünreaktivitesi ile seröz ve müsinöz over kansinomları arasında stage, grade ve lenf nodu tutulumu ilişkisi araştırılmıştır. Stage artışına paralel olarak Ki-67 reaktivitesi artarken (p<0.001); lenf nodu tutulumu, grade ve tümörün histolojik tipi ile korelasyon saptanamamıştır (p>0.05).

Sonuç: Seröz ve müsinöz kansinomların stage'i artıkça Ki-67 immünreaktivitesi ve proliferatif indekslerinin arttığı bulunmuştur. Buna karşın grade, lenf nodu tutulumu ve histolojik tümör tipi ile Ki-67 reaktivitesi arasında bağlantı saptanamamıştır. Bu bulgular eşliğinde seröz ve müsinöz over kanserlerinde proliferasyon markeri olarak Ki-67 ekspresyonu kullanımının duyarlı bir yöntem olmadığı sonucuna varılmıştır. Seröz ve müsinöz over kanserlerinde proliferasyon markeri olarak Ki-67 kullanımı uygun görülmemekle beraber daha geniş sayıda randomize çalışmaya gerek bulunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Seröz over kansinomu, müsinöz over kansinomu, Ki-67, proliferasyon indeksi

ABSTRACT

Objective: Ki 67 is a antibody which could be showed proliferation in the cells. High Ki 67 expression of some tumors have been more aggressive clinical progression, poor prognosis, more vascular invasion and more metastasis than Ki 67 negative tumors. In this study, it was aimed to determine the possibility of using Ki-67, which shows proliferation in serous and mucinous ovarian tumors, as a tumor proliferation index and effect on prognosis.

Method: The correlation between Ki-67 and primary antibodies was examined in 51 cases, ages 17-82, which were in the period 1996-2000 pathologically diagnosed, by the routine processes of the pathological preparates in streptoavidin-biotin environment, to have serous and mucinous ovarian carcinomas. Pathologic determination was made Hematoxylene Eosine painting after the routine preparing.

Results: It were diagnosed as serous(n=29) and musinous(n=22) which was determined according to stage, grade and lymph node involment. Ki 67 seropositivity was established in 48 % (n=14) of serous and 68 % (n=15) of musinous tumors. Ki 67 indexes were found 13,05 in serous and 22,2 in musinous ovarian tumors(p=0,072). There was no correlation between tumour histology and Ki 67 indexes. Correlations between immunoreactivity of Ki-67 and the stage, grade and lymph node metastasis in serous and mucinous ovarian carcinoma were determined. Ki-67 indexes were increased as tumor stage was increased (p<0.001). However, no correlation was found between Ki-67 immunoreactivity, tumor grade and lymph node involvement (p>0.05).

Conclusion: It was determined that as the stage of the serous and mucinous ovarian carcinomas are increased, Ki-67 immunoreactivity and proliferation index are also increased. On the other hand, grade, lymph node involvement and histological tumor type were not correlated with Ki-67 reactivity. As a result, Ki-67 can not be used as a sensitive tumor proliferation index in serous and mucinous ovarian carcinomas. It isn't found suitable that Ki 67 as proliferation marker in ovarian serous and musinous tumors but It needs to more widely randomized study about this issue.

Key Words: Serous ovarian carcinomas, mucinous ovarian carcinomas, Ki-67, proliferation index

GİRİŞ

Over kanserlerinin yaklaşık % 90'ı çöломik epitelden ve mezotelden gelişmektedir. Tüm kanser türlerinden kadın ölüm nedenleri arasında beşinci sırada, jinekolojik kanserler arasında birinci sırada bulunan over kanserine her yıl yaklaşık 100,000 kadından 15 ila 25' i yakalanmaktadır (1-3).

Neoplazik dönüşüm hücreler genetik olarak onkogenlere yatkınlık ve/veya onkojenik ajanlara maruz kalması sonucu oluşmaktadır (4).

Epitelyal over kanserlerinin %75' i histolojik olarak seröz tiptedir. Daha az görülenler müsinöz (% 20), endometrioid, şeffaf hücreli, brenner ve andiferansiye karsinomlardır. Önemli bir grup ise düşük malignite potansiyeli olan border line tümörlerdir. En sık 30-50 yaş kadınlarda görülen border line görülen tümörler çok uzun süre gizli kalma eğiliminde olup ve özellikle premenapozal dönemde olan kadınlarda

görülürler (5-8). İnvazif kanserlere ise sıklıkla 50-70 yaş arasındaki kadınlarda rastlanır (8-10).

1983 yılında ilk kez Gerdes ve arkadaşları Almanya'da G0 hücre bölünme fazı hariç tüm hücre sikluslarında nükleusta mevcut olan bir nükleer antijene karşı monoklonal Ki-67 antikoru geliştirmişlerdir (10). Ki-67, tümör içerisindeki proliferasyon hücreleri gösterebilen bir antikordur. Ki-67 fraksiyonunun daha yüksek olduğu tümörler, daha agresif seyretme eğilimindedirler ve bu vakalarda vasküler invazyona, kötü proliferasyona ve metastaza daha sık rastlanır (11).

Bu çalışmamızda proliferasyon marker'i olan Ki-67'nin gastrointestinal, meme, hematolojik kanserler de proliferasyonu başarılı şekilde göstermesi nedeniyle seröz ve müsinöz over kanserlerinde stage, grade, tümör tipi ve lenf nodu tutulumu ile K-67'nin ilişkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastanemizde Ocak 1996 ile Ocak 2000 tarihleri arasında seröz ve müsinöz over tümörü tanısı alan, yaşları 17-82 arasında değişen 51 olgunun parafin blok ve lamaları değerlendirmeye alınmış ve olguların 29 tanesinde seröz karsinom, 22 tanesinde ise müsinöz karsinom belirlenmiştir.

Olgulardan alınan ameliyat sonrası materyaller %10'luk formalinle fikse edilerek patoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Patoloji laboratuvarındaki materyaller rutin doku takip işlemlerinden geçirildikten sonra parafin bloklar hazırlanmış ve bu bloklardan 5mm'lik kesitler yapılarak hematoksilen eozinle (HE) boyanarak değerlendirme yapılmıştır.

Tümörler klinik özellikleri ile bağlantılı olarak grade, stage, metastaz ve tümör tipi açısından değerlendirilerek, DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) ve FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) kriterlerine göre sınıflandırılmıştır (12).

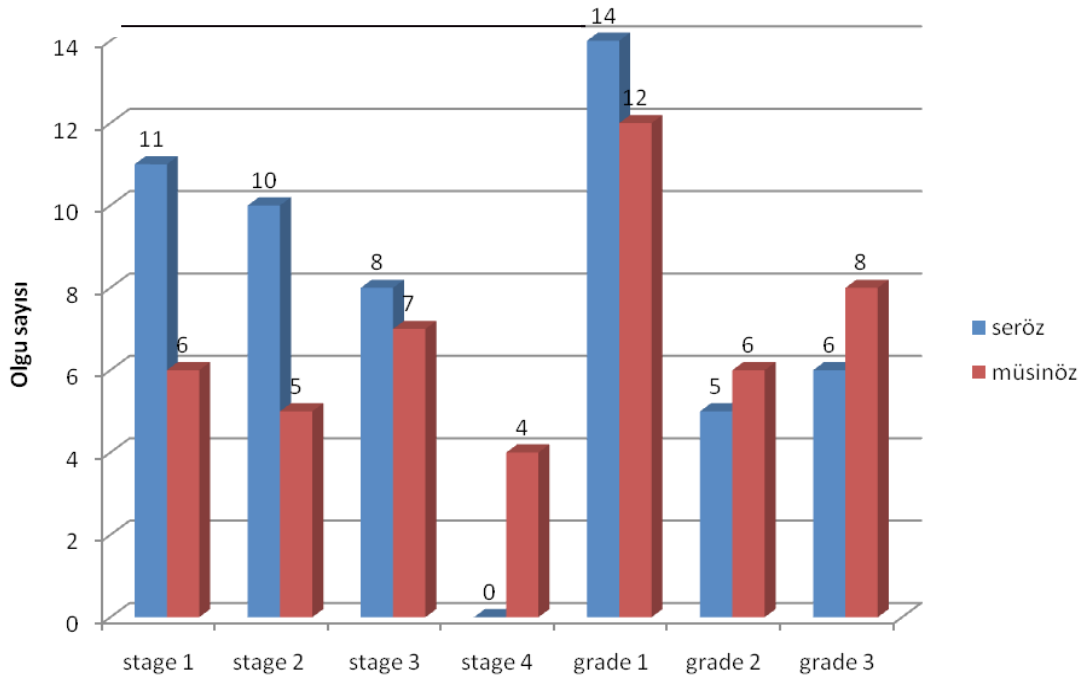
Her olgu için bir negatif kontrol kullanılmış, pozitif kontrol için ise daha önce boyanma özelliği saptanmış olan meme karsinomu, tonsil ve endometrial karsinom olgularından alınan materyaller kullanılmıştır.

Işık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede Ki-67 için 100 tümör hücresi sayılmış (10'luk büyütme alanında) ve nükleer boyanma gösteren 0-5 tümör hücresi için negatif (-), 5-15 tümör hücresi için (+), 15-25 tümör hücresi için (++), 25 ve üzerindeki tümör hücresi için (+++) olarak değerlendirme yapılmıştır.

Elde edilen veriler istatistiksel olarak "Ki-Kare testi", "Mann-Whitney U testi", "Fisher's Exact testi", "Kruskal-Wallis testi" ve korelasyon testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

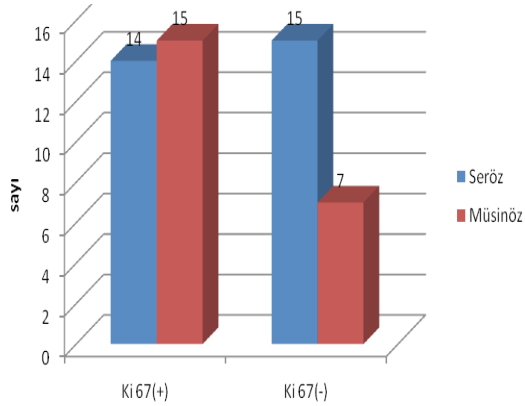
BULGULAR

Patolojik olarak seröz over karsinomu tanısı alan 29 olgu ve müsinöz over karsinomu tanısı alan 22 olgu, stage, grade ve lenf nodu tutulumu açısından değerlendirilmiştir. Olguların stage ve grade dağılımları Şekil 1'de verilmiştir.



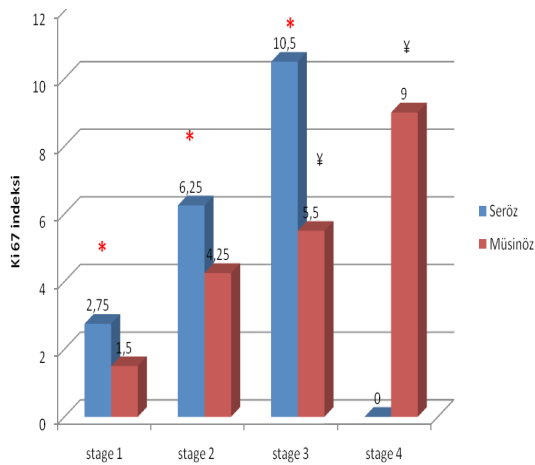
Şekil 1. Olguların stage ve grade dağılımı

Seröz tümörlerin % 48'i (n=14) Ki67 pozitif saptanırken, müsinöz tümörlerde % 68 (n=15) Ki 67 pozitifliği saptanmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Olguların Ki67 pozitifliği

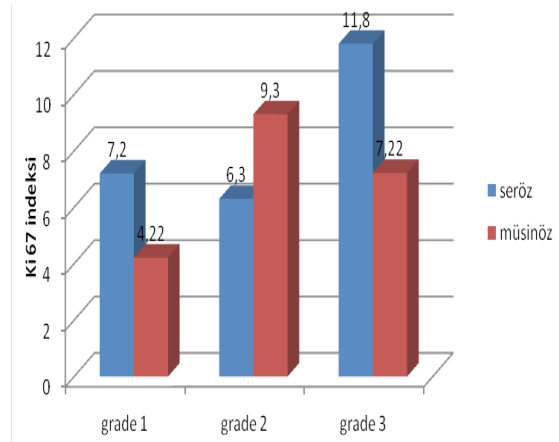
Seröz ve müsinöz over tümörlerinde, stage arttıkça paralel olarak Ki-67 indekslerinin arttığı belirlenmiştir. Bu korelasyon istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (p=0.0008) (Şekil 3).



* p<0,05 ¥ p<0,05

Şekil 3. Stage'lere göre Ki 67 indeksleri

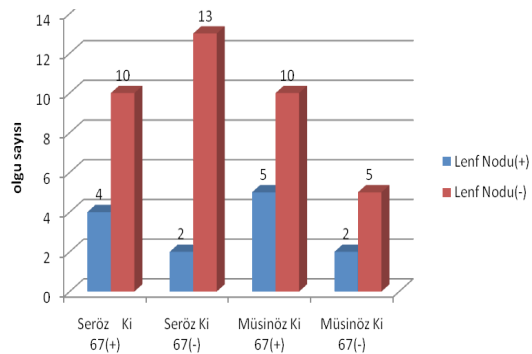
Seröz ve müsinöz over tümörlerinde, grade ile Ki-67 indeksleri arasında anlamlı ilişki saptanamamıştır (p=0,068) (Şekil 4).



Şekil 4. Grade'lere göre Ki 67 indeksleri

Seröz tümörlerde Ki-67 indeksi 13,05; müsinöz tümörlerde ise 22,2 olarak tespit edilmiştir (p=0,072). Tümörün histolojik tipi ile Ki-67 indeksleri arasında korelasyon bulunamamıştır.

Lenf nodu tutulumu ile Ki-67 pozitifliği değerlendirildiğinde, seröz ve müsinöz over tümörlerinde lenf nodu tutulumu ile Ki-67 pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p=0,066) (Şekil 5).



Şekil 5. Lenf nodu tutulumu ve Ki 67 pozitifliği

TARTIŞMA

Over kanserlerinin tanısı günümüzde kadın sağlığı açısından önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu olguların yaklaşık 2/3'ü ileri evrelerde tanı alabilmekte ve bunun neticesi olarak da tedavi kısıtlanmakta, mortalite oranları yükselmektedir. (1-3). Epitelyal over karsinomları tüm over kanserlerinin yaklaşık % 80'ini oluşturmakta olup kanserlerinin % 75'i seröz ve % 20'si müsinöz histolojidedir (9).

Over kanserindeki semptomların non spesifik gastrointestinal semptomlar olması nedeniyle ancak ileri evrelerde tanı konabilmektedir (13-16). Ki-67 non-histon nükleer ve ileri derecede bazik bir proteindir. 10q25'de lokalize Ki-67 geninin fonksiyonu kesin olarak bilinmemektedir. Antijenin % 90'ı nükleolde, % 10'u ise nükleoplazmada bulunur. Ki-67 proteini içeriğinde fazla miktarlarda glutamik asit, prolin, serin, trionin bulunur ve bu özelliği nedeniyle çok hızlı katabolize olur. Yarı ömrü çok kısa olup, yaklaşık bir saattir. DNA içeriğine bakılmaksızın herhangi bir siklus fazında bulunan tüm hücreler Go fazına girebildiği için Ki-67 fraksiyon tayinlerinin bir tümörün proliferasyon hücre komponenti ile ilgili anlamlı bilgiler verebilmektedir (11).

Yarı ömrü çok kısa (yaklaşık bir saat) ve non histon nükleer bir protein olan Ki-67 tümör içerisindeki proliferasyon hücreleri gösterebilen bir antikordur. DNA içeriğine bakılmaksızın herhangi bir siklus fazında bulunan tüm hücreler Go fazına girebildiği için Ki-67 fraksiyon tayinleri bir tümörün proliferasyon hücre komponenti ile ilgili anlamlı bilgiler verebilmektedir. Ki-67 fraksiyonunun daha yüksek olduğu tümörler daha agresif seyretme eğilimindedir. Yüksek Ki-67 saptanan

olgularda vasküler invazyon, daha kötü proliferasyon ve daha sık metastazlar görülmüştür (11).

Sengupta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada epitelyal over karsinomlarında Ki-67 ekspresyonu ile FIGO stage ve yaşam süresi ile ilişkili olduğu saptanmış ve Ki-67 ekspresyonu prognostik bir faktör olarak bildirilmiştir. Buna karşın grade ve tümörün tipi ile ilişki saptanamamıştır (17). İnvazif vulvar karsinomlu olgularda yapılan başka bir çalışmada ise Ki-67 ekspresyonunun kötü prognoz ve yaşam süresinde azalma ile ilişkili olduğu saptanmıştır (18,19). Seröz ve müsinöz over karsinomlarında Ki-67 indeksleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu kanserle arasında karsinomlarda lenf nodu tutulumu ile Ki-67 immünoreaktivitesi arasında korelasyon saptanamamıştır. Ki-67 indeksinin spesifik olarak seröz veya müsinöz kanserlerle ilişkisi bulunamamıştır.

Seröz ve müsinöz over kanserlerinde stage arttıkça Ki-67 proliferatif indekslerinin anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p<0.001$). Ancak histolojik grade ile Ki-67 reaktivitesi arasında korelasyon saptanamamıştır ($p>0.05$). Salbesen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada endometrial karsinoma da FIGO stage, histolojik tip, histolojik grade ile Ki 67 ekspresyonu korelasyonu saptanmış olup prognostik faktörler arasında belirtilmiştir (20, 21). Mesane ve kolorektal karsinomlarda yapılan çalışmalarda benzer çalışmalara rastlanılmıştır (10, 11).

