

Yayın Kurulundan,

Bültenimizde artık bilimsel çalışmalar da yer almaktadır. Dernek Yönetim Kurulu'nun aldığı karar doğrultusunda ilk olarak bu sayıda VIII. Ulusal Biyofizik Kongresi'nde ödül alan Posterler yayınlanmaktadır. Birincilik, ikincilik ve üçüncülük ödülü alan posterler, sırasıyla 1) **Radyo-ligant bağlama yöntemi ile sıçan beyin sinaptik membranlarına glutamik asit bağlanmasının kantitatif saptanması**, 2) **Plevra sıvısında *Mycobacterium Tuberculosis* etkeninin IS6110 dizisi aracılığı ile saptanması**, 3) **Prokainin bileşik sinir aksiyon potansiyeli ve birleşik dinlenim potansiyeli üzerine etkisi** başlıklarını taşımaktadır. Bu uygulama diğer sayılarda da sürdürülecektir. Bu doğrultuda Dernek Yönetim Kurulu'nun aldığı karar gereği önümüzdeki sayıda da Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında yapılan Biyosinyal 96 Yaz okulu ders notları özeti yayınlanacaktır. Daha sonraki sayılarda bültenimizde yayınlamayı düşündüğünüz bilimsel makale veya yazılarınızı Yayın Kurulu'na gönderebilirsiniz.

Bir dahaki sayıda buluşmak üzere saygılar sunarız.

VIII. ULUSAL BIYOFİZİK KONGRESİ'NİN ARDINDAN

Bir çoğunuzun bildiği gibi kongre hazırlamak uzun süren, emek yoğun bir uğraştır. Ancak, aşağıda tekrar değineceğimiz umutlar ve umutsuzluklar, sevinçler ve kızgınlıkları ile geride bıraktığımız 28 Eylül akşamı Marmara Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı olarak düzenlemekle sorumlu olduğumuz ilk kongreyi gerçekleştirmiş olmanın haklı gururunu taşıyorduk. Bir çok katılımcının özellikle belirttiği gibi bazı ufak aksaklıklarına rağmen hem bilimsel içeriği açısından hem de derneğe bıraktığı maddi katkı açısından kongre başarılı olmuştu. Yine de ileride kongre düzenleyecek arkadaşlara yararı olacağı düşüncesiyle tarihçeyi, yani karşılaştığımız sorunları, yaşadığımız umutsuzlukları özetlemeyi gerekli görmekteyiz.

Karşılaştığımız en büyük sorun tahmin edilebileceği gibi maddi sorun oldu. İşe Biyofizik Derneğinden avans olarak aldığımız 4 Milyon TL. ile başladık. İlk başta masrafların en büyük kalemini posta ve kâğıt masrafları oluşturdu. İlk duyuruların yerine ulaşmaması ve bunu tekrarlamak zorunda kalmamız giderleri ikiye katladı. Yavaş yavaş gelmeye başlayan bağışlar ile bu masraflar karşılandı. Yaz geldiğinde formunu yollamış geleceğini belirtmiş ancak (aslında diğer kongrelere göre oldukça az olan) kongre aidatlarını ödemiş katılımcıların çokluğu ve dolayısıyla bu konuda yaşanan belirsizlik, gelen bağışların yetersizliği ve dövize endeksli olarak belirlenen konaklama ve salon kira ücretlerinin yüksekliği nedeniyle hayli gergin, umutsuz ve kaygılı günler yaşandı. Son ana kadar gece yemeğinin yapıp yapılmayacağı, otobüs sorununun nasıl halledilebileceğini bilemez bir durumdaydık. İstanbul Tıp Fakültesi ile Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nin ve TÜBİTAK-GMBA'nın da gayretleri ile son anda alınan bağışların sonucu kongreye ancak bir hafta kala bu sorunları halledebildik.

Diğer yaşanan önemli sorun ise bildirimlerini göndermiş ancak aidatlarını yatırmamış katılımcıların yarattığı belirsizlik idi. Bu bildirimlerin kongre kitapçığına basılıp basılmamasına karar vermek oldukça zor oldu ve sonunda basılmasına karar verildi. Bu karar üyelerimizin koşullarını göz önüne alarak verildi. Ancak, bunun bir adet haline gelmemesi konusunda tüm üyelerimizin ve Biyofizik camiasının uyarılmasını gerekli görmekteyiz. Gerek yurt dışında gerekse

İÇİNDEKİLER

- Yayın kurulundan
- 8. Ulusal Biyofizik Kongresi ardından
- Kongre Duyuruları
- Makaleler

ÇAĞRI Bültenimizde yayınlanmasını istediğiniz yazı ve reklamlarınızı bekliyoruz.

yurt içinde bu kurala kesinlikle uyulduğunu bilmekteyiz. Kongre hazırlıkları sırasında bunun ne kadar haklı bir karar olduğunu gördük. Ayrıca unutulmamalıdır ki aidatını göndermeyenlerin bildirimleri gönderenlerin sırtından basılmış olmaktadır. Kongreden sonra gerçekleştirilen kuramsal kursa katılımın çok düşük olması bizler için üzücü oldu. Büyük zorluklarla gerek yurt içinden gerekse yurt dışından getirilen ve hepsi kendi dallarında yetkin kişiler olan konuşmacıların Biyofizik camiasından daha çok üyenin yararlanabilmesini isterdik.

Bu zorlukların ve aksaklıkların dışında en önemli ve sevindirici gözlemimiz kongreye katılımın yüksek olması ve sunulan bildirilerin bilimsel içeriğinin daha önceki kongrelere oranla daha zengin oluşudur. Bu, kanımızca Türkiye'deki Biyofizik dalının bilimsel açıdan giderek güçlendiğinin ve bu alanda çalışan araştırmacıların büyük bir hızla yetkinleştiklerinin bir göstergesidir. Ülkemizde oldukça yeni olan bu Anabilim Dalının bu kadar kısa bir zaman içinde diğerlerinin yanında saygın ve nitelikli yerini alması hepimizin katkısıyla gerçekleştirilecektir ve bunun onuru hepimize ait olacaktır. Bazı Biyofizik Anabilim Dallarından Biyofizik Kongre'sinin her yıl değil iki yılda bir düzenlenmesi önerisi gelmiştir. Buna gerekçe olarak bildiri kalitesinin ve katılımın daha da artacağı gösterilmiştir. Kanımızca bu haklı bir gerekçe olabilir ve toplantılarımızı bir yıl sempozyum ya da kurs şeklinde düzenlemeye gidebiliriz. Bu önerinin Biyofizik Derneği Yönetim Kurulunda tartışılmasında yarar görmekteyiz.

Tüm üyelerimizin gelecek çalışmalarında başarı dileklerimizle.

