

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Layşmanyazis; kemirgenlerin ve köpeklerin rezervuar olduğu ve hafif olarak atlattığı zoonotik bir hastalıktır. İnsanlara hastalığı bulaştıran dişi tatarcıklar yumurtalarını olgunlaştırmak için her gonadotropik siklusta bir, iki veya daha fazla kan emmek zorundadır. Tatarcıklar rezervuarlar ve enfekte insanları ısırıklarında layşmanyazis'in amastigot formunu alır bağırsaklarında promastigot haline dönüştürür, insanları tekrar ısırıklarında promastigotla enfekte etmiş olur. İnsanda promastigotlar savunma hücreleri olan makrofajlar tarafından fagosite edilir, fakat öldürülemez makrofajların içerisinde amastigotlara dönüşür, parazitin çoğalması ve enfeksiyonun yayılımı makrofajlar içerisinde olur.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre Layşmanyazis 88 ülkede endemik olarak görülmekte ve 350 milyon insan risk altında bulunmaktadır. Layşmanyazis'in dünyada 12 milyon kişiyi etkilediği ve her yıl 1,5 – 2 milyon yeni vakanın tespit edildiği tahmin edilmektedir(15).

İnsanda Layşmanyazis'in visseral formu tedavi edilmediği takdirde öldürücü olabilirken, kutanöz Layşmanyazis *Leishmania Tropika Major*'ün neden olduğu lokal olarak deri ve mukozayı tutan tedavi edilmediği takdirde 1-2 yılda spontan iyileşebilen kronik granulomatöz bir hastalıktır. Hastalık tedavi edilmediği takdirde bakteriyel enfeksiyonlarında süperpozisyonuyla kalıcı skarlar neden olabilmektedir. En sık açık olan yüz bölgesi tatarcıkların ısırmasına maruz kaldığı için erkeklerde ve özellikle bayanlarda estetik problemlere neden olmaktadır(8).

Hastalığın tedavisinde ilk seçenek olarak etki mekanizması tam aydınlatılmamış olmakla birlikte beş değerli antimony bileşikler kullanılmaktadır. Geri kalmış ülkelerde eğer lezyonlar yaşamsal organların yanında değilse kemoterapinin yan etkileri ve maliyeti nedeniyle WHO tedavi önermemektedir. Tedavide ikinci seçenek ilaçları Pentamidin ve Amfoterisin-B 'dir. Ancak bunlar toksisiteyi yüzünden diğer ilaçlara yanıt alınamayan durumlarda kullanılmaktadır(8).

Dokulardaki makrofajlar ve mononükleer fagositik hücreler çoğu enfeksiyon ajanını yok eden başlıca hücrelerdir. Bu duruma ters olarak *Layşmanyazis'in* de dahil olduğu çeşitli protozoa, bakteri, mantar, virüs türleri makrofajların ve mononükleer fagositik hücrelerin içinde yaşar. Bağışıklık sisteminin yardımı ile bu mikroorganizmaların öldürülme işi de yine makrofajlar içerisinde gerçekleşmektedir. Bu işlevi de geniş bir yelpazesi olan toksik moleküller ve hidrolitik enzimler aracılığıyla yaparlar. Protozoonun öldürülmesinde T hücrelerince makrofajların aktivasyonu sonucu reaktif oksijen metabolitleri (ROS: süperoksit, hidrojen peroksit), reaktif nitrojen metabolitleri (RNS: nitrik oksit, nitrojen dioksit) ve lipit türevleri (prostaglandin, lökotrien) üretiminin etkili olduğu bildirilmiş ve bu aktivasyonu da pro-enflamatuar sitokinlerin regüle ettiği gösterilmiştir.

Layşmanyazis'in; tıbbi önemi olan dört türü vardır ve çok sayıda alt türü vardır. *L.Mexicana* kompleksi, *L.Donovani* kompleksi ve *L.Braziliensis* kompleksi olarak tanımlanır. Bunların alt türleri kendi aralarında oldukça homojen antijenik benzerlik taşırlar. *L.Tropica*'nın alt türleri ise antijenik açıdan heterojendir.