Bu bulgular eşliğinde seröz ve müsinöz over kanserlerinde proliferasyon markeri olarak Ki-67 kullanımı uygun görülmemekle beraber daha geniş sayıda randomize çalışmaya gerek bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Dodd JK, Henry RJW, Tyler PP. Tumor immunology and other post defense mechanism. *Gynecol Oncol*, 1989; 16: 560-613.
2. Sciarra JJ, Knapp RC, Berhomitz RS. Naturel history and detection of ovarian cancer. *Gynecology and Obstetrics*, 1984; 28: 1-14.
3. Yavuz H, Tezcan S, Erk A. Kadın genital kanserleri. Bölüm 9: Over karsinomları. 1978; 385-438.
4. Julian CG, Goss J, Blanchard K, Woodruff JD. Biologic behavior of primary ovarian malignancy. *Gynecol Oncol*, 1974; 873-4.

5. Julian CG, Woodruff JD. The biological behavior of low grade papillary serous carcinoma of the ovary. *Obstet Gynecol*, 1972;40: 860-7.
6. Genodry R, Poliakoff S, Rotmensch J, Rosenshein NB, Parmley TH, Woodruff JD. Primary papillary peritoneal neoplasia. *Cancer*, 1988; 62: 2212-22.
7. Bell DA. Ovarian surface epithelial - stromal tumors. *Hum Pathol*, 1991; 22:750-62.
8. Yancih R, Ries LG and Yartes JW. Ovarian cancer in the elderly; an analysis of surveillance, epidemiology and results data. *Am J Obs Gynecol*, 1986; 154: 639-47.
9. Runnebaum IB and Stickeler E. Epidemiological and molecular aspects of ovarian cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001; 127: 73-9.
10. Shi HR, Key MC, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin fixed, paraffin embedded tissues; an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*, 1991; 59:741-8.
11. Sessa F, Bonato M, Bisoni D, Ranzani GN, Capella C. Ki-ras and p53 gene mutations in pancreatic ductal carcinoma: a relationship with tumor phenotype and survive. *Eur J Histochem*, 1998; 42:67-76.
12. Nguyen HN, Averette HE, Hoskins W, Sevin BU, Penav1er M, Steren A. National Survey of Ovarian Carcinoma VI. Critical Assessment of Current International Federation of Gynecology and Obstetrics Staging System . *Cancer*. 1993; 72: 10.
13. Chen SS, Lee L. Incidence of paraaortic and pelvic lymph node metastasis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 1983; 16: 95-100.
14. Smith LH and Oi RH. Detection of malignant ovarian neoplasms, a review of the literature. Detection of thw patient at risk, clinical, radiological and cytological detection. *Obstet Gynecol Surv*, 1984; 39: 313-28.
15. Snider DD, Stuart GC, Nation JG and Robertson DI. Evaluation of surgical staging in stage 1 low malignant potential ovarian tumors. *Gynecol Oncol*, 1991; 40: 129-32.
16. Lewis E, Wallace WS. Radiologic Diagnosis of Ovarian Cancer. In: Piver MS, ed. *Ovarian Malignancies*. Edinburgh: Churchill Livingstone 1987: 59-80.
17. Sengupta PS, McGown AT, Bajaj V, Blackhall F, Swindell R, Bromley M, Shanks JH, Ward T, Buckley CH, Reynolds K, Slade RJ, Jason GC. p53 and related proteins in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer*, 2000;36(18):2317-28.
18. Salmaso R, Zen T, Zannol M, Perin D, Marchiori S, Marchetti M. Prognostic value of protein p53 and ki-67 in invasive vulvar squamous cell carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2000;21(5):479-83.
19. Stefansson IM, Salvesen HB, Immervoll H, Akslen LA. Prognostic impact of histological grade and vascular invasion compared with tumor cell proliferation in endometrial carcinoma of endometrioid type. *Histopathology*, 2004;44(5):472-9.
20. Salvesen HB, Das S, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression is not associated with promoter methylation but defines a subgroup of aggressive endometrial carcinomas with poor prognosis. *Clin Cancer Res*.2000;6(1):153-9.
21. Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA. Identification of high-risk patients by assesment of nuclear Ki-67 expression in a prospective study of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res*. 1998;4(11):2779-85.

GENOMİK, PROTEOMİK, METABOLOMİK KAVRAMLARINA GENEL BAKIŞ VE UYGULAMA ALANLARI

General Outlook and Applications of Genomics, Proteomics and Metabolomics

Esin BAŞARAN¹, Sümer ARAS¹, Demet CANSARAN-DUMAN²

¹Ankara Üniversitesi,
Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
ANKARA

²Refik Saydam Hıfzıssıhha
Merkezi Başkanlığı,
İlaç ve Kozmetikler Araştırma
Müdürlüğü, ANKARA

Geliş Tarihi: 25.09.2009
Kabul Tarihi: 06.06.2010

İletişim:
Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi,
Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Tandoğan-ANKARA
Tel : +90 312 212 67 20
E-posta : aras@science.ankara.edu.tr

ÖZET

Genomik, herhangi bir organizmanın yapısal ve işlevsel fonksiyonlarını kodlayan tüm genlerini tanımlar, bu genlerin birbirleri ve çevre ile etkileşiminin kontrolünü inceler. Çalışma alanlarına göre genomik yapısal ve fonksiyonel genomik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yapısal genomik ise genetik ve fiziksel haritalama ve DNA baz dizilerinin belirlenmesi yöntemleriyle organizmaların genetik bilgilerinin ortaya çıkarılmasını sağlar. Fonksiyonel genomik amacını da genlerin ekspresyonunu biçim, miktar ve zaman açısından genom düzeyinde inceleyerek genlerin fonksiyonlarının öğrenilmesinin yanında organizma açısından önemini anlaşılmasına da yardımcı olmaktadır. Proteomik; belli bir zaman ve mekânda bir organizmanın sahip olduğu ve ifade ettiği tüm farklı proteinlerin bir toplamıdır. Proteomik; belli bir zamanda belli bir yerde bulunan tüm proteinlerin yapılarını, yerleşimlerini, miktarlarını, translasyon sonrası modifikasyonlarını, doku ve hücrelerdeki işlevlerini, diğer proteinlerle ve makro moleküllerle olan etkileşimini aydınlatır. Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda lipid, karbohidratlar, vitaminler, hormonlar ve diğer hücre bileşenlerinden ortaya çıkan küçük moleküllü metabolitlerin yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanmasıdır. Genomik ve proteomik “ne olabileceğinin” metabolomik ise “gerçekte ne olduğunun” bilgisini verir. Bu nedenle, tüm metabolitlerin ayrıntılı ve kantitatif ölçümü (metabolomik) hastalık teşhisi veya toksik ajanların fenotip üzerindeki etkilerini araştırmada en ideal yöntemdir. Bu derlemede genomik, proteomik ve metabolomik konularında da detaylıca bilgiler verilmiştir. Ayrıca, insan genomunun şifresinin çözülmesi; yani DNA bazlarının diziliş sırasının belirlenmesi, doğuştan var olan yeteneklerimiz ile bazı davranış ve hastalıklara yatkınlığımızın bilinmesinin sağlanmasına yardımcı olan ‘İnsan Genom Projesi’ ve ‘İnsan Metabolom Projesi’ hakkında da geniş bilgi verilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Genomik, proteomik, metabolomik

ABSTRACT

The genomics determines the whole functional and structural genes of an organism, investigates the control of gene interactions with each other and the environmental factors.

Genomics is divided into two groups as functional and structural genomics. Structural genomics provides to reveal the genetic information of organisms by genetic and physical mapping and DNA base sequencing methods. The aim of functional genomics is to facilitate to understand the gene functions in terms of organisms by analyzing the gene expression, in terms of conformation, concentration and time on genome level. The proteome is the entire complement of total proteins including produced and expressed proteins by an organism in a particular time and place. The proteomics enlightens the structures, localizations, concentrations, post-translational modifications, cell and tissue functions and the interactions with the other proteins and macro molecules of all the proteins in a particular time and a place. The metabolomic is to determine the concentration of the small-molecule metabolites of lipids, carbohydrates, vitamins, hormones and other cell components in cells, tissues and physiological liquids by using high efficient technology in a particular time. Genomics and proteomics give information about 'what is happening' while metabolomics investigates 'what really happens'. Therefore, metabolomics is the best method for investigation of quantitative measurement, illness diagnosis or the effects of toxic agents on phenotype. Detailed information about proteomics and metabolomics is given in this review. Also, extensive information is given on The Human Genome Project and The Human Metabolom Project which help to reveal illness predispose and behaviours, our natural gifts, human genome decoding (determination of DNA base sequence).

Key Words: Genomics, proteomics, metabolomic

GİRİŞ

Kalıtımın temel fiziksel ve işlevsel birimi olan gen, genom dizisinde yeri tanımlanabilen, transkripsiyonu yapılan, düzenleyici ve/veya fonksiyonel bölgeleri olan bir bölgedir (1).

Genom; bir organizmanın kromozomlarında bulunan genetik şifrelerin tamamını simgeler. Genom terimi, ilk kez 1920 yılında Alman botanikçi Hans Winkler tarafından tanımlanmıştır (2). Ancak bu terim 1986'ya kadar pek kullanılmamıştır. Genetikçi Thomas Roderick bu terimi, genomun haritalanması, sekanslanması ve karakterizasyonunu tanımlamak için önermiştir (3).

1. GENOMİK

Genomik; herhangi bir canlının bütün yapısal ve işlevsel fonksiyonlarını kodlayan tüm genlerini teker teker tanımlayarak bu genlerin birbirleri ve çevre ile etkileşim ve iletişimlerini, zaman, yer ve miktar olarak üretim ve aktivasyonlarının kontrolünü bütünsel olarak inceleyen ve ortaya çıkan bilgiyi bilgisayar veritabanlarında işleyen, anlamlandıran ve saklayan bilim dalı olarak tanımlanır (4).

Genomik sayesinde farklı organizmalara ait genetik bilgiler karşılaştırılabilmekte, organizmalar arasındaki benzerlikler evrimsel düzeyde araştırılabilmekte ve organizmaların ürettikleri proteinlerin çeşitleri, sayıları ve bunların fonksiyonları hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Çalışma alanlarına göre genomik yapısal ve fonksiyonel genomik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır.

1.1 Yapısal Genomik

Yapısal genomik; genetik ve fiziksel haritalama ve DNA baz dizilerinin belirlenmesi yöntemleriyle organizmaların genetik bilgilerinin ortaya çıkarılmasını sağlar (5).

Genom haritalaması; genlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu yerlerin (lokus) gösterilmesidir. Genom haritalaması hem genetik hem de fiziksel haritalama yöntemleri ile yapılabilmektedir.

"Genetik haritalama" belli genlerin belli bir kromozom üzerindeki yerlerinin birbirlerine olan göreceli mesafelerini belirlemek ve genleri lineer

bir düzene oturtmak amacıyla hazırlanan grafiksel bir haritadır. Kısaca genomun matematiksel analizi olarak bilinen bu yöntemde genlerin kromozomlar üzerindeki lokalizasyonlarının bulunmasında moleküler biyolojik yöntemler ve bir dizi karmaşık istatistiksel analizler kullanılır (6). Özellikle genetik hastalıkların saptanması alanında son derece yararlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. En genel anlamı ile lokalizasyonu aranan gen ile lokalizasyonu bilinen bir genetik belirleyicinin (marker) kuşaklar arasında birlikte kalıtılmasının test edilmesi esasına dayanır.

“Fiziksel haritalama” genomik DNA’nın tümünü parçalara ayırarak kozmid, maya yapay kromozomları (YAC) veya bakteri yapay kromozomları (BAC) gibi vektörlere aktararak her kromozomun bir kitaplığının oluşturulması ve tüm kromozomlar düzeyinde birbirini takip eden klonların belirlenmesi ile oluşturulan bir haritadır (6). Fiziksel ya da moleküler haritalar, genomik DNA’nın klonlanmış parçalarının düzenlenmesiyle oluşturulurlar ve baz çifti sayılarına göre ayarlanmışlardır. Genetik haritadan farkı, direkt olarak DNA’yı oluşturan bazların sırasının belirlenmesidir. Böylelikle genlerin fiziksel yapıları kesin olarak ortaya konabilmektedir.

Çok sayıda fiziksel haritalama yöntemi geliştirilmiştir. Bunlardan en önemli üçü: Restriksiyon endonükleazlarınca tanınan dizilerin pozisyonlarının belirlendiği restriksiyon haritalaması, marker içeren bir probun hibridizasyonu ile marker bölgelerinin haritalandığı floresan *in situ* hibridizasyon ve PCR ile genomik DNA fragmentlerinin incelenerek kısa sekansların haritalandığı etiketli sekans bölgesi (STS) haritalamasıdır.

DNA dizi analizi (DNA sekanslama); DNA’nın nükleotid dizisinin saptanması anlamına gelmektedir. Bu işlem bazı aşamalardan oluşmakta olup öncelikle DNA’nın restriksiyon enzimleriyle parçalanması gerekmektedir. Klonlama aşamasında DNA 2-200 kb’lık diziler halinde çoğaltılır. Daha

sonra fluoressan maddeler ve jel elektroforezi kullanılarak DNA dizisinin okunmasını sağlayan dizileme aşaması gelmektedir. En son olarak da bu dizilerin bilgisayarda bir araya getirilmesi işlemleri ile sonlandırılır.

DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlamıştır. 1940’larda DNA baz kompozisyonu saptama yöntemleri bulunmasına karşın DNA’daki nükleotid dizilişlerinin doğrudan kimyasal analizi 1960’larda geliştirilip kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, 1965’te Robert Holley, 75 nükleotidlik bir tRNA molekülünün dizisini bir yıllık bir çalışma sonucu saptayabilmiştir (7). 1970’lerde daha etkin ve doğrudan nükleotid dizi analizine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA fragmanları elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesine paralel olarak dizi analizi yöntemlerinin kullanımı da artmıştır.

DNA dizi analizinde birbirinden farklı iki yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler; Maxam ve Gilbert’in kimyasal kırılma yöntemi (8) ve Sanger-Coulson’un zincir sonlanma yöntemidir (9).

DNA baz dizilimi; taksonomi ve tür belirleme çalışmaları, sosyal bilimlerde antropoloji alanında insan topluluklarının dağılımları ve dünya üzerindeki hareketleriyle ilgili araştırmalar, adli tıp alanında suçlunun belirlenmesine yönelik çalışmalar ve de belli özelliklerle ilişkili genlerin ya da gen parçalarının belirlenmesine yönelik çalışma alanlarında kullanılabilirlerdir.

1.2 Fonksiyonel Genomik

Fonksiyonel genomik genlerin ekspresyonunu, biçim, miktar ve zaman açısından genom düzeyinde inceleyerek genlerin fonksiyonlarının öğrenilmesinin yanında organizma açısından öneminin anlaşılmasına da yardımcı olmaktadır (5).

Transkriptom; belli bir zamanda bir hücre veya dokudaki gen transkriptlerinin (RNA) tümünü ifade etmek amacıyla kullanılan bir ifadedir.

Transkriptomik; hücre genomundan transkripsiyonla oluşan mRNA transkriptlerinin eş zamanlı incelenmesidir. Bir örnekte bulunan RNA miktarına bağlı olarak, genlerin seçilmiş bir alt grubunun veya tamamının ekspresyon düzeyini ölçmeyi hedeflemektedir (10).

mRNA analiz yöntemleri; Northern Blot (Tek gen analizi), Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) (Tek gen analizi) ve Mikroçip (Microarray) (Genom boyunca analiz)'dir.

a. Northern blot: Bu yöntemde DNA yerine mRNA veya viral RNA kullanılarak işlem yürütülür. Northern blotlama dört temel adımda ve sonuçların boyama yapılarak gerçekleştirilir. Bunlar;

1. RNA izolasyonu,
2. RNA'nın jel elektroforezinde yürütülmesi,
3. Uygun bir membrana aktarılması,

4. Membrandaki RNA'ların, radyoaktif işaretli ve tek zincirli bir DNA prob ile melezlenmesi ve sonucun otoradyografi veya boyamayla saptanması (11).

Bu yöntemin avantajı, genin RNA kopyasının boyutunun belirlenmesi ve farklı dokularda farklı RNA ürünü olasılığının araştırılmasında kullanılmasıdır. Ancak işlem hacmi düşük olan bu teknikte miktar tayini hassas değildir.

b. Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR): Genler etkilerini mRNA üretimi ile ortaya çıkarırlar. Normal koşullarda RNAz enzimlerinin aktivitesi ile çok çabuk parçalandıklarından, mRNA'lar ile laboratuvar şartlarında çalışılması oldukça güçtür. Bu nedenle mRNA preparatları mRNA'nın DNA karşılığı olan cDNA'ya çevrilirler ve bu halde kullanılırlar.

RTPCR'dan mRNA veya viral RNA'nın çoğaltılmasında faydalanılır. Bu PCR çeşidinde bir

ters transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır. RT-PCR iki aşamalı olup RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi (ters transkripsiyon) ve tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın da standart PCR yoluyla çoğaltılması aşamalarını kapsar. RT-PCR'da reaksiyonun ilk basamağı olan ters transkripsiyon aşamasında kullanılan primerler (oligo dT veya random) poliadenillenmiş bölgeye bağlanırlar. Bu nedenle RT-PCR ile 3'- poly (A) kuyruğuna sahip mRNA'ların çoğaltma işlemleri yapılabilir (12).