M. Ü. Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

KONGRE DUYURULARI

FEBS'97 Özel Toplantısı

"Cell Signaling Mechanisms From Membranes to Nucleus"

29 Haziran - 3 Temmuz 1997

Amsterdam - Hollanda

Bildiri gönderme son tarihi : 1 Şubat 1997

Başvuru adresi : Congress Secretariat

c/o Lidy Groot Congress Events

P.O. Box 83005

1080 AA Amsterdam / The Netherlands

Tel.: 31-20-679 3118

Fax: 31-20-675 8236

11. Balkan Biyokimya ve Biyofizik Günleri

15-17 Mayıs 1997

Selanik - Yunanistan

Bildiri gönderme son tarihi: 31 Ocak 1997

Başvuru adresi : Prof. A. Dimitriadou - Vafiadou

Lab. of Biological Chemistry Medical
School

Aristotle University of Thessaloniki

54006 - Thessaloniki Greece

Tel: 003031 - 999002

Fax: 003031 - 999004

2. Avrupa Biyofizik Kongresi

15-17 Mayıs 1997

Orléans, Fransa

Başvuru adresi : CNRS-Rue Charles Sadron F-45071
Orleans, Cedex 2

Tel: 33-02-38255589

Fax: 33-02-38690151

Email : vigny@cns-orleans.fr

ICGEB Fellowship Programme 1997

2nd Review 30 June 1997.

International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology office of the director (Fellowship Programme)

Padriciano 99, 34012 Trieste - Italy

Tel: +39-40-3757305

Fax: +39-40-226555

**RADYO-LİGANT BAĞLAMA YÖNTEMİ İLE
SIÇAN BEYİN SİNAPTİK
MEMBRANLARINA
GLUTAMİK ASİT BAĞLANMASININ
KANTİTATİF SAPTANMASI***

Asiye Nurten¹ ve Rüstem Nurten^{1,2}

ÖZET

L-Glutamik asit ya da onun iyonize şekli olan glutamat iyonu (GLU), memeli santral sinir sisteminde eksitator nörotransmitter olarak rol oynamaktadır. Glutamik asit reseptörlerinin beyin ve omurilikte çeşitli agonist ve antagonistlere olan duyarlıklarına göre beş alt grubu olduğu gösterilmiştir. Özellikle beyin nöronlarının sinaptik bölgelerinden izole edilen kesimlerin L-Glutamat bağlama özellikleri için birçok çalışma yapılmıştır. Bu reseptörler içinde en çok incelenen NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörleridir. Bu iyonotropik reseptörlerin epilepsi, iskemik beyin hasarı, öğrenme, opiat bağımlılığı gibi farklı işlemlerde rolü olduğu bilinmektedir. Ancak glutamik asit reseptörlerinin bu mekanizmalardaki düzenleme rolü ile ilgili açıklama çok azdır. Glutamik asidin reseptörlerle olan ilişkisinin kantitatif saptanması bu doğrultudaki çalışmalara yardımcı olacaktır.

Bu amaç doğrultusunda, çalışmada radyo-ligant bağlama tekniği kullanarak sıçan beyin sinaptik membranlarına L-Glutamik asidin bağlanması kantitatif olarak saptandı. Önce sıçan beyin sinaptik membranları, homojenleştirme ve santrifüjleme teknikleri kullanarak elde edildi. Daha sonra santrifüjleme teknikleri kullanarak elde edildi. Daha sonra radyo-ligant bağlama tekniği şartları belirlenerek bağlanmanın disosiyasyon (ayrışım) denge sabiti $K_d=110\pm9.2nM$, bağlanma miktarı $B_{max}=910\pm78.2 fmol/mg$ olarak saptandı.

Glutamik asit beyinde ve omurilikte bulunan eksitator bir nöromedyatördür. Glutamik asit veya onun iyonize şekli olan glutamat iyonu, sinir uçlarında oksoglutarik asit ve glutamat ile denge halinde bulunur. Sinir uçlarında sinaps aralığına salınan glutamik asidi içeri pompalayan yüksek afiniteli bir geri alım "uptake" mekanizmasının varlığı gösterilmiştir. Glutamik asit sinir ucunda glutaminaz enzimi yardımıyla glutamin hidrolizi sonucu oluşur. Az bir kısmı ise oksoglutaratın oksidasyon ve transaminasyon yoluyla glukozdan sentez edilir. Sinir ucundan glutamatın salınmasının Ca^{2+} e bağımlı olduğu gösterilmiştir¹.

Beyinde ve omurilikte çeşitli agonist ve antagonistlere olan duyarlıklarına göre beş türlü glutamat reseptörü bulunduğunu gösteren deneysel kanıtlar elde edilmiştir. Glutamat reseptörleri aspartata da afinite gösterirler ve onun tarafında da aktifleştirilebilirler. Bu nedenle glutamat reseptörlerine eksitator amino asit (EAA) reseptörleri de denir².

Beyin nöronlarının sinaptik bölgelerinden izole edilen kesimlerin glutamat bağlama özellikleri için birçok çalışma yapılmıştır. Bu reseptörler içinde en çok incelenen N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörleridir. Bu iyonotropik reseptörlerin epilepsi, iskemik beyin hasarı, öğrenme, opiat bağımlılığı gibi farklı işlemlerde rolü olduğu bilinmektedir. Ancak glutamik asit reseptörlerinin bu mekanizmalardaki düzenleme rolü ile ilgili açıklama çok azdır. Glutamik asidin reseptörlerle olan ilişkisinin kantitatif saptanması bu doğrultudaki çalışmalara yardımcı olacaktır³⁻¹⁰.

Bu amaç doğrultusunda radyo-ligant bağlama tekniğinin kullanılarak sıçan beyin sinaptik membranlarına glutamik asidin bağlanması düşünüldü. ³H, ¹⁴C veya ¹²⁵I ile işaretli spesifik ligantlar kullanılarak yapılan radyo-ligant bağlama yöntemleri ile hücre homojenatlarında, hücre kül-bağlama yöntemleri ile hücre homojenatlarında, hücre kültürlerinde veya dokularındaki hücrelerde reseptörlerin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi mümkündür.

Membran reseptörlerinin radyoligant bağlama yöntemleriyle incelenmesinde önce hücre homojenatından membran parçalarını içeren kesimler ayrılır. Sitoplazmik reseptörlerin incelenmesi için ise çözülebilir reseptörü içeren kesim ayrılır. Her iki durumda da reseptörü içeren kesim daha sonra, radyoligandın artan konsantrasyonu ile belirli bir sıcaklıkta ve belirli bir süre inkübe edilerek her bir kon-

1. İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Sinirbilim Anabilim Dalı
Çapa - İSTANBUL

2. İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı
Çapa - İSTANBUL

* Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu'na desteklenmiştir.
(Proje No.: 855/090896)

santrasyondaki spesifik bağlama ölçülür. Bu değerler grafiklenerek doygunluk (satürasyon) eğrisi çizilir. Ayrıca ölçümler Scatchard grafiğine uygulanarak elde edilen K_d yani ligand-reseptör kompleksinin denge durumundaki disosiyasyon sabiti (ligandin reseptöre karşı afinitesi) ve B_{maks} (reseptör sayısı) değerleri hesaplanır.