Bu çalışmada hedefimiz layşmanyalı hastalarda oksidan ve antioksidan denge parametrelerinin L-Arginin-NO yolu arasındaki korelasyonunun nasıl değişim göstereceğini amaçladık. Bu amaçla Antimon tedavisini alan hastaların tedavi öncesi ve tedavi sonralarındaki kanları alındı ve plazması ayrıldı. (total oksidan seviye)TOS, (total antioksidan kapasite)TAK, Nitrit, Nitrat, Arginaz parametreleri çalışıldı.

Bu parametrelerin çalışılması, yapılan işlemler materyal ve metot kısmında özetlendi. Elde edilen sonuçlar bulgular kısmında tablo ve şekiller yardımıyla ortaya konuldu. Daha sonra sonuçlar, konuyla ilgili önceden yapılmış çalışmalar ve literatürlerin desteğiyle açıklanarak tartışıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Layşmanyazis

Layşmanyazis; *Leishmania* genusuna bağlı protozoon parazitlerce oluşturulan hastalık grubuna verilen genel isimdir. *Leishmania* parazitinin Sir William Leishman ve Donovan tarafından isimlendirilmesinden sonra bu genus 1903 yılında Ross tarafından Kala-azar etkeni *Leishmania Donovanii*'yi de içine alacak şekilde tanımlandı. *Leishmania* genusu *Trypanosomatidea* ailesinden bir protozoan parazit grubunu oluşturmaktadır(8).

Tablo 1 : *Leishmania* Parazitlerinin Klasifikasyonu(8)

Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcomastigoohora
Order	Kinetoplastida
Suborder	Trypanosamatina
Family	Trypanosomatidea
Genus	Leishmania

2.1.1. Epidemiyoloji

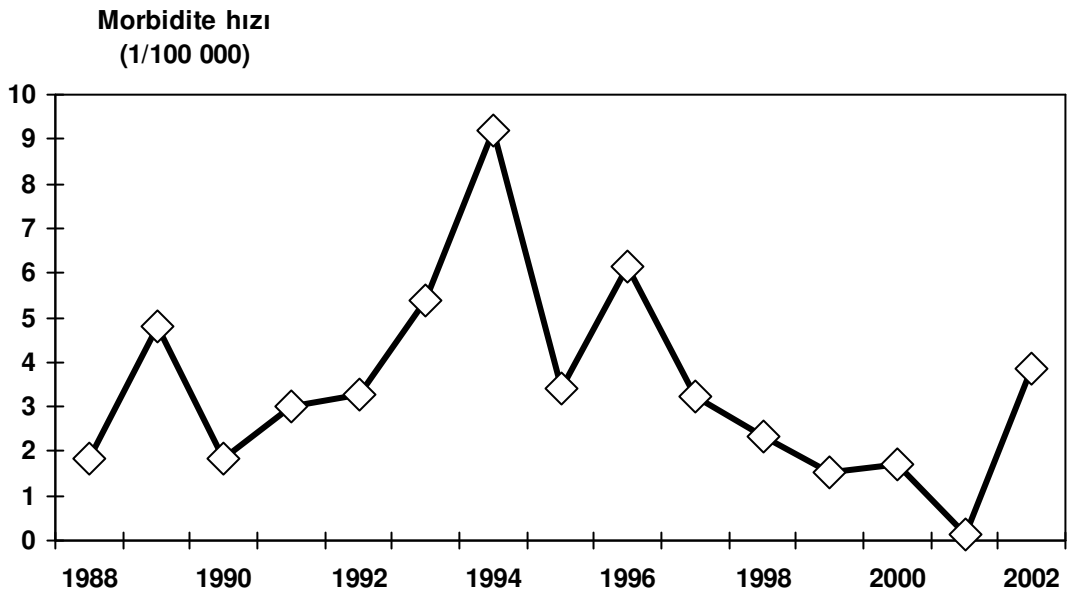
Layşmanyazis kemirgenlerde ve köpeklerde sık rastlanan bir zoonozdur. Yaygın olarak rezervuarlar, Layşmanyazis enfeksiyonuna adapte olarak genellikle deride hafif lezyonlarla olayı atlatabilmekte ve onlar için enfeksiyon öldürücü olmamaktadır. Sadece *Leishmania Infantum* köpeklerde ölümcül hastalığa neden olabilmektedir. Vektör olarak eski dünyada Phlebotomus türleri, yeni dünyada ise Lutzomyia türleri bulunmaktadır.