Primer bağlanma yerlerinin genelde transkriptin tam ucunda olmaması nedeniyle tüm RNA molekülünün tam kopyasının çoğu kez elde edilememesi yöntemin zayıf yönüdür. İşlem hacmi Northern blot'tan yüksek mikroçiplerden düşüktür.

c. Mikroçip (Microarray): İleri derecede genotip ve gen ekspresyon analizleri için geliştirilmiş bir tekniktir. Küçük örnek hacimleri kullanılarak tek deneyde mikroçipler, Tek nükleotid polimorfizmi (SNP) veya değişik (örn: hastalıklı) ve normal fizyolojik koşullardaki modifiye gen ekspresyonunun (mRNA'daki artış ve azalışlar) hızlı bir şekilde çalışılmasını sağlar (13).

Mikroçip teknolojisi ile yaklaşık 1.8*1.8 cm ebatlarındaki bir cam üzerinde (dizi veya array) birden fazla DNA bölgesini (neredeyse tüm bir genomunu) tek bir seferde yüksek hassasiyette incelemek mümkündür. DNA mikroçipleri aktif proteinlere çevrilebilen ya da çevrilemeyen RNA'ların saptanmasında da kullanılabilir. Bu tip analizler ekspresyon analizi ya da ekspresyon profili belirleme şeklinde adlandırılır. Mikroçip ile tamamlanan ilk ökaryotik genom *Saccharomyces cerevisiae*'ninki olmuştur (14).

Tipik bir genomik mikroçip çalışmasının beş temel basamağı vardır (15-16) (Şekil 1):

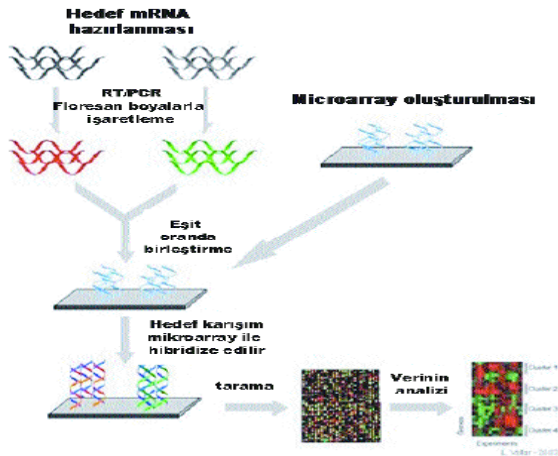
1. Hedef DNA/cDNA dizilerine tamamlayıcı diziler içeren problemlerin immobilize edildiği mikroarray platformunun hazırlanması veya ticari olarak temin edilmesi.

2. İncelenecek numuneden floresan ile işaretlenmiş cDNA/DNA/cRNA'nın hazırlanması.

3. İşaretlenmiş cDNA/DNA/cRNA ile mikroçip platformunun hibridizasyon solüsyonu içerisinde karşılaştırılması.

4. Yıkama sonrasında platform yüzeyinde hibridizasyonun varlığının tarayıcı veya okuyucu aracılığıyla analiz edilmesi ve görüntünün bir bilgisayarda depolanması.

5. Depolanan görüntünün bir yazılım aracılığıyla değerlendirilmesi ile mikroçip platformu üzerindeki hangi noktalarda hibridizasyon olup olmadığının ve niceliksel olarak düzeyinin (koyu mavi-yeşil-sarı-kırmızı renk yelpazesinde) değerlendirilmesi ve yorumlanması.



Şekil 1. Mikroçip yönteminin şematik gösterimi (16)

Mikroçip yönteminin kullanım amaçları iki hedefe yönelik olarak uygulanmaktadır (15):

1. **Gen ekspresyon düzeyinin ve düzey farklılıklarının ölçülmesi:** Ekspresyon şu koşullarda çalışılabilir; Farklı dokular, farklı gelişim basamakları, farklı genotipler, farklı uygulamalar, bir uygulama sonrası farklı zamanlar.

2. **Genom baz dizisinin ve genomlar arası dizi farklılıklarının ortaya konması:** Tek nükleotid

polimorfizmi (single nucleotide polymorphism) gibi teknikler ile mutasyon analizleri yapılabilmektedir. Bu amacı gerçekleştirmek için bir gende olabilecek tüm farklı mutasyon ihtimalleri tek bir çip üzerinde test edilir. SNP mikroarraylerin de yardımı ile hastalığa veya hastalığa yatkınlığa neden olan genler saptanabilmektedir.

Bitkilerde mikroçip teknolojisi ilk defa *Arabidopsis*'te yaprak ve kökteki gen ekspresyon profillerini belirlemek için 48 cDNA parçacığını içeren çip kullanılarak yapılmıştır (17). Daha sonra 1443 *Arabidopsis* geni içeren cDNA mikroçip farklı organ ve gelişme evresinde olan bitkilerde gen ekspresyon profilleri belirlenmiştir (18). Son yıllarda mikroçip teknolojisi model bitki *Arabidopsis* (19), pirinç (20), mısır (21), çilek (22), fasulye (23) gibi tarımsal açıdan önemli olan birçok bitkide, farklı koşullardaki gen ekspresyon profillerini belirlemek için kullanılmaktadır (24). Ayrıca mikroçiplerden bitkilerde abiyotik (25) ve biyotik stresler (26), meyve olgunlaşması (27), sirkadiyen saati (28), fitokrom A sinyalleme (29), tohum gelişmesi (30) ve nitrat asimilasyonu (31) sırasında aktif olan veya aktivitelerini azaltan genlerin bulunmasında yararlanılmaktadır. Buna benzer çalışmalar tüm genom DNA baz dizisi belli olan *Arabidopsis* ve pirinçte kullanılabileceği gibi kısmi genom DNA dizileri belirlenmiş ya da belirlenmekte olan birçok diğer bitkide de uygulanabilmektedir (32).

Mikroçip teknolojisinin birçok avantajları bulunmaktadır. Bu teknoloji, gen ifadesi modellerinin genel bir görüntüsünü elde etmeyi mümkün kılar. Belli bir hücre türünün belirli bir ortam için gen ifadesi profili belirlenip, bu profiller farklı hücre tipleri ve/veya farklı çevre koşullarındaki gen ifadesi profilleriyle karşılaştırılabilirler. Bu işlemler için yüksek kararlılık ve verim elde edebilmek amacıyla az miktarlarda DNA örneği yeterli olmaktadır. Mikroçip teknolojisi sayesinde, DNA üzerindeki tek baz değişiklikleri bile saptanabilmekte, kısa sürede ve oldukça pratik olarak birkaç bin genin analizini

yapmak mümkün olabilmektedir. Otomasyona dayalı bir sistem olduğu için insan kaynaklı hataların ortaya çıkma ihtimali de oldukça düşüktür (33).

Mikroçiplerin bilimin hizmetine sunulması büyük bir heyecan yaratmış olmasına rağmen bazı problemleri de beraberinde getirmiştir. Tüm deney düzeneği nükleik asit hibridizasyon yöntemine bağlıdır ve yüksek oranda benzerlik gösteren DNA dizileri problem yaratabilmektedir. Bu nedenle mikroçipten elde edilen veriler klasik gen ekspresyon analiz yöntemleriyle doğrulanmalıdır.

Ayrıca tüm mikroçip deneylerinin aynı hassasiyette olmayışı, ekspresyondaki küçük değişikliklerin analizde fark edilemeyecek boyutta olması, birbirinden farklı çipler kullanılarak yapılan deneylerin karşılaştırılmasında yaşanan zorluklar, optimizasyon ve standardizasyon sorunları ve herhangi bir deneyden elde edilen sonuçları her yönüyle değerlendirebilecek biyoinformatik programların henüz tam geliştirilememiş olması karşılaşılan sorunlardan birkaçıdır. Bu tür sorunları çözebilmek amacıyla Microarray Gene Expression Data Society gibi bazı yeni kuruluşlar oluşturulmaktadır (33).

2. PROTEOMİK

Proteom; belli bir zaman ve mekânda bir organizmanın sahip olduğu ve ifade ettiği tüm farklı proteinlerin bir toplamıdır. “Farklı proteinler” sadece genler tarafından kodlanan polipeptid yapıları değil, aynı zamanda sentez sonrası modifikasyonları da içermektedir. “Mekân” terimi farklı proteinlerin farklı hücre kompartmanlarında ve farklı hücre tiplerinde ifadesini belirtir. “Zaman” ise farklı gelişim evreleri, çevresel koşullar, çeşitli hastalıklar, yaşlılık gibi süreçlere işaret eder (34). Proteom kelimesi ilk kez 1994 yılında, Siena’da “İki yönlü elektroforez” toplantısında Avustralyalı araştırmacı Marc Wilkins tarafından önerilmiş ve kabul görmüştür.

Proteomik; belli bir zamanda belli bir yerde bulunan tüm proteinlerin yapılarını, yerleşimlerini, miktarlarını, translasyon sonrası modifikasyonlarını, doku ve hücrelerdeki işlevlerini, diğer proteinlerle ve makro moleküllerle olan etkileşimini aydınlatır. Proteomik, dinamik bir terim olup farklı koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarındaki proteinlerin kantitatif analiz teknolojisi olarak tanımlanır. Kıyaslamalı proteomik ise iki farklı durum arasındaki (normal ve hastalık, yaşlı ve genç) ekspresyonun karşılaştırılmasına dayanır (35).

Proteomik çalışmalarının amaçları ise şunlardır;

1.mRNA ekspresyon düzeyleri, protein ekspresyon düzeyleri ile iyi korele edilemez.

2.mRNA düzeyleri, kodlanmış proteinin aktivitesini yansıtmaz.

3.mRNA düzeyinde proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları ile ilgili bilgi sağlanamaz.

4.Genom ve Proteom = komplementer veri sağlar.

Proteomik alanında ülkemiz adresli ilk uluslararası yayın Nisan 2007’de Proteomics dergisinde, dergi kapağında da yer alarak yayınlanmıştır. Bu araştırmaya konu olan mikroorganizma, odunlu bitkilerin yapısındaki lignini tamamen mineralize edebilen, ayıca fenolik kirleticileri parçalamakta çok etkin bir biçimde kullanılan biyoteknolojik önemi yüksek *Phanerochaeta chrysosporium* isimli bir beyaz çürükçül mantardır. Bu mantarın hücreleri ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarına dirençlidir ve bu metalleri hücre duvarına bağlama kapasiteleri yüksektir. Bu araştırmada *P. chrysosporium* ağır metallere verdiği yanıtta yer alan protein elemanlarının ve protein modifikasyonlarının tanımlanarak global gen ifade profilinin elde edilmesiyle organizmanın metal stresiyle başa çıkabilmesini sağlayan yanıtın moleküler seviyede öğrenilmesi amaçlanmıştır. Organizmanın ağır metallere maruz kaldığında değişen proteomları

referans proteom haritasıyla karşılaştırılmış, ifadelerinde değişim görülen en az 200 adet protein tanımlanmış ve mikroorganizmanın stres yanıtında kullandığı mekanizmalar aydınlatılmıştır (36).

3. METABOLOMİK

2003 yılında tamamlanan “İnsan Genom Projesi” insan vücudunda 30.000 civarında gen bulunduğunu, bunların % 99.9’unun tüm bireylerde aynı, % 0.1’inin farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır (37). Bu % 0.1’lik fark neden bazı kişilerin hastalık riski taşıdığını, hastalıkların şiddetinin neden kişiler arasında farklılık gösterdiğini, neden bazı kişilerde ilaçlara daha iyi yanıt alındığını açıklamada önemli olacaktır. Yani, genlerin tanımlanması ile bilinmeyenler tamamen çözümlenmemiş, bu genlerin fonksiyonları araştırılmaya başlanmış, proteomik ve transkriptomik çalışmaları yapılmıştır. Ama bu araştırmalardan elde edilen bilgiler de klinik fenotipleri açıklamak için yeterli olmamıştır. Çünkü, klinik fenotipi belirleyen bilgi hücrede oluşan metabolitlerde saklıdır (38). Metabolit; canlılarda çeşitli tepkimeler sırasında ortaya çıkan ve normal olarak vücutta birikmeyerek başka bileşiklere dönüşen kimyasal bileşiklerdir.

Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda lipid, karbohidratlar, vitaminler, hormonlar ve diğer hücre bileşenlerinden ortaya çıkan küçük moleküllü metabolitlerin yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanmasıdır. Küçük moleküller peptitler, oligonükleotidler, şekerler, nükleozidler, organik asitler, ketonlar, aldehitler, aminler, amino asitler, lipitler, steroidler, alkaloidler ve ilaçlar, insan-bakteri ürünleri gibi metabolitlerdir ve molekül ağırlıkları 1.500 Da’un altındadır (39).

Genomik ve proteomik “ne olabileceğinin” metabolomik ise “gerçekte ne olduğunun” bilgisini

verir. Bu nedenle, tüm metabolitlerin ayrıntılı ve kantitatif ölçümü (metabolomik) hastalık teşhisi veya toksik ajanların fenotip üzerindeki etkilerini araştırmada en ideal yöntemdir (40).

İnsandaki metabolitlerin sayısı tam olarak bilinmemekte; en az iki-üç bin en fazla yirmi bin olabileceği tahmin edilmektedir. Metabolomik analizleri serum, idrar, beyin omurilik sıvısı, plazma, tükürük gibi vücut sıvılarında yapılabilir. Bu analiz klinik biyokimya ile farmakoloji, pre-klinik ilaç denemeleri toksikoloji, transplant izlemi, kanser metabolizması, yeni doğan taraması alanlarında kullanılmaktadır (38). Proteomikte olduğu gibi metabolomik de hastalık belirleyicisi olan veya tedavi denetimini sağlayan metabolitleri belirlemeyi amaçlar. Sözelimi; hastanın metabolik profili ve genetik yapısına göre diyet önerilerinde bulunulmasına imkân verir.

Metabolomik, biyoloji, kimya ve matematik içeren multi-disipliner bir bilimdir. Çok değişkenli veri analiz yöntemleriyle birleştirilmiş kromatografi, moleküler spektroskopi ve kütle spektrometrisi gibi analitik tekniklere ihtiyaç vardır. Metabolomik çalışmalarında esas olarak iki teknoloji kullanılmaktadır. Bunlar; NMR ve değişik kütle spektrofotometreleridir (41).

Hedef bileşik analizleri ve metabolik profilleri için; Gaz Kromatografisi (GS), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) gibi kromatografik ayırma yöntemlerine dayanmaktadır.

Parmak izi yöntemleri örnek sayısının fazla olduğu durumlarda hızlı bir şekilde profillerinin çıkarılması için kullanılmaktadır. Örnekler çözücü ekstraksiyonundan sonra, Bozulmamış dokular (magic angle spinning NMR), Sıvı veya yarı katı materyaller (NMR ve FT-IR) veya Kuru materyaller (FT-IR) (42) analizleri gerçekleştirilir.

4. İNSAN GENOM PROJESİ

Tüm insan genom dizisinin belirlenmesi fikri ilk defa 1984-1986 arasında Amerika Birleşik Devletleri Enerji Bakanlığında (DOE) bilimsel toplantılarda tartışılmıştır. Enerji Bakanlığı ve Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health) tarafından yönetilen ve 18 ülkenin destek verdiği bu proje 1990 yılında 15 yıllık bir süre için başlatılmıştır. Projenin ilk beş yıllık bölümü (1993-1998) tamamlandıktan sonra 1998-2003 yıllarını kapsayan ikinci bir beş yıl sonunda proje tamamlanmıştır (37). Amacı; insan genomundaki yaklaşık 3 milyar DNA bazını ve yaklaşık 30 bin civarında olduğu tahmin edilen genleri tanımlamaktır. Bu projenin önemi; insan genomunun şifresinin çözülmesi; yani DNA bazlarının diziliş sırasının belirlenmesi, doğuştan var olan yeteneklerimiz ile bazı davranış ve hastalıklara yatkınlığımızın bilinmesinin sağlamasıdır. Saptanan sonuçlar ise; İnsan genomu 3.164.700.000 nükleotidten oluşmaktadır; Bir gen ortalama 3.000 nükleotidten oluşur ancak bu sayı çok değişkendir. En büyük gen olarak bilinen distrofin geni, 2,4 milyon baz içerir, Toplam gen sayısı 29.000-36.000 arasındadır; Nükleotid dizilerinin % 99,9'u bütün insanlarda aynıdır; Bu güne kadar insanlarda 1,5 milyon kadar tek nükleotid değişikliği bölgesi saptanmıştır.

Tanımlanmış genlerin % 50'den fazlasının işlevleri henüz bilinmemektedir. Genlerimizin büyük kısmı (% 40) sinir sisteminin oluşumunda ve desteklenmesinde görevlidir. Bu sonuçlar ayrıca genlerin hatalı çalışmasından kaynaklanan nörojenetik hastalıklara çözüm getirme sürecini de hızlandıracaktır. İnsan davranışlarındaki açıklanamayan sapmalar, eğilimler de bu yolla açıklanabilecektir. Öyle ki yeni tespit edilen bazı genlerin uyuşturucu bağımlılığında rol alabileceği öngörülmektedir. Örneğin insanlardaki dopamin taşıyıcı mekanizmaların farklılığı neden bazı kişilerin bağımlı olmaya daha yatkın olduğunu açıklayabilir yeterliliktedir (43).