Çalışmada sıçan beyin sinaptik membranları homojenleştirme ve santrifüleme teknikleri kullanılarak elde edildi. Radyo-Ligant bağlama tekniği şartları belirlendi. 3H -glutamik asidin sıçan beyin sinaptik membranlarına bağlanmasının disosiyasyon (ayrışım) sabiti ve bağlanma miktarı saptandı. Böylece bundan sonra yapılacak bu doğrultudaki çalışmalara katkı sağlandı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünden alınan 200-250 g ağırlığında erkek inbred Wistar sıçanlar deneyde kullanıldı. L-(3H) Glu (spesifik aktivite 40 Ci/mMol) Amersham (England)'dan satın alındı. Kullanılan tüm kimyasal maddeler Sigma (Chemical Comp. U S)'dan elde edildi.

Sinaptik membranların hazırlanması:

Yoneda ve Ogita^{11,12} ve Emmelot ve ark¹³'nin yöntemleri değiştirilerek sinaptik membranlar hazırlandı. Sıçanlar servikal dislokasyondan sonra kafaları kesildi. Beyinleri hemen çıkarılarak 4°C'ye alındı. Beyinler yabancı dokulardan temizlendikten sonra 0°C'de 9 hacim (v/w 0.32 M sukroz ilavesi ile 10 vurum teflon-cam homojenleştirici (B. Braun Melsungen-Germany) ile 800 devir/dakika'da homojenleştirildi. Homojenatlar daha sonra 1000xg de 20 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı alınarak 10000xg de 20 dakika santrifüjlendi. Tekrar üst sıvı alındı ve 50000xg de 20 dakika santrifüjlendi. Pelet alındı ve 0°C'de bidestile su ile resüspende edildi ve 50000 xg de 20 dakika santrifüjlendi. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Son pelet daha sonra -80°C'de saklandı. Deney günü dondurulmuş pelet alındı ve 50 mM trisasetat tamponunda (pH 7.4) resüspende edildi ve 50000xg de 20 dakika santrifüjlenerek pelet alındı ve aynı tamponda resüspende edildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Son santrifüj işleminden sonra pelet 50 mM Tris-asetat tamponunda (pH 7.4) çözüldü.

Radyo-ligant bağlama deneyi:

Kinetik parametreler (K_d ve B_{maks}) 1 mM L-Glu var-

lığında ve yokluğunda L-(3H)-Glu'nun 5-500 nM (son konsantrasyon) değişen konsantrasyonları kullanılarak saturasyon deneyleriyle belirlendi. Bağlama deneyleri 2°C'de 10 µl hacimde yaklaşık 200-250 µg membran proteinleri ile gerçekleştirildi. Spesifik olmayan bağlanma 1 mM işaretli L-Glu varlığında belirlendi. Spesifik olmayan bağlanma 1 mM işaretli L-Glu varlığında belirlendi. 10 dakika inkübasyondan sonra reaksiyon soğuk (0°C) 2 x5 ml 50 mM Tris-asetat (pH 7.4) ile GF/B (Whatman) filtreleri kullanılarak hızlı filtrasyon ile tamamlandı.

Bu filtrelerdeki radyoaktivite trityum için sayım verimi %64 olan likit sintilasyon sayacında (Packard) sayılarak belirlendi. Her sonuç %10'dan daha az bir farkla üç deneyin sonunda hesaplandı. Spesifik bağlama total bağlanmanın %80-90'ı olarak saptandı.

L-(3H)-Glu bağlanma deney sonuçları en küçük kareler yöntemine göre Scatchard analizi ile bilgisayar yardımıyla saptandı¹⁴. Protein konsantrasyonu Lowry ve ark. yöntemine göre belirlendi¹⁵.

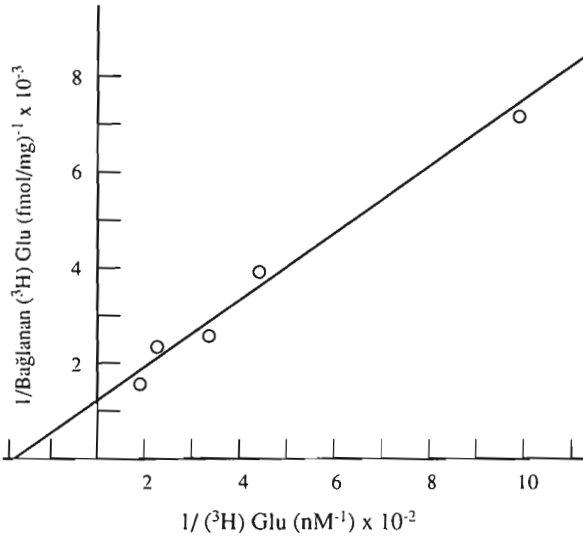
BULGULAR VE TARTIŞMA

Sıçan beyin sinaptik membranlarının izolasyonu Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Değişik ortamlarda (TrisHCl, pH 7.4, Tris-Sitrat, pH 7.4 ve Tris-Asetat, pH 7.4) elde edilen sinaptik membranlar kullanılarak yapılan bağlama deneyleri sonucu elde edilen bağlanma miktarları Tablo 1'de topluca gösterilmektedir. Görüldüğü gibi Tris-Asetat, pH, 7.4'de elde edilen sinaptik membranlara bağlanma miktarında en yüksek değere ulaşıldı.

Tablo 1. Değişik ortamlarda elde edilen sıçan beyin sinaptik membranlara (3H) Glutamik asit bağlanması. Bağlanma Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı gibi yapıldı. Değerler birbirinden bağımsız dört deney sonucu elde edildi.

Ortam	Bağlanma miktarı (fmol/mg protein)
Tris-HCl, pH, 7.4	178.2 ± 17.6
Tris-Asetat, pH, 7.4	316.1 ± 42.1
Tris-Sitrat, pH, 7.4	241.6 ± 31.8

Ortamın belirlenmesinden sonra uygun sıcaklık ve sürenin saptanması için yapılan radyo-ligant bağlama deneyleri sonucu elde edilen bağlanma miktarları sıcaklık ve süreye bağlı olarak Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmektedir. Tablolarda görüldüğü gibi, 10 dakika ve 2°C'de yapılan deneylerde en yüksek bağlanma miktarına ulaşıldı.



Şekil 1. Sinaptik membranlara (³H) Glutamik asidin bağlanmasının kantitatif saptanması K_d ve B_{max} Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde saptanan ortam ve sıcaklıkta yapılan bağlama deneyleri sonucu en küçük kareler yöntemine göre Scatchard analizi ile elde edildi. Değerler 10 ayrı deney sonucu ile saptandı.

Uygun süre ve sıcaklığın belirlenmesinden sonra denge doyum bağlanma deneyleri ile denge sabiti ve bağlanma miktarı saptandı. Şekil 1'de görüldüğü gibi elde edilen bağlanma miktarının resiproku ile kullanılan (³H) Glutamik asit konsantrasyonunun resiproku arasında en küçük kareler yöntemine göre çizilen grafikten $K_d = 110 \pm 9.2$ nM, $B_{max} = 910.1 \pm 78.2$ fmol/mg olarak belirlendi. Değerler 10 ayrı sıçan beyin sinaptik membranları ile yapılan deneyler sonucu elde edildi.