Tatarcıkların her iki cinside genellikle şeker içeren bitki özleriyle beslenmektedir ve dişi tatarcıklar yumurtalarını olgunlaştırmak için her gonadotropik siklusta bir, iki veya daha fazla kan emmek zorunda kalmaktadırlar. Enfekte tatarcıkların 30 gün kadar canlı kalabildikleri saptanmıştır. Enfekte tatarcıkların bağırsağı kısmen promastigotlarla tıkalı olması nedeniyle kan emme sırasında konağı birkaç kez delmek zorunda kaldığı için bulaşma riski artmaktadır. Rezervuar ve vektörler aynı ortamda bulduklarında enfeksiyonun yayılışı ve rastlantısal ara konak olan insan olguları daha fazla olabilmektedir(7,13).

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre layşmanyazis şimdilerde 88 ülkede endemik olarak görülmekte ve 350 milyon insan risk altında bulunmaktadır. *Layşmanyazis*'in dünyada 12 milyon kişiyi etkilediğine inanılmaktadır ve her yıl 1,5 – 2 milyon yeni vaka olduğu tahmin edilmektedir ancak bunların 600.000 kadarı resmi olarak açıklanmaktadır. Meydana gelen 500.000 yeni Visseral *Leishmania*'lı olgunun %90'ı Bangladeş, Brezilya, Hindistan, Nepal ve Sudan'da, Mukokütanöz *Leishmania*'lı hastaların %90'ı Bolivya, Brezilya ve Peru da, Kütanöz *Leishmania*'lı olguların %90'ı ise Afganistan, Brezilya, İran, Suudi Arabistan ve Suriye'de gözlenmektedir(114). Ülkemizde ve Şanlıurfa bölgemizde son beş yıla kadar *Layşmanyazis*'li hasta sayısı azalma eğilimi göstermekteydi. Şark çıbanı için morbidite hızları 5-6 seviyelerinden 1.5'in altına düşmüş, toplam vaka sayıları 3-5 binli seviyelerden binin altına gerilemişti. Bölgemizde Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) ile sulama alanlarının artması, bilinçsiz hayvancılığın ilerlemesi, antimon ilacının ithalinde yaşanan sıkıntılarla hastaların tedavi edilememesi nedeniyle son zamanlarda çok hızlı bir artış göstermiştir. Sadece ilimiz Şanlıurfa bölgesinde görülen Şark çıbanı vaka sayısı 2000 yılında 271 iken 2003 yılında 1432'ye yani tüm Türkiye'de 2000'li yıllara kadar görülen toplam hasta sayısından daha fazla seviyeye yükselmiştir. 2004 yılında da durum değişmemiş yılın ilk dört ayında 943 vaka tespit edilmiştir ki; 3 yıl önceki Türkiye'deki toplam vaka sayısına yakındır(10,11).

Tablo 2: Şark çıbanı vaka sayıları morbidite hızları, Türkiye 1988-2002

Yıllar	Yıl Ortası Nüfus	Vaka Sayısı	Morbidite Hızı (100.000)
1988	54176000	1005	1,86
1989	57426316	2743	4,78
1990	57582446	1056	1,83
1991	57736288	1732	3,00
1992	59088101	1935	3,27
1993	60384474	3235	5,36
1994	61779288	5692	9,21
1995	63206510	2158	3,41
1996	62727000	3857	6,15
1997	63745000	2038	3,20
1998	64786000	1499	2,31
1999	65819000	1010	1,53
2000	67844903	1135	1,67
2001	69081716	994	1,44
2002	70415064	2721	3,86



Şekil 1: Şark çıbanı morbidite hızı, Türkiye 1989-2002

Tablo 3 : Şanlıurfa'da şark çibani vaka sayıları ve dağılımı

Yaş grupları	2000	2001	2002	2003
0 yaş	4	4	3	8
1-4 yaş	49	62	112	233
5-9 yaş	69	101	209	387
10-14 yaş	55	53	148	240
15-24 yaş	36	56	87	218
25-44 yaş	40	50	131	262
45-64 yaş	15	28	38	67
65+ yaş	3	3	5	17
TOPLAM	271	357	733	1432

2.1.2 Cutaneous Layşmanyazis'e Neden Olan Parazit Hastalıkları Etkenleri

CL'ye sebep olan etken layşmanyaya cinsi protozoondur ve enfekte kum sinekleri (*phlebotomus*, *lutzomyia*, tatarcık, yakarca,) tarafından kan emme işlemi sırasında bulaşmaktadır. CL etkenleri; eski dünyada *LTtropica*, *L.Majör* ve *L.Aethiopica*'dır. Yeni dünyada ise *L.Mexicane*, *L.Braziliensis*, *L. Pensviana*, *L.Panamensis*'tir.