Genomun yaklaşık % 2'si proteinleri kodlamakta ve proteinleri kodlamayan dizi tekrarları, genomun büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. En fazla geni 1. Kromozom (2.968) ve en az geni Y kromozomu (231) içermektedir. Aynı gen alternatif mRNA kesip eklenmeleri ve kimyasal değişikliklere bağlı olarak değişik proteinleri kodlayabilmektedir. İnsan; bitki, sinek ve kurtçuklarla ortak protein ailelerine sahiptir ancak gen aileleri (özellikle gelişme ve bağışıklıktan sorumlu olanlar) insanda daha fazla yer almaktadır.

İnsan Genom Projesinden beklenen faydalar Tablo1'de özetlenmiştir;

Projenin en çok ilgi çeken sonuçlarından biri X ve Y kromozomlarının mutasyonla olan ilişkisidir. Projedeki araştırmacılar X ve Y kromozomlarının üzerindeki tekrarlanan diziler üzerinde çalışarak, erkek/kadın mutasyon oranının 2/1 olduğunu saptamışlardır. Bu oranın temelinde, erkek cinsiyet hücrelerinin gelişiminde yeni mutasyonlara olanak sağlayabilecek daha fazla sayıda hücre bölünmesinin gerçekleşmesi, sperm ve yumurta hücrelerinde farklı DNA tamir mekanizmalarının bulunması olasılıkları yatmaktadır (43).

5. İNSAN METABOLOM PROJESİ (HMP)

Metabolomik çalışmalar içinde çeşitli işbirlikleri oluşturulmuştur. Bunlardan ilk başlayan ve tamamlanan İnsan Metabolom Projesi (HMP), 2005 yılında Kanada Alberta Üniversitesi'nin, Genom Kanada ve Kanada İnovasyon Kurumu'nun desteği ile başlayan 7,5 milyon dolar bütçeli bir inovasyon projesidir. HMP projesi ile insan vücudunda idrar, beyin omurilik sıvısı, plazma ve lökositlerde bir mikromolardan daha fazla konsantrasyonda bulunan tüm metabolitleri tanımlamak, ölçmek ve normal-anormal değer aralığını belirlemek, bu verilerin serbestçe elektronik ortamda elde edilebilir olmasını sağlamak (Human Metabolome Data Base-HMDB) ve tanımlanan bileşiklere halkın ulaşmasını sağlayacak bir kütüphane (Human Metabolome Library-HML) oluşturmak amaçlanmıştır.

Tablo 1. İnsan Genom Projesinden beklenen faydalar

Alan	Getiriler
Moleküler tıp	Tanı yöntemlerinin geliştirilmesi Hastalıklara genetik yatkınlığın belirlenmesi Genetik yapıya özgün ilaçların geliştirilmesi Gen tedavisi yöntemlerinin geliştirilmesi
Çevre ve enerji	Yeni enerji kaynaklarının geliştirilmesi Çevre kirleticilerin saptanması ve kontrolü Biyolojik ve kimyasal ajanlara karşı koruma yöntemlerinin geliştirilmesi Zehirli atıkların güvenli olarak etkisizleştirilmesi
Risk değerlendirme	Radyasyon ve toksik ajanların kanserojen ve diğer zararlı etkilerinin mekanizmalarıyla birlikte aydınlatılması Nesilden nesile geçen (kalıtlılabılır) mutasyonların ebeveynlerden yavrulara geçme riskini azaltılması,
Tarım, hayvancılık ve biyoişlem	Kuraklığa, zararlılara, hastalıklara dirençli bitkilerin geliştirilmesi Daha sağlıklı ve kaliteli çiftlik hayvanlarının geliştirilmesi Besin değeri yüksek ürünlerin geliştirilmesi Biyopestisitlerin üretilmesi Yenilebilir aşılarda (meyve ve sebzelerin içinde) üretilmesi Çevre temizlemede kullanılacak ağır metal toplayıcı bitkilerin geliştirilmesi Bakteri genetiği Patojen bakterilerin kolay ve hızlı saptanması
Biyoarkeoloji, antropoloji, evrim ve tarih	Evrimin moleküler düzeyde gösterilmesi Değişik toplumların göç yollarının ve akrabalıklarının araştırılması Y kromozom mutasyonlarının incelenmesiyle erkek dağılımının ve göçlerinin araştırılması
DNA tanımlama	Adli tıpta suçluların belirlenmesi. Her türlü cinayette ve adli vakalarda, failin geride bıraktığı hücre örneklerinden, herkesin kendine has olarak yaratılmış DNA programını kullanarak gerçek suçluyu belirleme imkânında büyük ilerlemeler olacaktır Kan bağlarının saptanması. Analık-babalık, velâyet ve miras davalarındaki ihtilafların çözümünde inkâr mümkün olmayan sağlam deliller ortaya konulacağı için büyük kolaylıklar yaşanacaktır Çevre kirleticisi bakteri ve benzeri organizmaların saptanması Organ nakillerinde doku uyumunun kesin olarak saptanması Soy ağaçlarının geliştirilmesi

HMP 2009 yılında tamamlanmış ve sonuçları www.hmdb.ca adresinde açıklanmış, bu veritabanı hakkında bilgi yayınlanmış, halkın erişebileceği bir kütüphane oluşturulmuş ve aynı web sitesinden bu kütüphaneye bir bağlantı sağlanmıştır.

HMDB, 2500 endojen metabolit içermektedir. Bu metabolitler 27,700'den fazla farklı sinonimle, 115 metabolik yolla, 2080 farklı enzim, 110,000 tek nükleotid polimorfizmi ve 862 genetik veya kazanılmış metabolik hastalıkla bağlantılıdır. Her metabolit için yaklaşık 90 farklı sayfada değişik özellikler sunulmuştur. HMDB endojen metabolitlerin yanı sıra 1500 ilaç, 3900 besin bileşeni içermektedir. HML'deki bileşik sayısı 778'dir (45,46).

SONUÇ

Bütün bu beklenen faydaların ortaya çıkması, büyük bir ekonomik faaliyet alanının ve endüstrinin

doğmasıyla mümkün olduğundan, 21. yüzyılın kritik teknolojisi, demir ve metale bağlı gri teknolojiler değil, canlıların genom bilgisini kullanmaya bağlı model organizmaların, birer fabrika olarak kullanılacağı gen teknolojileri olacak denilebilir (44). Düşünülen sayısız faydalarının yanında, tıpkı nükleer santraller ile atom bombasının, maddenin aynı özelliğinden yararlanarak icat edilmesi gibi, genlerle oynamanın çok korkunç bedelleriyle karşılaşılması ihtimalini de unutmamak gerekir. İnsanın veya kullandığımız hayvan ve bitki genlerinin şifreleriyle oynarken, sonumuzu getirebilir, hiçbir ilâcın etki edemediği virüsler, bakteriler veya mantarlar üreterek, büyük felâketlere de sebep olabiliriz.

Türkiye bu çalışmalarda ve sonuçlarında söz sahibi olmak, elde edilen sonuçlardan haberdar olmak için bu çalışmaları en kısa sürede aciliyetle ilerletmelidir. Ülkemizdeki Genetik Mühendisleri ve Biyologlar bu teknolojiyi daha ileriye taşıyacaklardır.

KAYNAKLAR

1. Pearson H. Genetics: what is a gene?". Nature, 2006; 441: 398-401.
2. Winkler H. Verbreitung und Ursache der Parthenogenesis im Pflanzen und Tierreiche. Verlag Fischer, Jena, 1920: 128.
3. Kuska B. Beer, Bethesda, and biology: How "genomics" came into being. J Natl Cancer Inst, 1998; 90(2): 93.
4. Siddik Yarman B, Gurkan H, Guz U, Aygün B. "A new modeling method of the ECG signals based on the use of an optimized predefined functional database" Acta Cardiologica, Int J Cardiol 2003; 58 (3): 59-61.
5. Şahin M, Çevik D. Mikroarray teknolojisi ve bitkilerde uygulama alanları. SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 2005; 9-13.
6. Yuluğ İ. İnsan genom projesi. Avrasya Dosyası, Moleküler Biyoloji ve Gen Teknolojileri, 2002; 8/3: 7-23.
7. Holley RW, Everett GA, Madison JT, Zamir A. Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. J Biol Chem, 1965; 240: 2122-8.
8. Maxam A, Gilbert W. A new method of sequencing DNA. PNAS 1977; 74: 560-4.
9. Sanger F, Nicklen S, Coulson, AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. PNAS 1977; 74: 5463-7.
10. Gündoğdu AK, Karahan AG. Nutrigenomik Teknolojileri. SDÜ Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi, 2008; 33 (4): 183-191.
11. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc Natl Acad Sci USA, 1977; 74 (12): 5350-4.
12. Tefferi A, Wieben ED, Dewald WG, Whiteman DAH, Bernard ME, Spelsberg TC. Primer on Medical Genomics Part II: Background Principles and Methods in Molecular Genetics. Mayo Clin Proc 2002; 77: 785-808.
13. www.microarray.swmed.edu.2009.
14. Mewes HW, Albermann K, Bahr M, Frishman D, Gleissner A, Hani J, Heumann K, Kleine K, Maiert A, Oliver SG, Pfeiffer F, Zollner A. Overview of the yeast genome. Nature, 1997; 387 : 7-65.
15. Saraçlı MA. DNA Chip Teknolojisi ve Mikolojide Uygulama Alanları. Sempozyum: Mikozlar ve moleküler yöntemler. GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikoloji Bilim Dalı, Ankara, 2007; 181-4.

16. Alper B. Geçmişten Günümüze DNA İnceleme Teknikleri ve Prensipleri, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Adana, 2008.
17. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995; 270: 467- 70.
18. Ruan Y, Gilmore J, Conner T. Towards Arabidopsis genome analysis: Monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. *Plant J*, 1998; 15: 821-33.
19. Lin JF, Wu SH. Molecular events in senescing Arabidopsis leaves. *Plant J*, 2004; 39(4): 612-28.
20. Lan L, Chen W, Lai Y, Suo J, Kong Z, Li C, Lu Y, Zhang Y, Zhao X, Zhang X, Zhang Y, Han B, Cheng J, Xue Y. Monitoring of gene expression profiles and isolation of candidate genes involved in pollination and fertilization in rice (*Oryza sativa L.*) with a 10K cDNA microarray. *Plant Mol Biol*, 2004; 54(4): 471-87.
21. Wang H, Miyazaki S, Kawai K, Deyholos M, Galbraith DW, Bohnert HJ. Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots. *Plant Mol Biol*, 2003; 52(4): 873-91.
22. Aharoni A, Keizer LC, Van Den Broeck HC, Blanco-Portales R, Munoz-Blanco J, Bois G, Smit P, De Vos RC, O'Connell AP. Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiol*, 2002; 129(3): 1019-31.
23. Arimura G, Tashiro K, Kuhara S, Nishioka T, Ozawa R, Takabayashi J. Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 277(2): 305-10.
24. Aharoni A, Vorst O. DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Mol Biol*, 2001; 48: 99-118.
25. Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J*, 2002; 31: 279-92.
26. Gibly A, Bonshtien A, Balaji V, Debbie P, Martin GB, Sessa G. Identification and expression profiling of tomato genes differentially regulated during a resistance response to *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004; 17(11): 1212-22.
27. Schwab W, Aharoni A, Raab T, Perez C, Sanz AG. Cytosolic aldolase is a ripening related enzyme in strawberry fruits (*Fragaria ananassa*). *Phytochemistry*, 2001; 56(5): 407-15.
28. Schaffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M, Wisman E. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2001; 13: 113-23.
29. Wang H, Ma L, Habashi J, Li J, Zhao H, Deng XW. Analysis of far-red light-regulated genome expression profiles of phytochrome: A pathway mutants in Arabidopsis. *Plant J*, 2002; 32(5): 723-33.
30. Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell*, 2003; 15(7): 1591-604.
31. Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford NM. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol*, 2003; 132(2): 556-67.
32. Kuhn E. From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Ann Bot*, 2001; 87: 139-55.
33. http://www.istanbul.edu.tr/fen/mbg/ders_notlari/nermin_g/ogrencisunumlari_genmh5.pdf.2008
34. Özcengiz G. Proteomik: Post-genomik dönemin en güçlü teknolojisi. *ODTÜ Haber Bülteni* 2007; 15: 13-9.
35. György Makro-Varga. Proteomics principles and challenges. *Pure Appl Chem*, 2004; 76(4): 829-37.
36. Özcan S, Yıldırım V, Kaya L, Becher D, Hecker M, Özcengiz G. *Phanerochaete chrysosporium* soluble proteome as a prelude for the analysis of heavy metal response. *Proteomics* 2007; 7: 1249-60.
37. Venter D. A part of the human genome sequence. *Science*, 2003; 299: 1183-84.
38. Bren L. Metabolomics: Working toward personalized medicine. *FDA Consum*, 2005; 39: 28-33.
39. Goodacre R. Metabolomics-the way forward. *Metabolomics* 2005; 1: 1-2.
40. Coşkun T. Nutrisyonel genomik. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2007; 50: 47-66.
41. German JB, Hammock BD, Watkins SM. Metabolomics: Building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics* 2005; 1: 3-9.

42. Dettmer K, Hammock BD. Metabolomics - a new exciting field within the “omics” sciences. *Environ Health Persp*, 2004; 112: 396-7.
43. Yiğit A, Güney Ö. İnsan genomu projesindeki gelişmeler ve değerlendirmeler. *Bilim ve Teknik* 2001; 400.
44. Balcan E. Gen Ekspresyonu ve Regülasyonu Ders Notları, 2008.
45. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, et al. HMDB: the human metabolome database. *Nucleic Acids Res*, 2007; 35; 521-6.
46. Wishart DS. Human metabolome database: Completing the ‘human parts list’. *Pharmacogenomics*, 2007; 8: 683-6.

ORGANOFOSFATLI PESTİSİT ZEHİRLENMELERİ VE SERUM PARAOKSONAZ 1 (PON1) ENZİMİNİN ORGANOFOSFAT METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ

Organophosphate Pesticide Poisonings and the Role of Serum Paraoxonase 1 (PON1) Enzyme in Organophosphate Metabolism

Birsen CAN DEMİRDÖĞEN¹

¹ Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Gıda Güvenliği ve Beslenme Araştırma Müdürlüğü, ANKARA

Geliş Tarihi: 24.02.2010
Kabul Tarihi: 06.06.2010

İletişim:
Birsen CAN DEMİRDÖĞEN
Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı,
Gıda Güvenliği ve Beslenme Araştırma Müdürlüğü,
Cemal Gürsel Cad. No:18
06100 Sıhhiye-ANKARA
Tel : +90 312 458 21 40
E-posta : birsencan.demirdogen@rshm.gov.tr

ÖZET

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre tüm dünyada yılda 3 milyona yakın pestisit zehirlenmesi meydana gelmekte, bunların 220.000'i ölümlü sonuçlanmaktadır. Son yıllarda sıklıkla kullanılan pestisitlerden olan organofosfatlar, sinir sistemi üzerinde etki gösteren kimyasallardır. Organofosfatlar asetilkolinesteraz enzimini baskılayarak nörotoksositeye yol açarlar. Paraoksonaz 1 (PON 1; EC 3.1.8.1) serumda yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) üzerinde yer alan, kalsiyuma bağımlı glikoprotein yapısında bir enzimdir. Memelilerin birçok organında PON1 aktivitesi tespit edilmesine karşın, kuşlar, balıklar ve böceklerde paraoksonaz aktivitesi sifıra yakındır. PON1'in hidrolize ettiği substratlar arasında paration, diazinon ve klorprifos gibi organofosfatlı insektisitlerin aktif formu olan toksik okson metabolitleri; sarin, ve soman gibi sinir gazları; fenil asetat gibi aromatik esterler; homogentisik asit lakton, dihidrokumarin ve homosistein tiolakton gibi birçok aromatik ve alifatik lakton ile siklik karbonatlar yer almaktadır. Organofosfatlı pestisitlerin toksikolojisi ile ilgili yapılan ilk çalışmalar düşük serum PON1 aktivitesine sahip olmanın organofosfatlı bileşiklerin akut etkilerine karşı duyarlılığı arttırdığını ortaya koymuştur. PON1'i kodlayan genin sekansının belirlenmesinin ardından, kişiler arasında enzimin aktivitesinde ve ifade edilme seviyesinde farklılıklara yol açan polimorfizmler tespit edilmesi, PON1 aktiviteleri düşük olan insanların organofosfat zehirlenmelerine karşı daha hassas olabileceğini düşündürmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda saflaştırılmış PON1'in organofosfatlı pestisitlere maruz kalan hayvanlara enjekte edilmesi, dolayısı ile serum PON1 seviyesinin yapay olarak artırılması ile klorprifos ve diazinon gibi bazı organofosfatların toksik etkilerini azaltmanın mümkün olduğu gösterilmiş, ancak bu uygulamanın paration maruziyetine karşı etkili olmadığı görülmüştür. Her ne kadar paraoksonu hidrolizleyen enzim olarak tanınsa da, PON1'in paraoksonaz aktivitesi nispeten zayıftır. Organofosfat maruziyetine karşı koruyucu olarak kullanılabilmesi için PON1'in katalitik verimi artırılmalı ve yeterli miktarda elde edilebilmelidir. Son yıllarda protein mühendisliği yöntemleri kullanılarak PON1'in bazı amino asitlerinde değişiklikler yapılmış, bu PON1 varyantları bakteriyel sistemlerde yeterli seviyelerde ifade edilmiş ve bazı organofosfatlara karşı enzim aktivitesinde artışlar sağlanmıştır. Bu derlemede, öncelikle organofosfatların genel özelliklerine, etki mekanizmalarına ve zehirlenmelere değinilmiş, ardından PON1'in organofosfat metabolizmasındaki rolüne ve organofosfat zehirlenmelerinde antidot olarak kullanılabilmesine yönelik araştırmalardaki son gelişmeler üzerinde durulmuştur.