Bulguların tekrarlanabilir olması ortaya konan bu radyo-ligant bağlama yöntemi ile, sıçan beyin sinaptik membranlarındaki reseptörlerine etki eden parametrelerin araştırılmasına olanak tanıdı. Amaç, bundan sonra bu reseptörlerinin tipini belirleyerek glutamik asidin bu reseptörlerle etkileşmesine etki eden faktörleri belirlemektir.

Tablo 2. Sinaptik membranlara (³H) Glutamik asit bağlanma miktarının inkübasyon süresine bağımlılığı. Bağlanma 2°C inkübasyon sıcaklığında Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde gerçekleştirildi.

Süre (dakika)	Bağlanma miktarı (fmol/mg protein)
1	219
5	278
10	396
20	186
30	132

Tablo 3. Sinaptik membranlara (³H) Glutamik asit bağlanma miktarının inkübasyon sıcaklığına bağımlılığı. Bağlanma 10 dakika inkübasyon süresinde Gereç ve Yöntemler bölümünde açıklandığı şekilde gerçekleştirildi.

Sıcaklık (°C)	Bağlanma miktarı (fmol/mg protein)
2	412
5	378
10	265
20	185
30	176

KAYNAKLAR

- Breese, C.R., Leonard, S.S., Glutamate receptor subtype expression in human postmortem brain. *J. Mol. Neurosci.* 4 (4), 263, 275, (1994).
- Mayer, M.L., Westbrook G.L., The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Progr. Neurobiol.* 28, 197-276, (1987).
- Köhr, G., Eckard, S., Lüddens, H., Monyer, H., Seeburg, P., H., NMDA receptor channels: Subint-specific potentiation by reducing agents. *Neuron*, 12, 1031-1040, (1994).
- Danysz, W., Archer, T., Glutamate, learning and dementia-selection of evidence. *Amino Acids*. 7, 147-163, (1994).
- Baran H., Löscher, Mevissen, M., The glycine/NMDA receptor partial agonist D-cycloserine block kainate-induced seizures in rats. Comparison with MK-801 and diazepam. *Brain Res.* 652, 195-200, (1994).
- Koyuncuoğlu, H., Hatipoğlu, I., Sarıca, Ö., Morphine physical dependence intensification by hypoglycemia NMDA receptor involvement. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48 (37, 571-574), (1994).
- Sundström, E., Mo, L., L., Effects of 1-methyl-4 phenylpyridinum on radioligand binding to the NMDA receptor complex. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 88 (2), 131-136, (1995).
- Meeker, R., B., Greenwood, R., S., Hayward, J., N., Glutamate receptor in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, 134 (2), 621-629, (1994).
- Brann, D., W., Zamorano, P., L., Chorich, L., P., Mahesh, V., B., Steroid hormone effects on NMDA receptor binding and NMDA receptor mRNA levels in the hypothalamus and cerebral cortex of the adult rat. *Neuroendocrinology*, 58, 666-672, (1993).
- Danysz, W., Essmann, U., Bresink, I., Wilke, R., Glutamate antagonist have different effects on spontaneous locomotor activity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48 (1), 111-118 (1994).
- Yoneda, Y. and Ogita, K., Labeling of NMDA receptor channels by (³H)MK-801 in brain synaptic membranes treated with Triton X-100. *Brain Res.*, 499, 305-314, (1989).
- Yoneda, Y. and Ogita, K., Heterogeneity of the N-methyl-D-aspartate receptor ionophore complex in rat brain, as revealed by ligand binding techniques. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259, 86-96, (1991).
- Emmelot, P., Bos, C., J., van Hoesen, P. and van Blitterswijk, W., J. Isolation of plasma membranes from rat and mouse livers and hepatomas. In S., Fleisher and L., Packer (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. XXXI Part A, Academic Press, London, pp 75-90, (1974).
- Lowry, O., H., Rosebrough, N., J., Four, A., L., Randall, R. J., Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, (1951).
- Klotz, I., M., *Intruduction to biomolecular energetics. Including ligand-receptor interactions.* Academic Press, Inc, Florida (1986).

**PLEVRA SIVISINDA MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS ETKENİNİN
IS6110 DİZİSİ
ARACILIĞIYLA SAPTANMASI**

Tammam SİPAHİ¹, Osman Ziya SAYHAN¹
Ayşe BAHADIR², Beki KAN¹, Nur SAYHAN³,

ÖZET

Bu çalışmada klinik olarak tuberküloz tanısı konmuş ya da tuberküloz şüphesi olan hastaların balgam ve plevra sıvılarında bakterilerin varlığı bu etkenin genomunda bulunan iki farklı bölgeye özgü primerler ile çoğaltarak saptandı. Bunlardan biri bakterinin 65 kDa'luk antijeni kodlayan bir bölge olup diğeri bakteri genomunda 5-10 kez tekrarlanan bir dizi olması nedeniyle PCR reaksiyonunda kullanılması daha avantajlı görünen IS6110 dizisidir. Çalışmamızda aynı klinik örneklerde bu iki bölgeyi çoğaltarak hibridizasyon işlemi gerektirip gerektirmemesini pratiklik ve özgünlük açısından kıyasladık.

GİRİŞ

Tuberküloz yıllardır dünyanın en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Ancak bu enfeksiyonun engellenmesindeki en büyük eksikliklerden biri etiyolojik ajanın yani *Mycobacterium Tuberculosis*'in etkin kontrolü için gerekli hızlı ve kesin sonuç verebilecek bir teşhis yönteminin olmamasından kaynaklanmaktadır. Son yıllarda ge-

liştirilen DNA amplifikasyon yönteminin diğer tanı yöntemlerine göre daha hızlı ve daha hassas olduğu öne sürülmektedir. Bu amaçla birçok araştırmacı değişik primerler kullanarak *M. tuberculosis* genomundaki değişik bölgeleri çoğaltmaya ve örneklerdeki *M. tuberculosis* 'in varlığını saptamaya çalışmışlardır. Bunlardan hangisinin daha hassas ve özgün olduğu günümüzde halen tartışma konusudur.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada S. B. Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Heybeliada Göğüs Hastalıkları Senatoryumuna tuberküloz şikayeti ile başvuran yaşları 17 ile 70 arasında değişen 19 kadın ve 57 erkekten 14 balgam ve 62 plevra sıvısı alındı. Klinik muayene ve radyolojik tetkikler sonucunda balgam alınan 14 hastaya ve plevra sıvısı alınan 52 hastaya tuberküloz ya da şüpheli tuberküloz teşhisi konuldu. Malign intratoraks neoplazmı sonucu pleral efüzyon oluşmuş olan 10 hastanın da plevra sıvısı kontrol grubu olarak değerlendirildi.