2.1.3. Ülkemizde Görülmeyen Ve Deri Ülserine Neden Olan Layşmanyazis Türleri

2.1.3.1 *L.aethiopica*: Kronik deri layşmanyazis etkenidir, Habeşistan, Kenya ve Yemende görülür. Rezervuarı, kayalık yerlerde yaşayan hyrax denilen kemirici memelilerdir. Ülser derinin yanı sıra mukozaya da yayılabilir. Yaygın deri lezyonları görülebilir.

2.1.3.2. *L.mexicana*: Bu parazit ve alt türleri yeni dünyada deri layşmanyası etkenleridir. Kuzey ve orta Amerikada, Meksika ve Teksasda görülmektedir. Kulaktaki enfeksiyonlar dışında birkaç ay içinde kendiliğinden iyileşebilir.

2.1.3.2-a. *L.m.mexicana*: Bu parazit tarafından oluşturulan yaraya “şiklero” adı verilir. Yüz ve kulaklarda görülür, kulağın kıkırdak dokusunu tahrip eder.

2.1.3.2-b. *L.m pifanoi*: Brezilya ve Venezuelada görülür. Yaranın kenarı düzensiz olduğu için lepra ile karıştırılır.

2.1.3.2-c. *L.m amazonensis*: Yaygın deri lezyonlarına neden olur. Rezervuarları ormanda yaşayan küçük memelilerdir. “Espundia” adı verilen deri hastalığının etkenidir. Lezyon genelde ağızda veya burun mukozasındadır. Lezyon sayısı çoktur ve geniştir. Lezyonun gelişimi ülkemizde de görülen şark çıbanının gelişimine benzer ülserasyonlarda ise burun, dudak ve damağın yumuşak kısımları tahrip olur. Genelde ikincil enfeksiyonlardan dolayı ölüm görülür. Orman kemiricileri ve köpekler rezervuardır.

2.1.4. Layşmanyazis Yapısı ve Yaşayışı

Layşmanyazis türlerinde amastigot ve promastigot olmak üzere iki evrim şekli vardır. Amastigotlar insan ve başka memelilerin vücudunda kamçısız hareketsiz olan, 2 – 4 µm boyutlarında, oval, genellikle hücre içerisinde bazen de dışında tespit edilebilen, giemsa ile boyanan preparatlarda pembe veya koyu kırmızı boyanan, oldukça büyük bir nükleus, hemen nükleus yanında yer alan parlak koyu kırmızı veya menekşe renginde çomak tarzında kinetoplast ve pembe renkli sitoplazma içerir. Promastigotlar ise tatarcık vücudunda ve besi yerlerinde görülen, hareketli, 12 – 20 µm boyutlarında, ortasında nükleus, ön kısmında kinetoplast ve vücut uzunluğunda ya da daha uzun olabilen hareketi sağlayan kamçı ile dikkati çeken şekildedir. Elektron mikroskopik incelemede plazma membranının tipik olarak üç katlı olduğu, hücreye destek görevi de yapan 2 – 4 nm’lik bir yapı olan pelikül altı mikrotübülleri bulunduğu açıklanmıştır, makromoleküllerin hücre içine alınışında rol oynayan bu mikrotübüllerin sayıları ve

merkezden uzaklıkları gibi özellikleri *Leishmania* türlerinin ayrımında kullanılmaktadır. Aksonem; 9 çift periferel fibril çiftinin merkezi bir çift fibrili çevrelemesi ile oluşmakta ve bleforoplast ile kinetoplastın önünde yer aldığı bilinmektedir. 7nm kalınlığında, çift tabakalı nükleus membranının üzerinde porlar bulunmakta olup, kromatin nükleusta daha çok periferde yerleşmiştir ve nükleolusla aynı yoğunlukta olduğundan boyalı preparatlarda farklı olarak gözlenmemektedir. Dıştaki nükleus zarının endoplazmik retikulum ile devam ettiği ve bunun yanında sitoplazma içerisinde golgi cisimciği, lizozomlar, lipid ve mikrocisimciklerin bulunduğu da tespit edilmiştir(8,14).