Anahtar Sözcükler: Antidot, insektisit, organofosfat, paraoksonaz, pestisit, PON1, zehirlenme

ABSTRACT

According to data from the World Health Organization, nearly 3 million pesticide poisonings occur per year worldwide; 220,000 of these poisonings result in death. Organophosphates, one of the most frequently used pesticides in recent years, are chemicals that effect the nervous system. Organophosphates lead to neurotoxicity by suppressing the enzyme acetylcholinesterase. Paraoxonase 1 (PON 1; EC 3.1.8.1) is a calcium dependent glycoprotein enzyme that is found on the high density lipoprotein (HDL) in serum. Although PON1 activity has been detected in several organs of mammals, paraoxonase activity is close to zero in birds, fish and insects. Among the chemicals that are hydrolyzed by PON1; the toxic oxon metabolites of organophosphate insecticides, which are the active forms, such as parathion, diazinon and chlorpyrifos; nerve gases such as sarin and soman; aromatic esters such as phenyl acetate; several aromatic and aliphatic lactones such as homogentisic acid lactone, dihydrocoumarin and homocysteine thiolactone and cyclic carbonates are included. Earlier studies on the toxicology of organophosphate pesticides revealed that having low serum PON1 activity increases the sensitivity to the acute effects of organophosphate compounds. Following determination of the sequence of the gene encoding PON1, identification of polymorphisms that lead to differences among people in the activity and level of expression of the enzyme, led to the idea that people with low PON1 activity may be more sensitive to organophosphate poisoning. In studies carried out in recent years, it was shown that injection of purified PON1 to animals that are exposed to organophosphate pesticides, and thus increasing serum PON1 levels artificially, it was possible to reduce the toxic effects of certain organophosphates like chlorpyrifos and diazinon; but this application was observed to be ineffective against parathion exposure. Even though recognized as the enzyme that hydrolyzes paraoxon, paraoxonase activity of PON1 is a bit weak. In studies carried out in recent years, it was observed that injection of purified PON1 protects against chlorpyrifos and diazinon but was not effective against parathion exposure. In order to be used as a prophylactic agent against organophosphate exposure, PON1's catalytic efficiency has to be increased and the enzyme has to be obtained in adequate amounts. In recent years, using protein engineering methods, changes were made to some amino acids of PON1, these PON1 variants were expressed in bacterial systems at sufficient levels and increase in enzyme activity against some organophosphates were obtained. In this review, first, general aspects of organophosphates, action mechanism and poisonings are addressed; then, the role of PON1 in organophosphate metabolism and recent advances in the research intended for improving PON1 so that it can be used as an antidote in organophosphate poisonings are emphasized.

Key Words: Antidote, insecticide, organophosphate, paraoxonase, pesticide, PON1, poisoning

GİRİŞ

Pestisitler, tüm akut zehirlenme etkenleri arasında ilaçlardan sonra ikinci sırada gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 1985 yılı verilerine göre tüm dünyada yılda 3 milyona yakın pestisit zehirlenmesi meydana gelmekte, bunların 220.000'i ölümlü sonuçlanmaktadır (1,2). Bir tarım ülkesi olan Türkiye'de 2008 yılında Ulusal Zehir Merkezi'ne bildirilen 77.988 zehirlenme vakasının 6.503'ü (%8, 34) pestisit kaynaklıdır (3). Dünyadaki pestisit kullanımının %20'sinin gerçekleştiği Amerika Birleşik Devletleri'nde 1988 yılında 64 zehirlenme merkezine yapılan 1.368.748 başvurunun 56.674'ünün (%4, 1) pestisitlere bağlı olduğu bildirilmiştir (4, 5). Ölümcül pestisit zehirlenmeleri özellikle gelişmekte olan

ülkelerde ciddi bir sağlık sorunudur. 1982 yılında, 12 milyon nüfuslu bir ülke olan Sri Lanka'da yapılan bir araştırma, bu ülkede yılda 10.000 kişinin akut pestisit zehirlenmesi şüphesiyle hastanelere başvurduğunu ve bunlardan 1.000 kişinin öldüğünü ortaya koymuştur. Akut pestisit zehirlenmesinden dolayı meydana gelen ölümlerin, aynı yıl sıtma, çocuk felci, boğmaca, difteri ve tetanozdan kaynaklanan toplam ölümlerin iki katı olması, akut pestisit zehirlenmelerinin halk sağlığı açısından önemini ortaya koymaktadır (6,7).

Bu derlemede, öncelikle organofosfatlı pestisitlerin genel özellikleri, etki mekanizmaları,

detoksifikasyonları ve organofosfat zehirlenmelerinin tedavisine değinilecek, daha sonra paraoksonaz 1 (PON1) enziminin organofosfat metabolizmasındaki rolü ve PON1'in organofosfat zehirlenmelerinde antidot olarak kullanımı üzerinde durulacaktır.

1. ORGANOFOSFATLI PESTİSİT ZEHİRLENMELERİ

1.1 Organofosfatlı Pestisitler

Başlıca pestisit grupları organofosfatlar, karbamatlar, organoklorlular ve piretroidlerdir. Organofosfatlar, fosfor içeren asitlerin ester, tiol ester veya anhidrit türevleri olup tarımda, evlerde, bahçelerde ve veterinerlikte kullanılmaktadır. Organofosfatlara örnek olarak malation, paration, diazinon, forat, terbufos, fentiyon ve klorprifos gibi insektisitler; soman, sarin ve tabun gibi sinir gazları; göz tedavisinde kullanılan ekotiofat ve izoflurofat ile parazitlere karşı kullanılan triklorfon sayılabilir. Organofosfatlar sinir sistemi üzerinde etki gösteren kimyasallardır (8).

Organofosfatlı pestisitler ilk olarak 1800'lerde sentezlenmiş ve 1930'larda kolinerjik etkileri tanımlanarak böcek öldürücü özellikleri keşfedilmiştir. Kısa bir süre sonra da kimyasal savaş ajanı olarak kullanılacakları ortaya çıkmıştır. G-serisi silahlar olarak bilinen sarin, soman ve tabun II. Dünya Savaşı yıllarında geliştirilmiş, ancak savaşta kullanılmamıştır. II. Dünya Savaşı'ndan sonra organofosfatlı pestisitlerin büyük ölçekli üretimine başlanmıştır. İlk olarak piyasaya sürülen organofosfatlı böcek öldürücü parationdur.

Organofosfatlar son derece zehirli olmalarına rağmen genellikle çevrede kalıcı değildir; güneş ışığı, hava ve toprakla temas ettiklerinde hidroliz olarak parçalanırlar. Bu özellikleri sayesinde organofosfatlar DDT, aldrin ve dieldrin gibi kalıcı organoklorlu pestisitler yerine alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Organofosfatlı pestisitlerin popülaritesi organoklorlu pestisitlerin 1970'lerde yasaklanmasından sonra artmıştır. Ne var ki,

organofosfatlılar organoklorlulara göre daha hızlı parçalansalar da, akut toksisiteyi daha yüksektir (9).

1.2 Organofosfatlı Pestisit Zehirlenmeleri

Pestisit zehirlenmelerinde organofosfatlı pestisitler ilk sırada gelmektedir. Ülkemizde 2008 yılında Ulusal Zehir Merkezi'ne yapılan pestisit zehirlenmesi başvurularının arasında en fazla (%47.66) zehirlenmeye yol açan grup insektisitlerdir. İnsektisit kaynaklı zehirlenmelerin %20,98'ini organik fosforlu insektisitler oluşturmuştur (3). Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne 01.01.2004-31.12.2004 tarihleri arasında başvuran pestisit zehirlenmesi olgularının %41,7'si organik fosforlu pestisitler ile zehirlenmiştir (10). Organofosfatlı bileşikler ile oluşan zehirlenmeler diğer ülkelerde de yaygındır. Amerika Birleşik Devletleri'nde pestisit zehirlenmesi vakalarının %33'ünü organofosfatlar ve karbamatların oluşturduğu bildirilmiştir (5). Sri Lanka'da pestisit zehirlenmelerinin %31'inin organofosfatlı insektisitler ile meydana geldiği (11), Japonya'da olguların en fazla (%36) organofosfatlı insektisitler ile zehirlendiği belirtilmiştir (12). İran'da akut pestisit zehirlenmelerinin yarısından fazlasının (%57) organofosfatlı pestisit kaynaklı olduğu görülmüştür (13). Pestisit zehirlenmelerinin boyutu değerlendirilirken akut pestisit zehirlenmesi rakamlarının hastane verilerinden elde edildiği ve zehirlenme semptomlarının spesifik olmamasından dolayı, ancak ciddi zehirlenme durumlarında hastaneye başvuru yapıldığının unutulmaması gerektiği vurgulanmıştır (14).

Yetişkinlerde pestisitler ile zehirlenme sebepleri arasında ilk sırada özkıyım gelmektedir. Mesleki maruziyet ve kaza ile alımlar da olmaktadır. Zehirlenmelerin bir kısmı da organofosfatlar grubunda yer alan sinir gazlarının kimyasal savaş ajanı olarak kullanıldığı terörist saldırılar sonucu gerçekleşmektedir. 1994'te terörist bir örgüt tarafından Japonya'da düzenlenen sarin gazı saldırısında 7 kişi ölmüş, 500 kişi yaralanmıştır.

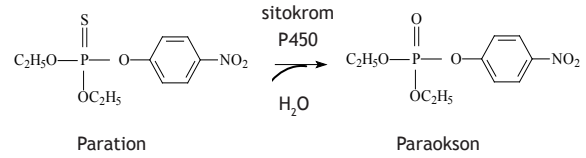
1995'te ise Tokyo metrosunda düzenlenen benzer saldırıda 12 kişi hayatını kaybetmiş, 1.000 kişi hastaneye kaldırılmıştır (15).

1.3 Organofosfatların Etki Mekanizması ve Detoksifikasyonu

Organofosfatların etki mekanizması asetilkolinesteraz enziminin baskılanmasına dayanır. Bir nörotransmitter olan asetilkolini, kolin ve asetik asite parçalayan asetilkolinesteraz, merkezi ve periferik sinir sisteminde, nöromusküler kavşaklarda ve eritrositlerde bulunmaktadır (16). Sinir sinyallerinin sinir liflerinden düz kaslara ve iskelet kaslarına, salgı bezlerine ve otonom sinir düğümlerine, aynı zamanda merkezi sinir sistemi içerisinde iletilmesinin düzgün işleminde asetilkolinesteraz enziminin kritik bir görevi vardır (17). Organofosfatlar, asetilkolinesteraz enzimini, aktif bölgesindeki serin aminoasitinin hidroksil grubunu fosforlayarak inaktif hale getirirler. Asetilkolinesteraz enzimi baskılandığında, sinir sisteminde asetilkolin birikmeye başlar ve bunun sonucunda muskarinik ve nikotinik reseptörler aşırı uyarılır. Bu duruma “kolinerjik sendrom” denir (16). Kolinerjik sinir kavşaklarında asetilkolin miktarının artması, düz kasların kasılmasına ve salgı bezlerinin salgı yapmasına sebep olur. İskelet kası kavşaklarında aşırı miktarda birikmiş asetilkolin uyarıcı olabileceği gibi, hücreyi paralyze de edebilir. Merkezi sinir sisteminde yüksek miktardaki asetilkolin, duyuşsal ve davranışsal bozukluklara, koordinasyon bozukluğuna, motor fonksiyonların baskılanmasına ve solunum yetmezliğine yol açar. Solunum bozukluğuna eşlik eden artmış akciğer salgıları, organofosfat zehirlenmelerinde görülen ölümlerin en sık karşılaşılan nedenidir (17).

Birçok organofosfatlı pestisitinin yapısında fosfora çift bağlı sülfür atomu vardır. Toksik hale gelmeleri için metabolik aktivasyon ile oksonlara dönüşmeleri, yani yapılarındaki P=S grubunun P=O grubuna dönüşmesi gerekir. Çünkü, yalnızca yapısında P=O grubu bulunan organofosfatlı

bileşikler asetilkolinesterazı baskılayabilir. “Oksidatif desülfürasyon” olarak adlandırılan ve karaciğerde mikrozomal sitokrom P450 enzimleri tarafından katalizlenen bu biyotransformasyon reaksiyonu sonucunda organofosfatlı pestisitler toksik hale gelirler (Şekil 1) (18-20).



Şekil 1. Parationun karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından paraoksone biyotransformasyon reaksiyonu (20).

Sitokrom P450 enzimlerinin aktivitesi genetik polimorfizmler, enzim inhibitörleri ve uyarıcıları gibi nedenlerle kişiler arasında değişkenlik gösterdiğinden dolayı organofosfatların metabolik aktivasyon hızı da kişiler arasında farklılık gösterir. Öte yandan, sinir gazlarının (sarin, soman, tabun) yapılarında P=O grubu bulunduğu için, toksik etki göstermeleri için oksidatif desülfürasyona gerek yoktur. Bu sebeple, bu kimyasallar asetilkolinesteraza direk bağlanabilir ve dakikalar içinde etki gösterirler. Dolayısı ile sinir gazlarının toksisitesinde metabolik aktivasyon hızındaki farklılıkların rolü yoktur (14).

Organofosfatların detoksifikasyonu, plazmada paraoksonaz (PON1) gibi A-esterazlar tarafından katalizlenen hidroliz reaksiyonu ve asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz ve karboksilesteraz gibi B-esterazlara stokiometrik bağlanma reaksiyonlarını içermektedir (14). Çoğu organofosfatlı pestisit kimyasal yapıları gereği yağda çözünen bileşiklerdir. Organofosfatlar yutma ve solunum yoluyla vücuda girebildiği gibi, deri yoluyla da emilebilir. Zehirlenme semptomlarının ortaya çıkma hızı ve ciddiyeti, maruz kalınan organofosfatın kimyasal yapısı, miktarı ve maruziyet şeklinin yanısıra, metabolik aktivasyonun ve yıkımın hızı gibi birçok faktöre bağlıdır (17).

1.4 Organofosfat Zehirlenmelerinin Tedavisi

Organofosfatlı bileşikler ile zehirlenmelerin tedavisi, dekontaminasyon, absorpsiyonun engellenmesi, genel destek ve yoğun solunum desteği tedavilerinin yanı sıra belirgin zehirlenmelerde farmakolojik müdahale için atropin ve oksimlerin kullanımını içerir.

Atropin, asetilkolinin muskarinik reseptörlerdeki kompetitif antagonistidir ve muskarinik sinapslarda artmış asetilkoline bağlı olarak ortaya çıkan kolinerjik semptomların geri çevrilmesinde oldukça etkilidir. Oksimler, tedavide kullanılan diğer önemli ilaç grubudur. Asetilkolinesteraz enzimini inaktif hale getiren fosfat grubunu enzimin yapısından uzaklaştırarak etki gösterirler. Ancak, oksimlerin asetilkolinesterazı yeniden aktif hale getirebilmesi için, enzime bağlanan organofosfat yaşlanma reaksiyonuna girmeden, ilk 24-48 saat içerisinde uygulanması gerekir (17).

Bu tedavilerin bazı yan etkileri olduğu da bildirilmiştir (21). Ayrıca, organofosfatlı pestisitlerin kimyasal savaş ajanı olarak kullanılması durumunda bu tip tedavilerin yetersiz kalacağıyla ilgili endişeler de vardır (22). Bu sebeplerle araştırmacılar direk olarak organofosfatları detoksifiye edebilecek bazı proteinleri araştırmaya başlamış, bütirikolinesteraz gibi bazı enzimlerin organofosfat zehirlenmelerinde fayda sağladığı görülmüştür (23, 24). Ancak bu gibi enzimlerin stokiyometrik olarak çalışmaları, yani bir protein molekülünün sadece bir organofosfat molekülünü devre dışı bırakabilmesi ve zehirlenme durumunda çok miktarda enzime ihtiyaç duyulması, kullanımlarını kısıtlamıştır (25). Katalitik olarak çalışan enzimler ise daha verimli terapötik ajanlardır; bir molekül enzim binlerce organofosfat molekülünü etkisizleştirebilir. Bu tür tedaviler yalnızca kasıtlı zehirlenme durumlarında ve büyük ölçekli kimyasal terörist saldırılarda değil, kazaen gerçekleşen insektisit zehirlenmelerinin tedavisinde de kullanılabilir (26).

2. SERUM PARAOKSONAZ 1 ENZİMİNİN ORGANOFOSFATLI PESTİSİT ZEHİRLENMELE- RİNDEKİ ROLÜ

İnsan serum paraoksonaz enzimi (PON1), organofosfat yapısındaki birçok pestisiti hidrolizleme özelliğinden dolayı, organofosfat zehirlenmelerinde kullanılmak üzere terapötik katalitik ajan olarak geliştirilmeye aday bir enzimdir (19). Bu derlemenin ikinci kısmında PON1 enziminin genel özellikleri, organofosfatlı pestisitlerin toksisitesindeki rolü ve organofosfat zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılabilmesi için yapılan çalışmalar ele alınmaktadır.