Kullanılan Primerler:

65 kDa'luk antijeni kodlayan bölge primerleri
TB-1 : 5' - GAGATCGAGCTGGAGGATCC-3'
TB-2 : 5' - AGCTGCAGCCCAAAGGTGTT-3'

IS6110 Tekrarlanan dizi parametreleri

IS-1 : 5' - CCTGCGAGCGTAGGGCTCGG-3'
IS-2 : 5' - CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'

DNA Amplifikasyonu

PCR reaksiyonu TB-1 ve TB-2 primerleri veya IS-1 ve IS-2 primerleri kullanılarak 25 µl'lik reaksiyon hacminde yapıldı. Reaksiyon ortamı 67 mM Tris-HCl (pH 8), 16 mM amonyum sulfat, 170 µg/ml bovine serum albumin, 10 mM β-merkaptotanol, 7 µM EDTA, 6,7 mM MgCl₂, herbir dNTP'den 1,4 mM ve herbir primerden 0,5 µM içermektedir. Reaksiyon ortamına 1 ünite Taq polimeraz ilave edilerek PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

PCR Koşulları:

7dak 94°C	ilk denatürasyon
30 sn 94°C	deantürasyon
30 sn 55°C	primer bağlanması
2 dak 72°C	sentez
7 dak 72°C	son sentez

30 döngü

1. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı - İSTANBUL
2. Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi - İSTANBUL
3. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı - İSTANBUL

BULGULAR

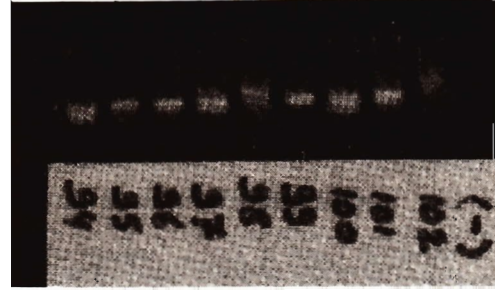
14 balgam örneğinde her iki primer çifti ile PCR reaksiyonu sonucunda *M. tuberculosis*'in varlığı saptandı. Hasta grubunu oluşturan 52 plevra örneğinin 43 tanesinde TB-1 ve TB-2 primer çifti ile PCR ve Southern Blot işlemi sonucunda *M. tuberculosis* enfeksiyonu olduğu gözlemlendi. 52 örneğin 31'inde agaroz jelinin etidyum bromür ile boyanması ve UV altında incelenmesi sonucunda beklenen 383 bp'lik ürün saptanırken (Resim-1) geriye kalan 21 tanesi için Southern Blot ve hibridizasyon işlemi sonucunda ancak kesin sonuca ulaşılabildi. Bu 21 örneğin 12 tanesi hibridizasyon sonucunda pozitif sonuç verirken 9 tanesinin sonucu gene negatifti. Diğer taraftan balgam örneklerinin hepsinde mikroskopik inceleme sonucu *M. tuberculosis* varlığı saptanırken bunların %50'sinde kültür sonucunda basil üremiştir. Plevra sıvılarından sadece bir tanesinde (%1,9) mikroskopik inceleme sonunda bakteri belirlenmiş olup hiçbiri kültürde ürememiştir.



Resim-1 : %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülen ve 383 bp'lik bant elde edilen örneklerin UV'deki görüntüsü. 1) Negatif kontrol 2) 2, 3, 4, 5, 6 : PCR (+) plevra örnekleri 3) M : Marker DNA

İkinci primer çifti olan IS-1 ve IS-2 primerleri ile aynı plevra örneklerinin 42 tanesinde ve balgam örneklerinin hepsinde hibridizasyon işlemine gerek kalmadan agaroz jelinin etidyum bromür ile boyanması ve UV altında incelenmesi sonucunda *M. tuberculosis* varlığı saptanmıştır (Resim - 2).

Kontrol grubunu oluşturan 10 plevra örneğinde ise gerek DNA analiz yöntemleri gerekse mikroskopik ve bakteriyolojik tetkikler sonucunda *M. tuberculosis* varlığı saptanmıştır.



Resim-2 : %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülen pozitif örneklerin UV görüntüsü

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda 14 balgam örneği tüberküloz şüphesi olan 52 plevra sıvısıyla 10 kontrol plevra sıvısında *M. tuberculosis* enfeksiyonu iki farklı primer çifti kullanılarak araştırılmıştır. Balgam örneklerinin hepsinde hem mikroskopik yöntem ile hem de PCR reaksiyonu ve hibridizasyon yöntemi ile *M. tuberculosis* varlığı saptanmıştır. Plevra örneklerinin 31'inde ise TB-1 ve TB-2 primerleri ile PCR yapıldıktan sonra geriye kalan 12 tanesinde ise özgün prob ile hibridizasyon işleminden sonra olmak üzere toplam 43 tanesinde *M. tuberculosis* enfeksiyonu olduğuna karar verilmiştir.

İkinci primer çifti olan IS-1 ve IS2 primerleri ile PCR yapıldığında ise hibridizasyon işlemine gerek kalmadan balgam örneklerinin 42 tanesinde *M. tuberculosis* enfeksiyonu belirlenmiştir. Hibridizasyon sonucu pozitif olan bir örnek ise bu primer çifti ile negatif sonuç vermesine rağmen bunun % 2,3 gibi oldukça düşük bir değer olduğu görülmüştür. Kontrol grubunda ise her iki PCR reaksiyonunda yanlış pozitiflik anlamında herhangi bir ürün gözlenmemiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda çalışma değerlendirildiğinde PCR reaksiyonunun özellikle plevra sıvısı gibi çok etken içeren klinik örneklerdeki enfeksiyonu belirlemek için diğer mikrobiyolojik ve bakteriyolojik yöntemlerden çok daha hassas, hızlı ve güvenilir olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan IS6110 bölgesi çoğaltıldığında hibridizasyon işlemine gerek kalmadan aynı hassasiyet ile kısa sürede *M. tuberculosis* varlığı belirlenmektedir. Rutin olarak, tüberküloz şüphesi olan ve tanı konulamayan hastalarda elde edilecek klinik örneklere IS6110 dizisine özgü primerler kullanılarak yapılacak PCR işlemi sonucunda *M. tuberculosis* enfeksiyonu olup olmadığı kolaylıkla ve oldukça duyarlı bir şekilde anlaşılacaktır.

Çalışmamız sonucunda *M. tuberculosis* tayininde, bu bakteriye özgü iki diziden biri olan IS6110 dizisinin amplifikasyonu daha avantajlı, pratik ve özgün olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Levine H, Metzger D, Lacera D, Kaly L: Diagnosis of tuberculose pleurisy by culture of pleural biopsy specimens. Arch. Intern. Med. 126:269-71, (1970).
2. Brisson-Noel A, Lecossier D, Nassif X, Gicquel B, Levy-Frebault V, Hance AJ: Rapid diagnosis of tuberculosis amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 2: 1069-71, (1989).
3. Manjunath N, Shankar P, Rajan L, Bhargava A, Saluja S, Shrinivas S.: Evaluation of a polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. Tubercle 72:21 - 27, (1991).