Layşmanyazis aeorop canlılardır. İnsan vücudunda bulunan amastigot şekli hareketsizdir, beslenmesi osmozladır ve gıdayı dokulardan alır. Çoğalma boyuna ikiye ayrılarak ve büyük makrofaj hücreleri içinde olur. Önce kinetoplast ve bleforoplast sonra çekirdek ve sitoplazama bölünür. Bir hücre içerisinde birçok parazit görülebilir. Makrofajlara yerleşme promastigotların amastigotlara dönmesine, hücre dışı ise aksine yol açmaktadır. *Leishmania* NNN: Novy, Nicole, ve McNeal baş harflerine göre adlandırılmış tavşan kanlı tuzlu agar agarda kolayca üretilir. Burada 2 – 3 gün içerisinde amastigotlardan promastigotlar ortaya çıkmaktadır(14).

2.1.5. Layşmanyazis Kliniği

Dünya Sağlık Örgütünce oluşan klinik tabloya göre, *Leishmania* kliniği ve etkenlerinin sınıflandırılması aşağıdaki tabloda 4'te özetlenmiştir. *Leishmania* pratik olarak başlıca; Visseral, Kutanöz, Mukokutanöz olmak üzere 3 klinik form oluşturmaktadır.

Tablo 4: Layşmanyazis kliniği ve etkenlerine göre sınıflandırılması(6,13)

Klinik		Etkeni
İç Organ Layşmanyazisi (Visseral Layşmanyazis)		L. Donovanii
		L. Infantum
		L. Chagasi
Deri Layşmanyazisi (Cutaneous Layşmanyazisi)	Şark çıbanı ve Şikleryo	L. Tropika
		L. Major
		L. Aethiopica
		L. Mexicana
	Pianbiosis	L. BraziliensisGuyanensis
	(Orman çıbanı)	L. B. Panamensis
	Uta	L. Peruvuiana
Mukokutanöz Layşmanyazis (Espundia)		L. B. Brasiliensis

2.1.5.1 İç Organ Layşmanyazisi (Visseral Layşmanyazisi)

Visseral Layşmanyazisi'in (VL) prognozu genelde hastalar arasında benzerlik göstermekle beraber başlangıcında farklılıklar olabilmektedir. Hastalığın şiddetine ve kronikliğine bağlı olarak klinik bulgular değişebilmektedir (3).

İnkubasyon döneminin 2-3 haftadan 2 yıla kadar değişebildiği, ortalama 2-4 ay sürdüğü, Türkiye'de 2 - 6 yaş arası çocuklarda daha sık olarak gözlenen enfeksiyonun, erişkinlerde nadir olarak saptandığı bildirilmektedir. Enfeksiyon ateşin ani olarak 39-40 °C'e çıkması ile başlayabildiği ve genellikle sinsi olarak başladığı, halsizlik, baş ağrısı, baş dönmesi, iştahsızlık, öksürük veya diyare bazı vakalarda erken safhalarda gözlemlendiği açıklanmıştır. Akdeniz Kala Azar'ında tatarcığın soktuğu yerde bazen bir sertlik oluşabilmekte, başlangıç dönemindeki subfebril ateş, ortalama 2 hafta içerisinde yerini günde 2 kez yükselen bol terleme ile düşen

ateşe bırakmaktadır. Her ateş atağından sonra dalağın biraz daha büyüdüğü gözlenmekte olup klinik olarak VL'in akut, subakut ve kronik şekilleri bulunduğu bildirilmektedir(14).