2.1 Serum Paraoksonaz 1 Enziminin (PON1) Genel Özellikleri

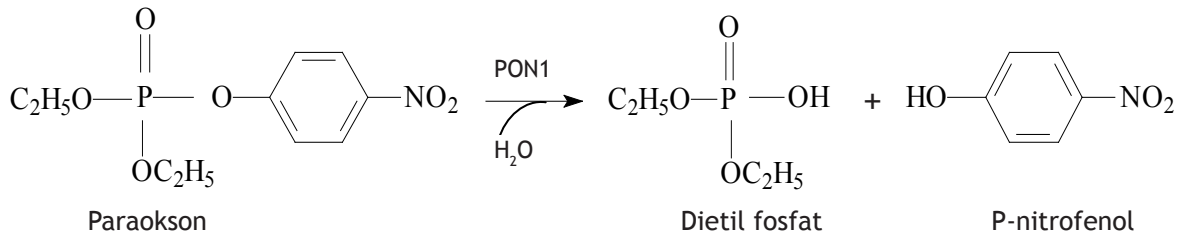
Paraoksonaz 1 (PON 1; EC 3.1.8.1) serumda yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) üzerinde yer alan, organofosfatlı pestisitlerin toksik okson metabolitlerini, bazı karbamatları, aromatik ve alifatik laktonları, aromatik esterleri ve okside lipidleri hidrolizleyen, kalsiyuma bağımlı glikoprotein yapısında bir enzimdir (19). Moleküler ağırlığı 43-45 kDa olan insan PON1, çoğunlukla karaciğerde 355 amino asitten oluşan bir protein olarak sentezlenir (27, 28). Karaciğerden kana salgılanması sırasında amino ucundan sadece metiyonin amino asiti uzaklaştırılır; amino ucunun geri kalanı PON1'in HDL'ye bağlanması için gereklidir (29). Kanda tamamen HDL'ye bağlı olarak bulunan PON1, insan kanında litrede 50 mg kadar bulunur (29, 30). En yüksek aktivitenin belirlendiği kan dışında karaciğer, böbrek, bağırsak, beyin gibi dokularda da PON1'e rastlanmıştır. Memelilerin birçok organında PON1 aktivitesi tespit edilmesine karşın, kuşlar, balıklar ve böceklerde paraoksonaz aktivitesi sifıra yakındır (31). İnsan PON1 geninin sekansı belirlenmiş ve 7. kromozomun uzun kolunda q21.3 ile q22.1 arasında bulunduğu bildirilmiştir (32).

2.2 PON1'in Substratları

PON1 enzimi adını laboratuvarında en sık kullanılan substratı olan paraoksondan almıştır (Şekil 2). Aslında PON1 bazı sentetik substratlara karşı çok usta bir esteraz olmasına rağmen, paraoksonaz aktivitesi biraz zayıftır. Dolayısı ile paraoksonaz enziminin adı, tarihsel bir addır. PON1 çok geniş substrat yelpazesi olan bir hidrolazdır (Tablo 1). PON1'in hidrolize ettiği substratlar arasında paration, diazinon ve klorprifos gibi organofosfatlı insektisitlerin toksik okson metabolitleri; sarin, soman ve tabun gibi sinir gazları; fenil asetat gibi aromatik esterler; homogentisik asit lakton, dihidrokumarin, γ -butirolakton ve homosistein tiolakton gibi birçok aromatik ve alifatik lakton ile siklik karbonatlar yer almaktadır (Şekil 3).

Tablo 1. İnsan PON1 enziminin substratları (31)

Organofosfatlı bileşiklerin okson metabolitleri	Aril (aromatik) esterler
paraokson	fenil asetat
metil paraokson	tiofenilasetat
pirimifos-metil okson	2-naftilasetat
klorprifos okson	
diazokson	Aromatik laktonlar
klortion okson	Alifatik laktonlar
EPN okson	dihidrokarumarin
fenitroksion	γ -butirolakton
	homosistein tiolakton
Sinir Gazları	
soman	Siklik karbonatlar
sarin	prulifloksasin
tabun	
armin	Fosfolipit hidroperoksitler

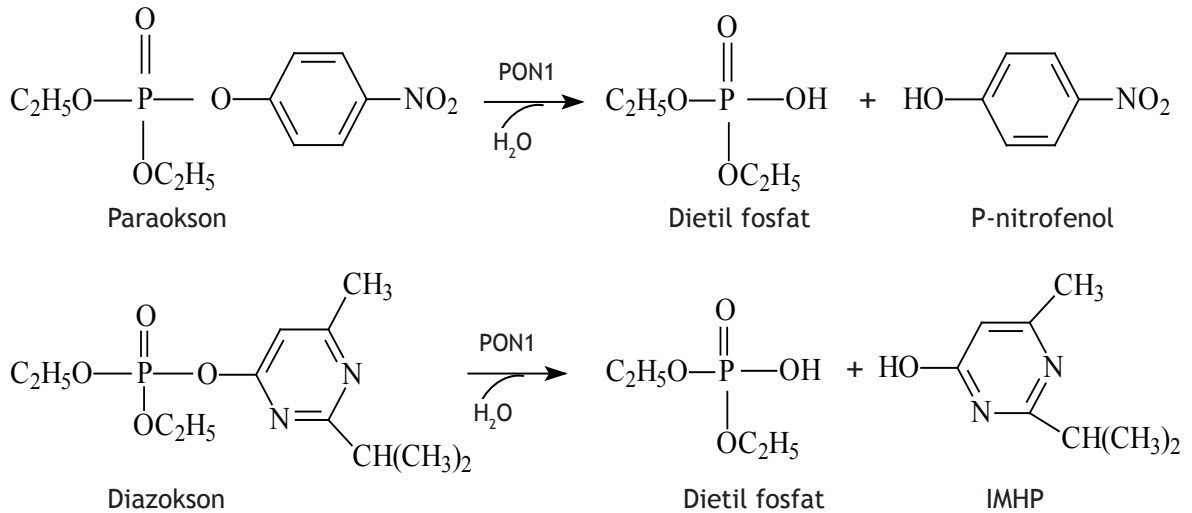


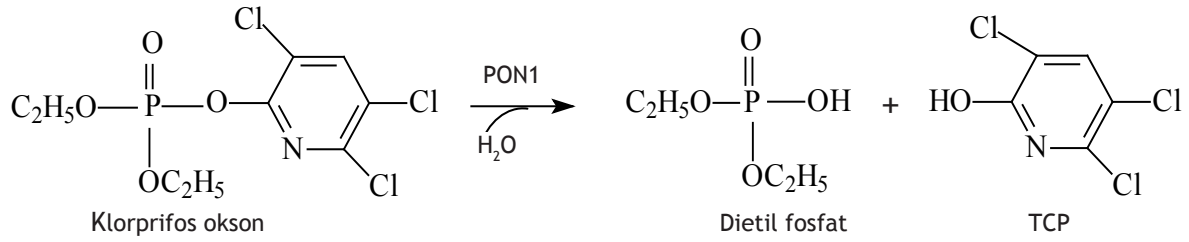
Şekil 2. Paraoksonun PON1 tarafından p-nitrofenol ve dietil fosfata hidroliz reaksiyonu (31).

Şekil 3. İnsan PON1 enziminin aktivite ve örnek substratları (31, 34).

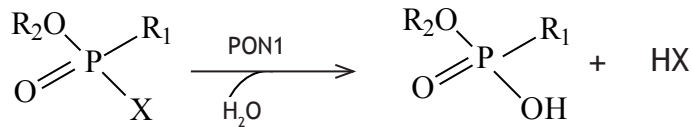
IMHP : 2-izopropil-4-metil-6-hidroksi pirimidin, TCP : 3,5,6-trikloro-2-piridinol

a) Organofosfatlı bileşiklerin toksik okson metabolitlerinin hidrolizi



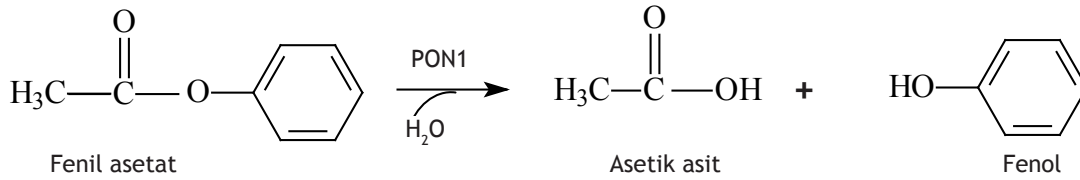


b) Sinir gazlarının hidrolizi

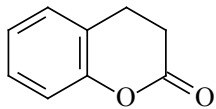
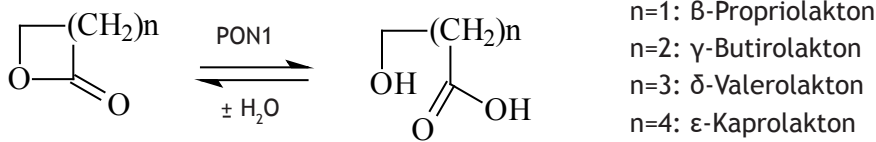


$\text{R}_1=\text{N}(\text{CH}_3)_2$ $\text{R}_2=\text{CH}_2\text{CH}_3$ $\text{X}=\text{CN}$ Etil N-dimetil fosforoamidosiyanidat (Tabun)
 $\text{R}_1=\text{CH}_3$ $\text{R}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ $\text{X}=\text{F}$ İzopropil metilfosfonofloridat (Sarin)
 $\text{R}_1=\text{CH}_3$ $\text{R}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$ $\text{X}=\text{F}$ Pinakolil metilfosfonofloridat (Soman)

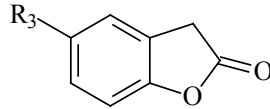
c) Aromatik esterlerin hidrolizi



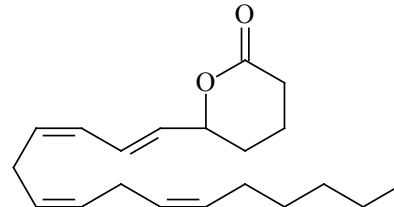
d) Laktonların hidrolizi ve hidroksi asitlerin laktonlara dönüştürülmesi



Dihidroksimarın



$\text{R}_3=\text{H}$ 2-Kumaronon
 $\text{R}_3=\text{OH}$ Homogentisik asit lakton



5-HETE lakton

PON1 laktonları hidrolize ettiği gibi bu reaksiyonun tersini de, yani γ ve δ -hidroksikarboksilik asitlerin laktonizasyonunu da katalizler. PON1 doymamış siklik karbonat ön-ilaç olan prulifloksasin'i aktif kuinolon antibiyotik NM394'e dönüştürür (33, 34).

PON1 aynı zamanda fosfolipit hidroperoksitleri hidrolizleyerek LDL ve HDL'yi oksidatif değişimlere karşı korumasıyla da tanınmaktadır (35). Bilindiği gibi okside olmuş LDL aterosjeniktir (36). PON1'in aterosklerozun oluşumunu ve ilerlemesini engellediğini ortaya koyan birçok çalışma yapılmıştır (37, 38). Ateroskleroz, koroner kalp hastalığı, kalp krizi, beyin damar hastalıkları ve inme gibi ciddi hastalıklara neden olduğu için büyük önem taşımaktadır. Bundan dolayı son yıllarda, insanlarda görülen oksidatif stres kaynaklı birçok hastalıkta PON1'in enzim aktivitesinin ölçümü ve PON1'i kodlayan gende bulunan polimorfizmlerin tespit edilmesi, popüler araştırma konuları olmuştur (39-42).

2.3 PON1'in Organofosfatlı Bileşiklerin Seçici Toksisitesindeki Rolü

PON1'in organofosfatlı bileşiklerin toksisitesindeki rolü ile ilgili kanıtlar türler arası karşılaştırmalardan, saflaştırılmış PON1 enzimi kullanılan hayvan çalışmalarından ve PON1 geni susturulmuş (knockout) farelerden gelmektedir. İlk yapılan çalışmalar, organofosfatlı pestisitlere karşı son derece hassas olan kuşların çok düşük serum PON1 aktivitesine sahip olduklarını göstermiştir (43, 44). Sıçanlar organofosfatlı pestisitlere karşı kuşlardan daha dayanıklıdır. Serum PON1 aktivitesi sıçanlardan 7 kat yüksek olan tavşanlar da sıçanlara göre daha dayanıklıdır (43). Bu ilk çalışmalar, düşük serum PON1 aktivitesine sahip olmanın organofosfatlı bileşiklerin akut etkilerine karşı duyarlılığı arttırdığını ortaya koymuştur (19).

PON1'in organofosfat zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılmaya uygun bir enzim olabileceği düşüncesiyle yapılan ilk çalışmalarda tavşan veya insan serumundan izole edilip saflaştırılmış PON1'in

sıçan ve farelere organofosfat maruziyetinin öncesinde veya sonrasında enjekte edilmesi ve sonuçlarının gözlenmesi yolu izlenmiştir (45-52). 1956 yılında yaptığı öncü çalışmasında Main, tavşan serumundan kısmen saflaştırılmış PON1 enzimini sıçanlara enjekte etmiş ve paraoksonun akut toksisitesinde belirgin bir düşüş gözlemiştir (45). Costa ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada ise tavşan serumundan saflaştırılıp sıçanlara intravenöz yolla enjekte edilen PON1 enziminin, sıçanların serum PON1 aktivitesini paraoksona karşı 9 kat, klorprifos oksona karşı 50 kat arttırdığı görülmüştür. Bu sıçanların organik fosforlu bileşiklerin herhangi birine maruz bırakılmasının ardından değişik dokulardaki asetilkolinesteraz baskılanmasının düzeyi ölçülmüş, enjekte edilen PON1'in, özellikle klorprifos oksona karşı sıçanların direncini arttırdığı gözlenmiştir. Bu korumanın beyin ve diyafram dokularında daha belirgin olduğu ve organofosfatlı bileşiklerle temas cilt yoluyla gerçekleştiğinde de etkili olduğu bildirilmiştir (46). Farelerle yapılan deneylerde de benzer sonuçlar elde edilmiştir (47). Enjekte edilen ekzojen PON1'in, klorprifos oksonun yanı sıra, insektisit olarak kullanılan klorprifosa karşı da koruma sağladığı görülmüştür. Üstelik, PON1 enjeksiyonunun, organofosfat maruziyetinin öncesinde yapıldığında zehirlenmeyi engellediği gibi, maruziyetten sonra (3 saate kadar) yapıldığında da koruma sağladığı gösterilmiştir (48). 2001 yılında adenoviral bir vektörden ifade edilen insan PON1, farelerde serum paraoksonaz aktivitesini %60 arttırmış ve fareleri klorprifosun toksisitesine karşı korumuştur (49). Yapılan bu çalışmalar, serum PON1 seviyesini yapay olarak arttırarak bazı organofosfatların toksik etkilerini azaltmanın mümkün olduğunu göstermiştir.

PON1'in organofosfatların toksikolojisindeki rolünü pekiştiren bulgular, PON1 geni susturulmuş farelerle yapılan çalışmalardan gelmektedir. Bu farelerin serum ve karaciğerlerinde paraokson ve diazoksona karşı hidrolitik aktivite yoktur, ancak klorprifos oksona karşı çok az hidrolitik aktivite gösterirler. PON1 geni susturulmuş farelerin yabani tip

farelere göre klorprifos ve diazinona karşı daha hassas oldukları; bu pestisitlerin aktif okson formları olan klorprifos okson ve diazoksone karşı hassasiyetlerinin ise son derece artmış olduğu görülmüştür. Paraoksonla yapılan çalışmalardan ise şaşırtıcı bir sonuç elde edilmiştir. PON1 geni susturulmuş farelerin plazma ve karaciğerlerinde hiç paraoksonaz aktivitesi bulunmamasına rağmen, yabancı tip farelere göre paraoksone karşı hassasiyetlerinin artmadığı görülmüştür. Öte yandan, PON1 geni susturulmuş bu farelere saflaştırılmış insan PON1 enzimi enjekte edildiğinde, plazmadaki PON1 seviyesinin eski durumuna geldiği ve bu enjeksiyonun diazoksone ve klorprifos oksona karşı direnci arttırdığı görülmüştür. Ancak, bu uygulama paraokson maruziyetine karşı koruma sağlamamıştır. Saflaştırılmış insan PON1 enzimi ile yapılan kinetik çalışmalarda, bu enzimin paraoksonu, diazokson veya klorprifos okson kadar verimli hidrolizleyemediği belirlenmiştir (50). Bu bulgu, düşük konsantrasyonlarda paraoksonun hidrolizinden sitokrom P450 ve karboksilesterazlar gibi başka enzimlerin sorumlu olabileceği düşüncesini pekiştirmiştir (51). PON1'in bir organofosfatlı pestisite karşı koruma sağlayıp sağlamayacağını belirlemede, katalitik verimin son derece önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Özetle, bu hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlar, PON1'in bazı organofosfatların toksisitesinde kritik bir rol oynadığını ve plazmada PON1 seviyesini arttırarak organofosfat zehirlenmelerine karşı koruma sağlanabileceğini ortaya koymuştur (52).