PROKAIN'İN BİLEŞİK SINIR AKSİYON POTANSİYELİ VE BİLEŞİK DİNLENİM POTANSİYELİ ÜZERİNE ETKİSİ

Tufan MERT, Mustafa İTEĞİN,
Aykut PELİT, İsmail GÜNAY¹

ÖZET

Çalışmada, sukroz-gap tekniğiyle farklı prokain konsantrasyonlarının, kurbağa siyatik siniri bileşik aksiyon potansiyelinin (BSAP), genlik (V), Latans (T_L), depolarizasyon zamanı (T_{DE}), yarı repolarizasyon zamanı ($1/2 T_{RE}$) ve bileşik dinlenim potansiyeli (BDP) üzerine etkileri araştırıldı.

Çalışmada ağırlıkları 70-80 gram arasında değişen kurbağalardan çıkarılan 5-7 cm uzunluğundaki siyatik sinir demetleri kullanıldı. Sukroz-gap tekniğiyle bu sinirlerin 22-24°C'ta ve 7.4 pH'da BSAP parametreleri ve BDP'si kontrol (0 mM), 1, 2.1, 4.2 mM Prokain konsantrasyonlarında 30 dak. süreyle kayıtları.

Kayıt sırasında desheat edilip sukroz-gap kutusuna yerleştirilen sinirler Nihon Kohden SEN-3301 stimülatörü ile uyarıldı, Ag-AgCl kayıt elektrotları ve Grass P-16 AC/DC preamplifikatörü ile kayıtları. Amplifikatörün AC çıkışından BSAP ve DC çıkışından BDP'ler iki kanallı Hitachi VC-6045 Digital Storage Osiloskobu ve pen recorderinde gözlendi hafızaya alındı ve kağıda çizdirildi. Daha sonra BSAP'lar storage osiloskoptan bilgisayara aktarıldı ve Bİ-SIP programında değerlendirildi.

Sonuç olarak, prokainin konsantrasyona bağlı olarak BSAP'nın genliğini düşürdüğü, latans, depolarizasyon zamanı ve yarı repolarizasyon zamanını arttırdığı ve bileşik dinlenim potansiyelini hiperpolarize ettiği belirlendi.

GİRİŞ

Lokal Anestezikler (LA) sinir zarındaki sodyum kanallarını geri dönüşümlü olarak bloke eden ilaçlardır³. Lokal anestezik ajanlar, sinir ve iskelet kası gibi dokuların uyarılabilirliğini baskılamaktadır¹. Voltaj-Clamp çalışmaları, anestezik moleküllerin sinir zarlarının iç bölgesinde anestezik moleküllerinin sodyum kanallarını direkt olarak et-

1. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı
Balcalı - ADANA

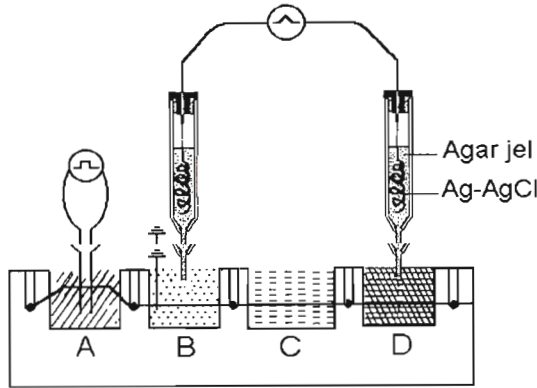
kilediğini göstermiştir. Lokal anestetikler sinir impuls oluşumuna yol açan sodyum iyonlarının zardan geçişini engelleyerek sinir iletimini bloke etmektedirler⁵.

Prokain, bileşik aksiyon potansiyelinin genişliğini doza bağlı olarak geri dönüşlü bir şekilde azaltmaktadır². Yapılan araştırmaların sonucunda prokainin, iletimi bloke eden konsantrasyonlarca zarı depolarize etmediği görülmüştür. Prokain'in indirekt bir davranışla zara bağlı kalsiyumun yerini değiştirdiği ve sodyum iyon transportunu etkilediği düşünülmektedir^{1,4}.

Bu araştırmanın amacı, bir ekstrasellüler kayıt yöntemi olan sukro-gap tekniğini kullanarak ester yapılı bir lokal anestetik olan prokain'in BSAP'ın latans, depolarizasyon zamanı ve yarı repolarizasyon zamanı ile bileşik dinlenim potansiyeli (BDP) üzerindeki etkilerini belirlemektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmada ağırlıkları 70-80 gram arasında değişen kurbağalar (*Rana cameranoi*) kullanıldı. Dekapite edilen kurbağalardan 5-7 cm uzunluğundaki siyatik sinir demetleri çıkarıldı. Desheet edilen sinir demeti ringer içerisinde 8-10°C de yaklaşık bir gün bekletildi. Çalışmaya başlamadan önce çıkarıldı ve izotonik sukroz çözeltisinde yaklaşık 20 dakika bekletildikten sonra sukroz-gap aparatına uygun şekilde yerleştirildi (Diyag. 1).



Diyagram 1. Sukroz-Gap Aparatı: Bölümümüzde tasarlanıp, geliştirilen sukroz-gap aparatının şematik diyagramı. Her bölmede sinirin geçtiği yatay ve izolasyon için vazelin pompalandığı dikey kanalları bulunmaktadır. A bölümünde uyarıcı elektrotlar ve mineral yağı; B bölümünde toprak ve aktif elektrot, C bölümünde izotonik sukroz ve D bölümünde referans elektrot ve izotonik KCl bulunmaktadır. B bölümüne konan prokainli frogginger ile BDP'ni kayıtlamak için agar-jel Ag-AgCl elektrotları kullanıldı.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmalarımızda, aparatın B ve D bölgesi ringerde iken potansiyel farkı 0,D bölgesi izotonik KCl olunca D, B ye göre 44,1 mV depolarize olmaktadır. Daha sonra B bölgesine farklı konsantrasyonlarda KCl koyunca bu bölmedeki sinir zarının depolarize olduğu, konsantrasyon arttıkça depolarizasyonun arttığı ve B ile D arasındaki potansiyel farkın azaldığı görülmektedir (Şek.1) Bileşik sinir aksiyon potansiyeli (BSAP) ve bileşik dinlenim potansiyeline (BDP) ait kontrol değerleri Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1. Sukroz-gap tekniği ile kayıtlanan BSAP parametreleri ve BDP'nin 0 mM (kontrol)'daki değerleri

Kontrol Değerleri (0 mM)	BSAP				BDP (mV)
	V (mV)	T _L (ms)	T _{DE} (ms)	½T _{RE} (ms)	
54.3 ± 5.8	0.240 ± 0.3	0.392 ± 0.1	0.425 ± 0.1	44.1 ± 4.7	

Prokain'in, konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak BSAP'ın genişliğini (V) azalttığı, depolarizasyon zamanını (T_{DE}), yarı repolarizasyon zamanını (½ T_{RE}) ve latans'ı (T_L) arttırdığı, BDP'in ise hiperpolarize ettiği görülmektedir (Tablo 2,3 ve Şek.2-6).