Subakut form; klinik olarak en sık rastlanan şekildir ve akut forma göre daha belirgin seyretmektedir. Klinik tablosu ateş hepatosplenomegali ve pansitopeni ile kendini göstermektedir. Günde 2 kez inip çıkan ateş tipiktir, fakat hasta genelde kendisini iyi hissetmektedir. Fizik muayenede karaciğerden çok daha büyük olan dalak, sol kosta sınırını 5 - 15 cm aşmaktadır. Ateş yükselişleri ile dalağın başlangıçta yumuşak daha sonraki dönemlerde ise sert olarak fizik muayenede ele gelecek şekilde büyüdüğü gözlenmektedir. Karaciğer birinci ayın sonundan itibaren büyümeye başlar. Hastalık ilerledikçe kilo kaybı ve anemi belirginleşmekte, ancak tüm bunlar hastanın normal yaşamını etkileyecek düzeyde olmamaktadır. Tedavi edilmeyen semptomatik vakalar genellikle öldürücü olmakta ancak, yapılan çalışmalarda tedaviye rağmen de % 1 ile % 11 arasında değişen oranlarda hasta kaybedilebildiği bildirilmektedir. Ölüm nedenleri olarak gastrointestinal sistem kanamaları, anemiye bağlı gelişen kalp yetmezliği ve karaciğer yetmezliği rapor edilmektedir.

Akut şekil; şiddetli burun, diş eti, barsak kanamaları ile kemik iliği baskılanmasına bağlı oluşmuş pansitopeni tablosunu daha da ağırlaştırarak ilerlemekte ve tabloya gastrointestinal sisteme ait, özellikle diyare şikayetlerinin eklenmesi ile hastanın genel durumu bozulmakta, hasta 2-3 ay içerisinde kaybedilmektedir.

Kronik vakalar ise subakuttan daha silik bir tablo yaratırken, bu olgularda zayıflama, karaciğer ve dalak büyüklüğü dışında genelde hastalarda bir şikayet olmayıp, genel yaşantılarına normal olarak devam ettikleri belirtilmektedir(1,9).

2.1.5.2. Deri Layşmanyazisi (KL) (Cutaneus Layşmanyazis)

İnsan için patojenik olan herhangi bir *Leishmania* türü kutanöz lezyon oluşturabilir. Eski Dünya KL'nin etkeni genellikle *L. majör*, *L. tropica*, *L. aethiopica* ve *L. infantum*'dur. Morfolojik olarak tipik KL lezyonu volkanik nodül olarak tanımlanmaktadır. Yanı sıra, yumuşak nodüller, ülserler, satellit papüller, subkütan nodüller ve buzdağı nodül olarak adlandırılan özel tipler tanımlanmıştır.

Şark çıbanı her yaşta görülebilir. Genellikle vücudun örtülmeyen kısımlarında yerleşir. En çok yüz, ense ve ekstremitelerde görülür. Ancak, gövdede, saçlı deride ve hatta peniste lokalize olduğu bildirilmiştir. Parazitin organizmaya girişinden sonra ilk lezyonun belirebilmesi için 2-12 haftalık bir devrenin geçmesi gerekir (genellikle 5 hafta). Daha uzun kuluçka dönemleri de bildirilmiştir. Hastalık klinik bulgular bakımından başlıca iki gruba ve alt gruplara ayrılır(8).

I) Lokalize deri layşmanyazisleri:

1- Akut Deri Layşmanyazisi:

a) Kuru tip

b) Yaş Tip

2- Kronik Deri Layşmanyazisi

3- Rezidivan Layşmanyazisi

II) Generalize deri layşmanyazisleri:

1-Diffüz Deri Layşmanyazisi

2-Leishmanid

2.1.5.2.1. Lokalize deri layşmanyazisleri

Akut Deri Layşmanyazisi: Akut deri leishmaniasisinin kuru tip ve yaş tip olmak üzere iki klinik türü vardır.

Kuru Tip Deri Layşmanyazisi: Etkeni *Leishmania tropica* minör olup özellikle kentlerde görülür. İki aydan daha fazla süren kuluçka döneminden sonra Phlebotomların ısırıldığı yerlerde küçük, kaşıntılı 2-3 mm. çapında kahverengi-kırmızı renkte, kenarları düzensiz bir papül oluşur. Papülün zemini biraz kanlıdır. Papül yavaş yavaş büyür, çevresine yayılır, alt dokulara infiltre olarak bir tüberkül veya nodül haline geçer. Bu nodül hafif sert kıvamlı, yüzeyi parlak kırmızı-mor renktedir. Üzerinde hafif bir deskuamasyon vardır. Zamanla merkezden başlayan bir ülserasyon gelişir, 3-4 ay içinde bu ülserasyon üzerinde sert bir kurut oluşur ve bu kurutun kaldırılması güçtür. Kurut kaldırıldığında alt yüzünde pek ince olmayan uzun çıkıntılar görülür. Buna Hulusi Behçet'in "Çivi belirtisi (Signe de clou)" adı verilir. Çivi belirtisini meydana getiren epitelyal uzantılardır. Bu uzantılarda paraziti bulmak kolaydır. Çivi belirtisi hastalığın