Ancak, insanlar arasında serum PON1 aktivitesinde 40 kata kadar farklılık görülmesinden dolayı bu enzimin insan vücudunda organofosfat metabolizmasına ne derece katkıda bulunduğunu belirlemek kolay değildir (44). Enzim aktivitesinde görülen bu değişkenlik büyük oranda PON1 enzimi kodlayan gende bulunan nükleotit farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Toplumda görülme sıklığı en az %1 olan bu farklılıklara polimorfizm denmektedir. PON1 geninde enzimin katalitik yeteneğini etkileyen kodlayan bölge polimorfizmlerinin ve

enzimin ifade edilme seviyesini etkileyen promotor bölge polimorfizmlerinin bulunması, bazı kişilerin organofosfat toksisitesine karşı diğerlerinden daha hassas olabileceği düşüncesini doğurmuştur (52). PON1'in genetik polimorfizmlerinin organofosfatların toksisitesi üzerindeki etkisi bir sonraki bölümde detaylı bir şekilde anlatılmaktadır. Genetik polimorfizmler dışında serum PON1 aktivitesini etkileyen faktörler arasında yaş (53), gebelik (54), kalp damar hastalıkları (55, 56), beyin damar hastalıkları (57), diyabet (58), ailesel hiperkolesterolemi (59), böbrek hastalığı (60), romatid artirit (61), karaciğer sirozu (62), Alzheimer (63), hipertiroidi (64), astım (65), beslenme (66, 67), sigara (68), alkol alışkanlıkları (69), çevresel kirleticiler ve ilaçlar yer almaktadır (70). Bu faktörlerin, organofosfat maruziyetine karşı görülen tepkilerin insandan insana değişmesine yol açması son derece olağandır. Örneğin, organofosfatlı bileşiklerin akut toksisitesi yaşla değişim gösterir; genç hayvanların organofosfat zehirlenmelerine karşı daha hassas olduğu görülmüştür (71). Buna paralel olarak insanlarda yapılan çalışmalar, PON1 aktivitesinin doğumdan hemen sonra düşük olduğunu ve zamanla arttığını ortaya koymuştur (53, 72). Yaşlılıkla beraber PON1 aktivitesinde düşüş gözlenmektedir (73).

2.4 PON1'in Genetik Polimorfizmleri

PON1 enzimiyle ilgili yapılan ilk çalışmalarda insanların serum PON1 aktivitesi ölçüldüğünde, paraoksonaz aktivitesi yönünden kişilerin, yüksek, orta ve düşük aktivite gösterenler olmak üzere üç grupta toplandığı ortaya çıkmıştır (74). İlerleyen yıllarda PON1 geninin sekansı belirlendiğinde genin kodlayan bölgesinde iki tane polimorfizm tespit edilmiştir. Bu polimorfizmlerden ilki (192Q/R) enzimin sentezlenmesi sırasında 192. amino asit olarak glutamin (Q) yerine arjinin (R) eklenmesine neden olur (32). Bu polimorfizm enzimin katalitik aktivitesini bazı substratlara karşı ciddi şekilde etkilemektedir. Yapılan ilk çalışmalarda 192R izoformunun paraoksonu 192Q izoformundan 6 kat daha hızlı hidrolizlediği belirlenmiştir. Diazokson, sarin ve soman hidrolizi

yönünden ise tam tersi bir durum gözlenmiştir: 192Q izoformu diazokson, sarin ve somanı 192R izoformundan daha iyi hidrolizlemektedir. Klorprifos okson ve fenil asetat gibi bir grup substrat için ise PON1 192Q ve 192R izoformlarının hidroliz hızının aynı olduğu görülmüştür (75). Ancak, enzim aktivitesi ölçümleri fizyolojik koşullarda, ortamda daha az NaCl kullanılarak yapıldığında, 192R ve 192Q izoformlarının diazoksonu aynı hızda hidrolize ettiği ve 192R izoformunun klorprifos okson hidroliz hızının 192Q izoformundan daha yüksek olduğu görülmüştür (50). PON1 geninin kodlayan bölgesinde tespit edilmiş olan diğer polimorfizm (55L/M) ise enzimin 55. amino asitinde lösinden (L) metiyonine (M) değişime yol açar (32). Enzimin 55. pozisyonunda metiyonin taşıyan bireylerin (55M), 55L izoformunu taşıyanlardan daha düşük PON1 aktivitesine sahip oldukları gözlenmiştir. Ancak bu polimorfizmin enzimin katalitik aktivitesini direk etkilemediği, plazmada bulunan enzim seviyesi ile ilişkili olduğu için aktiviteyi dolaylı olarak etkilediği ortaya çıkmıştır (76). PON1 geninin promotör bölgesinde de çok sayıda genetik farklılıklar belirlenmiştir (77). Promotör bölge polimorfizmlerinden -107T/C, PON1 ifade seviyesindeki farklılıkların %22,4'ünden sorumlu olması nedeniyle, en önemlisidir. -107T alelini taşıyan bireylerin serum PON1 seviyeleri düşüktür (78).

2.5 PON1'in Genetik Polimorfizmlerinin Organofosfatların Toksikitesine Etkisi

PON1'in 192Q ve 192R izoformlarının laboratuvar ortamında (in-vitro) çeşitli organofosfat substratları hidrolizleme hızlarında tespit edilen farklılıklar, rodentlerle yapılan in-vivo deneylerde de görülmüştür. PON1 geni susturulmuş farelere enjekte edildiğinde, 192R formundaki PON1, plazmadaki klorprifos oksonaz aktivitesini 192Q izoformuna göre 1,7 kat daha fazla arttırmış ve klorprifos okson toksisitesine karşı 192Q formundaki enzimden daha fazla koruma sağlamıştır. Diazokson toksisitesine karşı ise PON1'in her iki izoformu da benzer seviyede

koruma sağlamıştır. Ancak, paraoksona karşı ne 192R ne de 192Q izoformu koruma sağlayabilmiştir. PON1 192R izoformu paraoksonu 192Q izoformundan 6 kat daha verimli hidrolizlemesine rağmen, saflaştırılmış enzimlerle yapılan in-vitro kinetik çalışmalar, her iki izoformun da paraokson hidrolizi için ölçülen katalitik veriminin, diazokson ve klorprifos okson hidrolizi için belirlenen verimden düşük olduğunu ortaya koymuştur. Ölçülen bu katalitik verim, PON1'in vücudu paraokson maruziyetinden korumasına yetmeyecek derecede düşüktür (50) ve paraoksonun detoksifiye edilmesinden PON1 dışındaki bazı metabolik enzimlerin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (51). Daha sonraki yıllarda transgenik farelerle yapılan deneyler, elde edilmiş olan bu sonuçları desteklemiştir. Örneğin, insan PON1 enziminin 192R izoformunu ifade eden, ancak kendi PON1 geni susturulmuş fareler, insan PON1 192Q izoformunu ifade eden farelere göre klorprifos okson toksisitesine karşı daha dayanıklıdır (79).

Hayvanlarla yapılan bu çalışmalar göstermiştir ki, PON1'in organofosfat metabolizmasındaki rolü organofosfatın yapısına göre değişmektedir. Paraokson söz konusu olduğunda PON1'in belirgin bir koruyucu etkisi yoktur. Diazokson maruziyetinde zehirlenme mi korunma mı olacağını belirleyen en önemli etken PON1'in ifade edilme seviyesidir; 192Q/R genotipleri etkisizdir. Klorprifos oksonda ise hem enzimin ifade edilme seviyesi, hem de 192Q/R genotipleri hassasiyeti etkilemektedir (80).

2.6 PON1 Polimorfizmlerinin Klinik Etkileri

PON1'in genetik polimorfizmlerinin enzim aktivitesini etkilediğinin gözlenmesi ve bazı insanların PON1 aktivitesinin düşük olması, bu kişilerin organofosfat zehirlenmelerine karşı daha hassas olabileceği düşüncesini doğurmuştur (52). Ancak, hassasiyeti belirlemede enzim aktivitesini etkileyen PON1 genotipleri (enzimin kalitesi) kadar PON1'in serumdaki seviyesi (enzimin miktarı) de önem taşımaktadır.

1995'te Tokyo metrosunda düzenlenen sarin gazı saldırısında 12 kişi hayatını kaybetmiştir (15). Sarin PON1 tarafından metabolize edilen organofosfat yapısında bir sinir ajanıdır. Yapılan in-vitro deneylerde PON1 192Q izoformunun sarini 192R izoformundan 10 kat hızlı hidrolizlediği belirlenmiştir (75). Sarini daha yavaş hidrolizleyen 192R izoformu, Japonlar arasında 192Q izoformundan daha yaygındır. PON1 192R genotipinin Japonlarda görülme sıklığı 0,66 iken, Kafkas ırkına mensup toplumlarda 0,25-0,30 arasında değişmektedir (81, 82). Dolayısı ile Japonlar sarin toksisitesine karşı daha hassas olabilir. Ancak, Tokyo metrosu saldırısı kurbanlarının 7 tanesi sarin hidroliz aktivitesi yüksek olan 192Q alelini taşıyor olmasına rağmen, akut sarin zehirlenmesine karşı korunamamışlardır (83). Bunun bir nedeni, PON1'in her bir 192Q/R genotip grubunun kendi içerisinde enzim seviyesi yönünden farklılıklar göstermesidir. Daha önce de bahsedildiği gibi PON1 enzim aktivitesini ve seviyesini etkileyen pek çok etken vardır. Sarin gazı saldırısına uğrayan Japonlarda ise PON1 seviyeleri ölçülmemiştir. Ayrıca, saldırı sırasında maruz kalınan sarin miktarının PON1 enziminin tolere edilebilecek miktarın çok üzerinde olduğu belirtilmiştir. PON1'in sarini hidrolizleme aktivitesi düşüktür; paraoksonda olduğu gibi, izoformlardan biri sarini daha verimli hidrolizleyebiliyor olsa da, bu aktivite sarin toksisitesinden korumaya yeterli olmamaktadır.

1990-1991 yılları arasında Körfez Savaşı'nda görev alan Amerikan askerlerinde nedeni açıklanamayan kronik yorgunluk, kas ve eklem ağrısı, konsantrasyon kaybı, unutkanlık ve baş ağrısı gibi sorunlar görülmüştür (84). "Körfez Savaşı Sendromu" olarak adlandırılan bu rahatsızlığın, insanların savaş sırasında maruz kaldıkları seyreltilmiş uranyum, insektisitler, sinir gazları, petrol kuyularındaki yangınlarda oluşan duman ve çeşitli çözücüler gibi birçok kimyasal unsurdan ve/veya şarbon ve botulinum aşılardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (52). Körfez Savaşı'nda bulunmuş olan ve sonrasında kendini hasta hissettiğini bildiren 25 asker ve 20 sağlıklı kontrol üzerinde yapılan bir çalışmada, nörolojik semptomlar gösterenlerin daha çok PON1 192RR homozigot veya

192QR heterozigot genotipinde oldukları, 192QQ genotipe ise daha az rastlandığı bildirilmiştir (85). Bu çalışma, sarin hidrolizleme aktivitesi düşük olan PON1 192R izoformunun körfez savaşında bulunmuş kişiler için risk faktörü olduğunu göstermiştir. Benzer bir çalışmada, kendilerinde Körfez Savaşı Sendromu belirtileri bulunduğunu bildiren 152 Körfez Savaşı gazisinde PON1'in paraoksonu hidrolizleme aktivitesi, kontrollerdekenden %50 düşük bulunmuştur. ELISA metodu ile belirlenen PON1 konsantrasyonu hastalarda %14 düşüktür. Düşük paraoksonaz aktivitesi ve konsantrasyonunun, genetik polimorfizmlerden bağımsız olduğu bildirilmiştir (86).

Geçtiğimiz yıllarda, koyunları parazitlere karşı ilaçlama işinde çalışan işçilerin organofosfatlı pestisitlere maruz kalması ile kronik merkezi sinir sistemi rahatsızlıkları arasında ilişki olup olmadığını inceleyen bazı çalışmalar yapılmıştır (87-89). Koyunları ilaçlamak için diazinon kullanan işçilerden hasta olan ve bu durumun ilaçlama ile ilgili olduğuna inananlar (hastalar) ile yine diazinon ile çalışan, ancak hasta olmayanlardan (kontroller) oluşan iki grup karşılaştırıldığında, hastaların serum diazoksonaz aktivitesinin kontrollerinkinden düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, diazokson hidroliz hızı daha yavaş olan PON1 192R alelinin frekansı hastalarda (0,35) kontrollerdekenden (0,23) daha yüksektir (88). Türkiye'de yapılan bir çalışmada akut organofosfat zehirlenmesi yaşayan hastalarda paraoksonaz aktivitesi, kontrollerden %30 düşük bulunmuştur. Her iki grupta da PON1 konsantrasyonu benzer bulunduğu için, PON1 aktivitesinin zehirlenenlerde düşük çıkmasına neden olarak organofosfatların PON1'i direkt olarak inaktive ettiği veya zehirlenmeye neden olan organofosfatların enzimin aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan substrat ile yarışması öne sürülmüştür (90).

İnsanlar üzerinde yapılan bu çalışmalar göstermiştir ki, kişinin serum PON1 seviyesi ve aktivitesi, kişinin organofosfat maruziyetine karşı göstereceği tepkiyi etkileyebilir. İleride yapılacak çalışmalarda organofosfat maruziyetinin seviyesi ve sonuçları da dikkate alınmalıdır.

3. PON1'İN ORGANOFOSFAT ZEHİRLENMELERİNDE ANTİDÖT OLARAK KULLANIMI

PON1'in organofosfatlı pestisit ve sinir gazlarıyla zehirlenmelerde antidot olarak kullanılabilmesi için öncelikle saflaştırılmış enzimin yeterli miktarda elde edilebilmesi gerekir. Geleneksel saflaştırma yöntemleriyle elde edilen enzim miktarı bu ihtiyacı karşılamaktan çok uzaktır. Bu nedenle araştırmacılar, PON1'i çok miktarda üretebilecek bakteriyel sistemler üzerinde çalışmışlardır (91). Ayrıca, doğal insan PON1 enziminin paraoksonu ve organofosfat yapısındaki sinir ajanlarını hidrolizleme hızının yavaş olmasından dolayı, enzimin aktif bölgesinde bulunan amino asitlerin belirlenmesi ve protein mühendisliği yöntemleri kullanılarak bu amino asitlerin değiştirilmesi yoluyla daha aktif bir enzim ortaya çıkarılmasına yönelik çalışmalara hız verilmiştir (92, 93).

2008 yılında Stevens ve ark. (26) *Escherichia coli*'den hem doğal insan PON1 enzimini, hem de protein mühendisliği yöntemleri ile birtakım özelliklerini değiştirdikleri rekombinant enzimi ifade etmeyi ve aktif şekilde saflaştırmayı başarmıştır. 192. amino asiti lizin ile değiştirilmiş olduğu için 192K diye anılan bu PON1 varyantı glikolize değildir ve bundan dolayı immün reaksiyona yol açma olasılığı düşüktür (26). PON1 192K'nin organofosfat maruziyeti karşısındaki koruma kapasitesini belirlemek için öncelikle saflaştırılmış enzim PON1 geni susturulmuş farelere enjekte edilmiş ve plazmada ortaya çıkan rekombinant PON1 seviyesi diazoksonaz aktivitesi ölçülerek kontrol edilmiştir. Plazmada en yüksek PON1 seviyesi enjeksiyondan 8 saat sonra ölçülmüştür. Rekombinant PON1 enjeksiyonundan 48 saat sonra bu farelere dermal yoldan 1 mg/kg diazokson enjekte edilmiştir. PON1 192K enjeksiyonunun fareleri diazoksonun toksik etkilerinden koruduğu ve beyin kolinesteraz aktivitesinin baskılanmasını engellediği görülmüştür. Rekombinant PON1'in organofosfat maruziyetinden sonra da etkili olup olmadığını belirlemek için yapılan deneylerde PON1 geni susturulmuş fareler öncelikle yüksek dozda (3-7 mg/kg)

diazoksona maruz bırakılmış, 10 dakika sonra da bu farelerin bir kısmına rekombinant insan PON1 192K enzimi enjekte edilmiştir. Yalnızca diazokson verilen fareler ölümlerken, diazokson maruziyetinden sonra PON1 192K enjekte edilen fareler hayatta kalmış ve organofosfat zehirlenme belirtileri hafif olmuştur (50).

Organofosfat maruziyetinde etkili olabilmesi için PON1'in katalitik veriminin 77 civarında olması gerektiği hesaplanmıştır (50). Ancak doğal insan PON1'in katalitik verimi 73-75 civarındadır. Stevens ve ark. tarafından geliştirilen rekombinant PON1 192K'nin diazokson hidrolizi için katalitik verimi 118 olarak belirlenmiştir (26). PON1 192K farelere enjekte edildiğinde, serumdan saflaştırılıp enjekte edilen doğal PON1 ile benzer yarılanma ömrü olduğu görülmüştür (47, 50). PON1 192K'nin toksik olmadığı ve fareler tarafından iyi tolere edildiği tespit edilmiştir (26). Ancak Stevens ve ark. tarafından üretilmiş olan PON1 varyantının, doğal PON1 enzimine göre paraoksonaz aktivitesinde, dolayısı ile parationa karşı koruma kapasitesinde bir gelişme olduğundan bahsedilmemektedir.