Tablo 2. Prokainin konsantrasyona bağlı olarak BSAP'ın genişliğine ve BDP'ne etkisi. Ortalama genlikler yüzde (%) (normalize) değerler olarak verilmiştir.

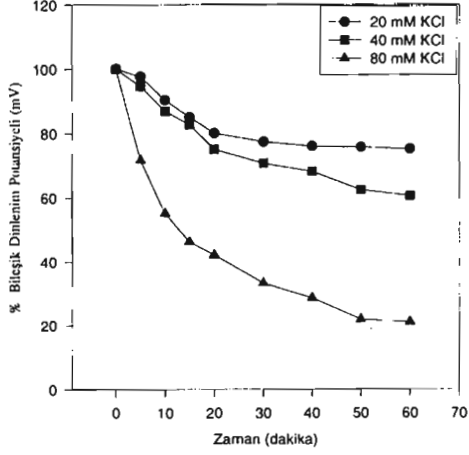
Gözlem Zamanı (dak)	BSAP			BDP		
	1 mM	2.1 mM	4.2 mM	1 mM	2.1 mM	4.2 mM
0	100	100	100	100	100	100
5	92.5	81.3	77.1	112.5	115.3	118.8
10	89.7	75.0	64.5	116.2	118.5	127.2
15	87.7	69.5	56.6	117.8	120.8	128.9
20	85.9	68.0	49.0	118.2	123.6	130.0
30	83.1	62.3	39.5	120.4	125.8	131.2

Lokal anestetikler sinir zarındaki sodyum kanallarını bloke etmektedir³. Tek sinir lifi ile yapılan voltaj-clamp çalışmalarında sinir zarının iç bölgesinde sodyum kanalları ile anestetik moleküllerin birbirlerini direkt olarak etkilediği ve lokal anestetik moleküllerin, sinir impuls oluşumuna yol açan sodyum iyonlarının zardan geçişini engelleyerek sinir iletimini bloke ettikleri belirlenmiştir⁵. İskelet kası ile yapılan çalışmalarda ise prokain'in iletimi bloke eden konsantrasyonlarda zarı depolarize etmediği görülmüştür^{1,4}.

Çalışmamızda kullandığımız prokain ester yapılı bir lokal anestetiktir. Prokainin doza bağlı olarak BSAP'ın genişliğini azaltması muhtemelen zar sodyum iletkenliğinin düşmesi sonucunda olmaktadır⁵. BSAP genişliğiyle birlikte depolarizasyon süresinin ve latans'in uzaması sodyum kanallarının bir kısmının kapalı olduğunu ve/veya kanal kapılarının açılma-kapanma kinetiklerinin düştüğünü gös-

termektedir. $1/2$ RT süresinin uzaması ise potasyum kanallarının da prokainden etkilendiğini ve kanal kapılarının açılma-kapanma süresinin uzadığını düşündürmektedir.

KCl - BDP-ZAMAN İLİŞKİSİ



Şekil 1. Farklı KCl konsantrasyonlarında BDP'nin uygulama anından itibaren zamanla değişimi.

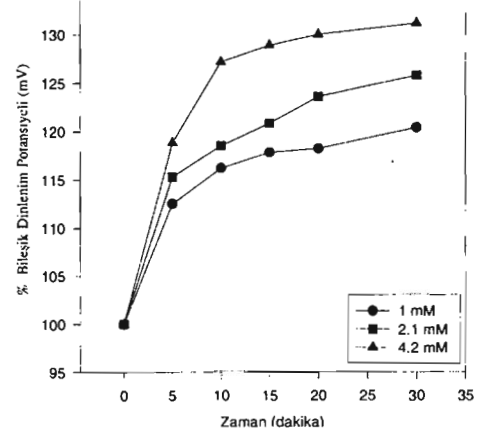
Bununla birlikte prokain ketamine benzer bir etki yaparak sodyum inaktivasyon kapısının kapanma hızını yavaşlatmış ve BSAP'ın toplam süresini uzatmış olabilir⁶.

Prokain BDP'ini inhibe etmektedir (Şek. 2). Muhtemelen iletim blokajına bu inhibisyonda katkıda bulunmaktadır.

Tablo 3. Prokainin konsantrasyona bağlı olarak BSAP'ın depolarizasyon zamanı (T_{DE}) ve yarı repolarizasyon zamanı ($1/2 T_{RE}$) ve latans (T_L) parametreleri üzerindeki etkisi. Ortalama süreler yüzde (%) (normalize) değerler olarak verilmiştir.

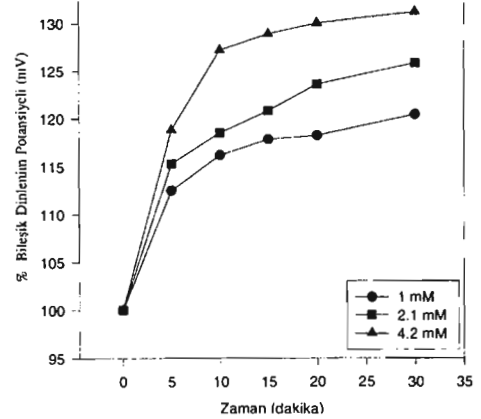
Güçlem Zamanı (dak)	T_L			T_{DE}			$1/2 T_{RE}$		
	1 mM	2.1 mM	4.2 mM	1 mM	2.1 mM	4.2 mM	1 mM	2.1 mM	4.2 mM
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	101.9	107.4	114.6	96.8	110.9	124.4	101.2	104.3	106.1
10	103.3	115.1	125.4	102.3	123.9	145.6	104.5	108.0	115.1
15	105.5	120.3	128.6	106.6	137.0	165.6	107.2	114.1	128.2
20	108.7	123.1	129.6	112.2	151.7	175.8	116.9	121.8	139.2
30	111.2	126.1	131.5	120.1	167.2	190.3	122.9	128.9	151.3

DOZ - BDP-ZAMAN İLİŞKİSİ



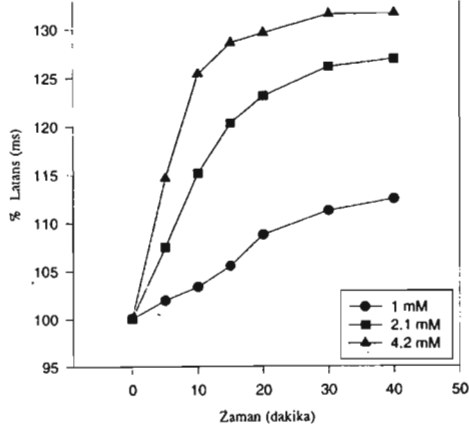
Şekil 2. Farklı prokain konsantrasyonlarında BDP'nin uygulama anından itibaren zamanla değişimi.