PON1'in paraokson hidroliz aktivitesinde umulan artış Aharoni ve ark. tarafından geliştirilmiş olan bazı PON1 varyantlarında tespit edilmiştir (94). Yönlendirilmiş evrim yöntemiyle geliştirilmiş ve *E.coli*'de ifade edilmiş olan bu PON1 varyantlarının (G2E6 ve G3C9), paraokson, fenil asetat ve bazı sinir gazlarına karşı aktivitesi Otto ve ark. (95) tarafından değerlendirilmiştir. PON1 G2E6 ve G3C9 varyantlarının paraoksonu doğal insan PON1 enziminden daha iyi hidrolizlediği, ancak VX ve VR adlı sinir ajanlarını hidrolizleme hızlarının doğal insan PON1'in gerisinde kaldığı görülmüştür. Doğal PON1'in aktif bölgesinde bulunan histidin 115 triptofan ile değiştirildiğinde, enzim VR'yi hidrolizleme yeteneğini kaybetmekte, ancak paraokson ve VX'e karşı aktivitesi artmaktadır. G2E6'da histidin 115'in triptofanla değiştirilmesi paraoksona karşı aktivitesini değiştirmemiş, ancak VX aktivitesini arttırmıştır (95). Ne var ki, paraokson hidroliz aktivitesinde in-vitro ortamda artış tespit

edilen bu PON1 varyantlarının, paraokson toksisitesine karşı koruyuculuğu hayvan deneylerinde henüz teyit edilmemiştir.

SONUÇ

Bu derlemede anlatılan çalışmalar, PON1'in bazı organofosfatların metabolizmasında rol oynadığını kesin olarak ortaya koymaktadır. Laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan denemelerde serumda PON1 miktarını yapay olarak arttırmanın bu hayvanları

organofosfat zehirlenmelerine karşı koruduğu görülmüştür. Benzer çalışmaların ileride insanlar üzerinde de yapılması ve olumlu sonuçlar alınması halinde PON1'in organofosfat zehirlenmelerinde antidot olarak kullanımının yolu açılmış olacaktır. Genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak tüm organofosfatlı pestisitlere ve sinir ajanlarına karşı yüksek aktivite gösteren PON1 varyantlarının ortaya çıkarılması, organofosfat zehirlenmelerinin tedavisine önemli bir katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Informal consultation on planning strategy for the prevention of pesticide poisoning, WHO, Geneva, WHO/VBC/86.926, 1986.
2. World Health Organization. Public health impact of pesticides used in agriculture, WHO, Geneva, 1990.
3. Ulusal Zehir Danışma Merkezi 2008 yılı çalışma raporu özeti. Türk Hij Den Biyol Derg, 2009; 66 (3) Ek 3.
4. World Health Organization. Public health impact of pesticides used in agriculture, Report of WHO/UNEP working group, WHO, Geneva, 1989.
5. Güler Ç, Çobanoğlu Z. Pestisitler. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi. 1. Basım. T.C. Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara, 1997: 37-8.
6. Jeyaratnam J, De Alwis Seneviratne RS, Copplestone JF. Survey of pesticide poisoning in Sri Lanka. Bull World Health Organ, 1982; 60(4): 615-19.
7. Jeyaratnam J. Health problems of pesticide usage in the Third World. Br J Ind Med, 1985; 42: 505-6.
8. <http://emedicine.medscape.com/article/167726-overview> erişim tarihi: 10.12.2009
9. Costa LG. Current issues in organophosphate toxicology. Clin Chim Acta, 2006; 366(1-2): 1-13.
10. Sataloğlu N, Aydın B, Turla A. Pestisit Zehirlenmeleri. Kor Hek, 2007; 6 (3): 169-74.
11. van der Hoek W, Konradsen F. Risk factors for acute pesticide poisoning in Sri Lanka. Trop Med Int Health, 2005; 10 (6) : 589-96.
12. Nagami H, Nishigaki Y, Matsushima S, Matsushita T, Asanuma S, Yajima N, Usuda M, Hirokawa M. Hospital-based survey of pesticide poisoning in Japan, 1998-2002. Int J Occup Environ Health, 2005; 11(2): 180-4.
13. Abdollahi M, Jalali N, Sabzevari O, Hoseini R, Ghanea T. A retrospective study of poisoning in Tehran. J Toxicol Clin Toxicol, 1997; 35(4): 387-93.
14. Eyer P, Szinicz L, Thiermann H, Worek F, Zilker T. Testing of antidotes for organophosphorus compounds: Experimental procedures and clinical reality. Toxicology, 2007; 233 (1-3): 108-19.
15. Suzuki T, Morito H, Ono K, Mackawa K, Nagai R, Yazaki Y. Sarin poisoning in Tokyo subway. Lancet, 1995; 345: 980-1.
16. Katz KD, Brooks DE. Toxicity, Organophosphate. <http://emedicine.medscape.com/article/167726-overview> Son erişim tarihi: 15.10.2009.
17. http://npic.orst.edu/RMPP/rmpp_ch4.pdf erişim tarihi: 11.12.2009
18. La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W, Ed. Pharmacogenetics of Drug Metabolism. New York: Pergamon Press, 1992.
19. Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: Effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. Annu Rev Med, 2003; 54: 371-92.
20. Luft FC. Insecticides and atherosclerosis. J Mol Med, 2001; 79: 415-6.
21. Rusyniak DE, Nañagas KA. Organophosphate poisoning. Semin Neurol, 2004; 24: 197-204.
22. Adanır T, Çetin Uysal F, Aksun M, Kurt Y, Özvardar Y, Savacı S. Paratiyon ve malatiyon ile gelişen iki organik fosfor entoksikasyonu. Türk Anest Rean Der Dergisi, 2005; 33: 186-91.

23. Broomfield CA, Maxwell DM, Solana RP, Castro CA, Finger AV, Lenz DE. Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991; 259(2): 633-8.
24. Saxena A, Sun W, Luo C, Myers TM, Koplovitz I, Lenz DE, Doctor BP. Bioscavenger for protection from toxicity of organophosphorus compounds. *J Mol Neurosci*, 2006; 30 (1-2):145-8.
25. Lenz DE, Yeung D, Smith JR, Sweeney RE, Lumley LA, Cerasoli DM. Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: A mini review. *Toxicology*, 2007; 233 (1-3): 31-9.
26. Stevens RC, Suzuki SM, Cole TB, Park SS, Richter RJ, Furlong CE. Engineered recombinant human paraoxonase 1 (rHuPON1) purified from *Escherichia coli* protects against organophosphate poisoning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105(35): 12780-4.
27. Gan KN, Smolen A, Eckerson H, La Du BN. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase: evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos*, 1991; 19: 100-6.
28. Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry*, 1991; 30: 10141-9.
29. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19: 2214-25.
30. Blatter M-C, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-85: identity of K-85 with paraoxonase. *Eur J Biochem*, 1993; 211: 871-9.
31. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004; 369(1): 78-88.
32. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*, 1993; 3: 73-6.
33. Tougou K, Nakamura A, Watanabe S, Okuyama Y, Morino A. Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a prodrug of a new antibacterial agent. *Drug Metab Dispos*, 1998; 26(4): 355-9.
34. Chambers JE. PON1 multitasks to protect health. *PNAS*, 2008; 105 (35): 12639-40.
35. Mackness MI, Arrol S, Abbott CA, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis*, 1993; 104: 129-35.
36. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 1989; 320: 915-24.
37. Shih D, Gu L, Xia YR, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 1998; 394: 284-7.
38. Mackness B, Quarck R, Verreth W, Mackness M, Holvoet P. Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; 26: 1545-50.
39. Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest*, 1995; 96: 3005-8.
40. Mackness B, Durrington P, McElduff P, et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective study. *Circulation*, 2003; 107(22): 2775-9.
41. Can Demirdöğen B, Türkanöğlü A, Bek S, et al. Paraoxonase/arylesterase ratio, PON1 192Q/R polymorphism and PON1 status are associated with increased risk of ischemic stroke. *Clin Biochem*, 2008; 41 (1-2): 1-9.
42. Demirdöğen BC, Demirkaya Ş, Türkanöğlü A, Bek S, Arınç S, Adalı O. Analysis of paraoxonase 1 (PON1) genetic polymorphisms and activities as risk factors for ischemic stroke in Turkish population. *Cell Biochem Funct*, 2009; 27(8): 558-67.
43. Brealey CB, Walker CH, Baldwin BC. A-esterase activities in relation to the differential toxicity of pirimiphosmethyl to birds and mammals. *Pestic Sci*, 1980; 11: 546-54.
44. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*, 1998; 31: 329-36.
45. Main AR. The role of A-esterase in the acute toxicity of paraoxon, TEPP and parathion. *Can J Biochem Physiol*, 1956; 34: 197-216.
46. Costa LG, McDonald BE, Murphy SD, et al. Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990; 103: 66-76.
47. Li W-F, Costa LG, Furlong CE. Serum paraoxonase status: A major factor in determining resistance to organophosphates. *J Toxicol Environ Health*, 1993; 40: 337-46.

48. Li W-F, Furlong C, Costa LG. Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett*, 1995; 76: 219-26.
49. Cowan J, Sinton CM, Varley AW, Wians FH, Haley RW, Munford RS. Gene therapy to prevent organophosphate intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001; 173: 1-6.
50. Li WF, Costa LG, Richter RJ, et al. Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphates. *Pharmacogenetics*, 2000; 10: 767-79.
51. Chambers JE, MaT, Boone JS, Chambers HW. Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. *Life Sci*, 1994; 54: 1357-64.
52. Costa LG, Cole TB, Furlong CE. Polymorphisms of paraoxonase (PON1) and their significance in clinical toxicology of organophosphates. *J Toxicol Clin Toxicol*, 2003; 41(1): 37-45.
53. Augustinsson KB, Barr M. Age variation in plasma arylesterase activity in children. *Clin Chim Acta*, 1963; 8: 568-73.
54. Weitman SD, Vodicnick MJ, Lech TJ. Influence of pregnancy on parathion toxicity and disposition. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1983; 71: 215-24.
55. McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S, Walker CH. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem*, 1986; 32: 671-3.
56. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19: 330-5.
57. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, et al. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20: 2441-7.
58. Patel BN, Mackness MI, Harty DW, Arrol S, Boot-Handford RP, Durrington PN. Serum esterase activities and hyperlipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Biochem Biophys Acta*, 1990; 1035: 113-6.
59. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin - dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 1991; 86: 193-9.
60. Hasselwander O, McMaster D, Fogarty DG, Maxwell AP, Nicholls DP, Young IS. Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin Chem*, 1998; 44: 179-81.
61. Tanimoto N, Kumon Y, Suehiro T, et al. Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. *Life Sci*, 2003; 72: 2877-85.
62. Ferré N, Camps J, Cabré M, Paul A, Joven J. Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism*, 2001; 50: 997-1000.
63. Paragh G, Balla P, Katona E, Seres I, Egerhazi A, Degrell I. Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2002; 252: 63-7.
64. Raiszadeh F, Solati M, Etemadi A, Azizi F. Serum paraoxonase activity before and after treatment of thyrotoxicosis. *Clin Endocrinol*, 2004; 60: 75-80.
65. Cakmak A, Zeyrek D, Atas A, Selek S, Erel O. Oxidative status and paraoxonase activity in children with asthma. *Clin Invest Med*, 2009; 32(5): E327-34.
66. Shih DM, Gu L, Hama S, et al. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest*, 1996; 97: 1630-9.
67. Sutherland WHF, Walker RJ, de Jong SA, van Rij AM, Phillips V, Walker HL. Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999; 19: 1340-7.
68. Boemi M, Sirolla C, Testa R, Cenerelli S, Fumelli P, James RW. Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme, paraoxonase, in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med*, 2004; 21: 423-7.
69. Debord J, Dantoine T, Bollinger JC, Abraham MH, Verneuil B, Merle L. Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols. *Chem Biol Interact*, 1998; 113: 105-15.
70. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (statins) or tissue paraoxonase 1 and plasma platelet activating factor acetylhydrolase activities. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004; 43: 121-7.
71. Pope CN, Liu J. Age-related difference in sensitivity to organophosphorus pesticides. *Environ Toxicol Pharmacol*, 1997; 4: 309-14.
72. Ecobichon DJ, Stephens DS. Perinatal development of human blood esterases. *Clin Pharmacol Ther*, 1973; 14: 41-7.
73. Milochevitch C, Khalil A. Study of the paraoxonase and plateletactivating factor acetylhydrolase activities with aging. *Prostagl Leukot Essent Fatty Acids*, 2001; 65: 241-6.

74. Eckerson HW, White CM, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1983; 35: 1126-38.
75. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet*, 1996; 14: 334-6.
76. Blatter Garin MC, James RW, Dussoix P, et al. Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest*, 1997; 99: 62-6.
77. Brophy VM, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics*, 2001; 11: 77-84.
78. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet*, 2001; 68: 1428-36.
79. Cole TB, Walter BJ, Costa LG, et al. Contribution of paraoxonase (PON1) levels and Q192R genotype to organophosphate detoxication: evidence from humans and "humanized" transgenic mice. *Toxicol Sci*, 2003; 72 (Suppl. 1): 100.
80. Costa LG, Cole TB, Vitalone A, Furlong CE. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin Chim Acta*, 2005; 352: 37-47.
81. Brophy VH, Jarvik GP, Furlong CE. PON1 polymorphisms. In: Costa LG, Furlong CE, eds. *Paraoxonase (PON1) in Health and Disease: Basic and Clinical Aspects*. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers, 2002: 53-77.
82. Yamasaki Y, Sakamoto K, Watada H, Kajimoto Y, Hori M. The Arg192 isoform of paraoxonase with low sarin-hydrolyzing activity is dominant in the Japanese. *Hum Genet*, 1997; 101:67-8.
83. Yamada Y, Takatori T, Nagao M, Iwase H, Kurada N, Yanagida J, Shinozuka T. Expression of paraoxonase isoform did not confer protection from acute sarin poisoning in the Tokyo subway terrorist attack. *Int J Leg Med*, 2001; 115: 82-4.
84. Institute of Medicine, Gulf War and Health. Vol. 1. Depleted Uranium, Pyridostigmine Bromide, Sarin, Vaccines. Washington, DC: National Academy Press, 2000; p. 408.
85. Haley RW, Billecke S, La Du BN. Association of low PON1 type Q (type A) arylesterase activity with neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999; 157: 227-33.
86. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Low paraoxonase in Persian gulf War veterans self-reporting Gulf War Syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 276: 729-33.
87. Pilkington A, Buchanan D, Jamal GA, et al. An epidemiological study of the relations between exposure to organophosphate pesticides and indices of chronic peripheral neuropathy and neuropsychological abnormalities in sheep farmers and dippers. *Occup Environ Med*, 2001; 58: 702-10.
88. Cherry N, Mackness MI, Durrington P, et al. Paraoxonase (PON1) polymorphisms in farmers attributing ill health to sheep dip. *Lancet*, 2002; 359: 763-4.
89. Mackness B, Durrington P, Povey A, et al. Paraoxonase and susceptibility to organophosphorus poisoning in farmers dipping sheep. *Pharmacogenetics*, 2003; 13(2): 81-8.
90. Sozmen EY, Mackness B, Sozmen B, et al. Effect of organophosphate intoxication on human serum paraoxonase. *Hum Exp Toxicol*, 2002; 21: 247-52.
91. Harel M, Brumshtein B, Meged R, et al. The 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility, and crystallizability. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2007; 58: 347-53.
92. Yeung DT, Josse D, Nicholson JD, et al. Structure/function analyses of human serum paraoxonase (HuPON1) mutants designed from a DFPase-like homology model. *Biochim Biophys Acta*, 2004; 1702: 67-77.
93. Yeung DT, Lenz DE, Cerasoli DM. Analysis of active-site amino-acid residues of human serum paraoxonase using competitive substrates. *FEBS J*, 2005; 272: 2225-30.
94. Aharoni A, Gaidukov L, Yagur S, Tokar L, Silman I, Tawfik DS. Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101(2): 482-7.
95. Otto TC, Harsch CK, Yeung DT, Magliery TJ, Cerasoli DM, Lenz DE. Dramatic differences in organophosphorus hydrolase activity between human and chimeric recombinant mammalian paraoxonase-1 enzymes. *Biochemistry*, 2009; 48(43): 10416-22.

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE

REFİK SAYDAM HIFZISSİHHA MERKEZİ BAŞKANLIĞI / REFİK SAYDAM NATIONAL PUBLIC HEALTH AGENCY

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

...../...../20...

Makale Türü/Article Type:

(...)Araştırma/Research (..)Derleme/Review (..)Olgü Sunumu/Case Report (..)Editöre Mektup/Letter to Editor

Makale Başlığı/Article Entitled :

Sayın Editör,

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

1. Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orjinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
2. Makalenin; derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
3. Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
4. Yayın haklarının Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here, we affirm and warranty as the Author(s) of this manuscript submitted to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology that;

1. The article I / We submitted to the Bulletin is original and responsibilities are belong to us ethically and scientifically,
2. The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under evaluation by this bulletin,
3. The article contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights,
4. The article publishing rights belong to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology.

(...1) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...2) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...3) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...4) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...5) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

Not / Note : 1. İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz / Please indicate the corresponding author with (X)

2. Formu aşağıdaki adrese faks/posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below by faks or mail, or deliver personally.

Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı / Refik Saydam National Public Health Agency

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Yayın ve Dokümantasyon Müdürlüğü

Cemal Gürsel Cad. No: 18 06100 Sıhhiye-ANKARA-TÜRKİYE

Tel/Phone: 0312 458 23 64

Faks/Fax: 0312 458 24 08

e-posta/e-mail: turkhijyen@rshm.gov.tr