DOZ - GENLİK-ZAMAN İLİŞKİSİ



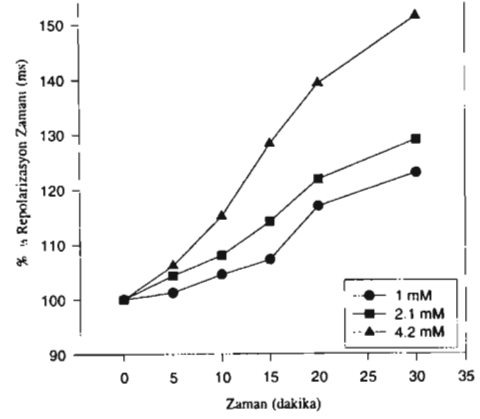
Şekil 3. Farklı prokain konsantrasyonlarında Genliğin uygulama anından itibaren zamanla değişimi.

DOZ - LATANS - ZAMAN İLİŞKİSİ



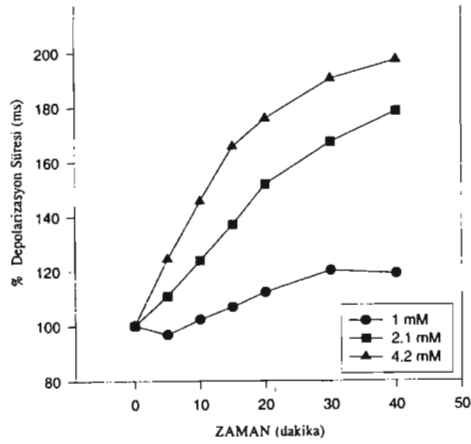
Şekil 4. Farklı prokain konsantrasyonlarında latansın uygulama anından itibaren zamanla değişimi.

DOZ - 1/2 RT - ZAMAN İLİŞKİSİ



Şekil 6. Farklı prokain konsantrasyonlarında 1/2 RT'nin uygulama anından itibaren zamanla değişimi.

DOZ - DT - ZAMAN İLİŞKİSİ

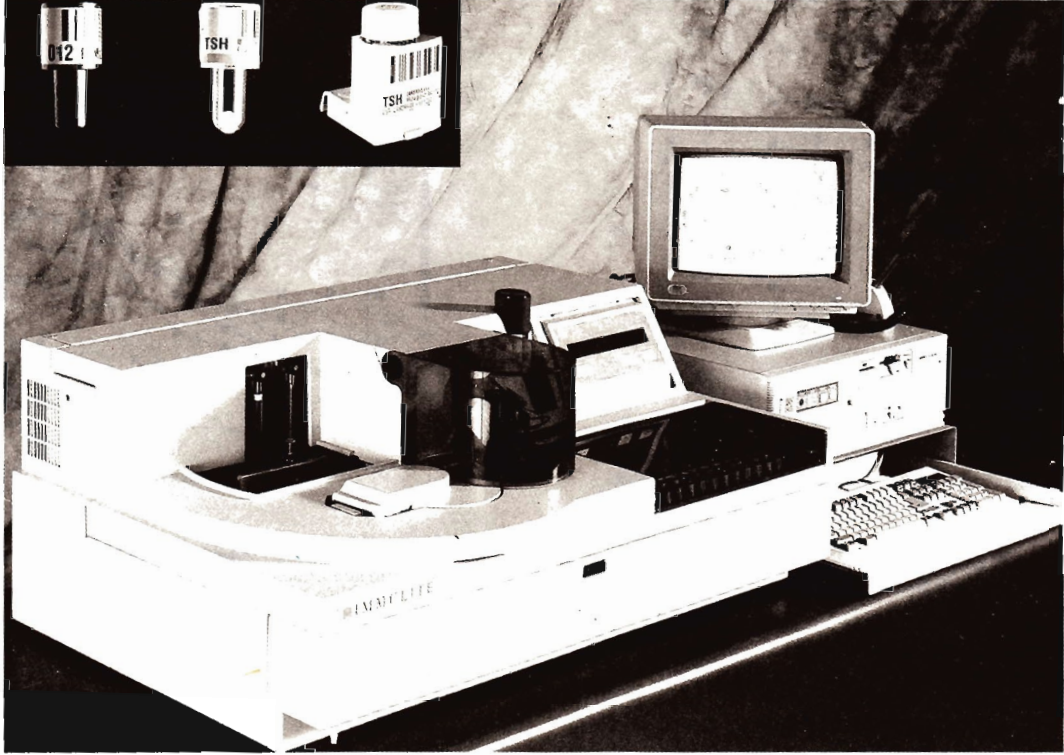


Şekil 5. Farklı prokain konsantrasyonlarında DT'nin uygulama anından itibaren zamanla değişimi.

KAYNAKLAR

1. Inoue F. and Franil Gb.: Action of procaine on frog skeletal muscle. *J. Pharmacol Exp. Ther*, 136:190-196, (1962).
2. Butterworth JF., Lief PA., Strichartz FR.: The PH-dependent local anesthetic activity of diethylaminoethanol, a procaine metabolite: *Anesthesiology*, 68:501-506, (1988).
3. Trişpa M., Sahını EM, NAE C., Vasilescu V.: Structure / Nerve membrane effect relationships of some local anesthetics. *Gen Physiol Biphys*, 5:371-376, (1986).
4. Strobel GE. and Bianchi P.: The affects of PH *Pharmacol Exp Ther*, 172(1) : 1-17, (1970).
5. Strichartz G.: Molecular mechanisms of nerve block by local Anesthetics. 15(4):421-441, (1976).
6. Mohammed A. Maleque, Jordan E. and Edson X. Albuquerque: The mechanism and Site of Ketamine on skeletal muscle. *J. Pharmacol Exp Ther*, 219(3):638-645,(1981).

TAM OTOMATİK CHEMILUMINESCENT IMMUNOASSAY SİSTEM



"Bir otomatik immunoassay sistemden istenebilecek herşey"

- Baştan sona tam otomasyon,
- Gerçek "Continuous Random Access "
- Yüksek hız:120 Test /Saat,
- Yüksek performanslı chemiluminescent (LEIA) testler,
- Stabil ve etkin kalibrasyon,
- Güçlü ve kullanışlı program,
- DPC RIA ile uyumlu geniş menü :

Tiroid,
Fertilite,
Tümör Marker,
Terapötik Marker,
Alerji Tarama,

Anemi,
Diabet,
Adrenal,
Uyuşturucular,
Inf.Hastalıklar v.s.

biobak
LABORATUAR MALZEMELERİ
SANAYİ VE TİCARET A.Ş.

Biyofizik Derneği Adına Sahibi ve Yazı İşleri Müdürü : Engin Bernek

Yayın Kurulu : Rüstem Nurten, Salih Çelik, Seralp Şener

Yönetim Merkezi : Biyofizik Derneği

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı 34390 Çapa - İSTANBUL

Tel & Fax: (0212) 635 11 53