başlangıcından 3-4 ay sonra belirgin olur. Lezyonlar genellikle 1-2 cm. çapında olup, bazen daha büyük veya küçük olabilir. Sayıları genellikle tektir, fakat bazı olgularda birkaç tane görülebilir. Ağrısız olan lezyonlarda bol parazit bulunur. Sekonder enfeksiyonlar geliştiğinde lezyonlar ağrılı olur. 8-12 ayda ülserle lezyon, granülasyon dokusunun belirmesiyle skatris bırakarak iyileşir. Böylece hastalık bir yıl kadar sürdüğünden bazı yörelerde buna “Yıl Çıbanı” adı da verilir.

Yaş Tip Deri Layşmanyazisi: Etkeni *Leishmania Tropica majör*'dür. Hastalığın seyri daha hızlıdır. Daha çok kırsal alanlarda görülür. Lezyonlar 1-2 haftada ülserleşir, lezyonlarda parazit sayısı az olup iyileştiğinde derin skatrisler bırakır. Olguların % 70'inde lenf bezleri tutulur. Lezyonlar genellikle ekstremitelerde yerleşmişlerdir. İki aydan az bir kuluçka döneminden sonra enfekte Phlebotom'un soktuğu yerde kırmızı, ödemli, ağrılı bir papül oluşur. İnokülasyon yerinin çevresini 5-10 mm. çapında papüller sarar. Daha sonra çapı 1-2 cm. ye kadar varan bir nodül halini alır. İki hafta sonra bu nodül merkezden ülserleşir ve kızarır. Ülser genişlerken kabarır. 2-3 ay devam eden lezyonlar 3-6 cm. çapına erişir. Ülserasyon çevresi konjesyonlu, hafif sert ve ağrılıdır. Kurut kaldırılırsa veya düşerse 1-3 mm. derinliğinde bir ülser gözlenir. Kenarları belirgin ve düzensizdir. Lezyon yakınındaki lenflerde lenfanjit gelişir. İyileşme genellikle bir kaç aydan bir yıla kadar sürer ve yerinde skatris bırakır.

Kronik Deri Layşmanyazisi: Yaşlı insanlarda hastalık kronik bir hal alabilir. Çocuklarda bir yılda iyileşirken, yaşlılarda yıllarca sürebilir. En çok görüldüğü yer yüzdür. Lezyonlar tek veya çok sayıda ve değişik büyüklükte eritemli, infiltrate plaklar halindedir. Bölgesel lenfadenopati, drenaj ve akıntı yoktur. Kronik ağrısız bir seyir gösterir. Histolojik olarak üst ve alt dermiste Langhans dev hücrelerinin bulunduğu tüberküller görülür. Buna ek olarak histiyositik ve mononükleer infiltrasyon vardır.

Rezidivan Layşmanyazis (kronik lupoid layşmanyazis): Layşmanyazis skatrisi çevresinde iyileşmeden sonra ufak, kırmızı-kahverengi, kahverengi-sarı papüller veya tüberküllerin gelişmesi ile karakterizedir. Bunlar birleşerek lupus vulgarise benzer bir görünüm alırlar ve plak oluştururlar. Lezyonlar çoğunlukla yaz aylarında kötüleşir ve ülserleşebilir. Psöriasiform şekilleri olabilir. Nadiren de keloidal ve verrüköz formları alt ekstremitelerde görülebilir. Lezyonlarda parazit nadir olarak bulunabilir. Kültürde zor da olsa paraziti üretmek mümkündür. Rezidivan lezyonlar parazitin türlerine karşı özel bir reaksiyon değildir. Konağın reaksiyonuna bağlıdır. Bu lezyonlar yıllarca

sürerler, genişlerler ve sonunda skatris bırakarak iyileşirler. Histolojik olarak akut ve kronik şekillerdeki özellikler görülür. Epidermal değişiklikler değişken olabilir ve dermiste orta derecede tüberküloid yapı görülür. Parazit ancak çok dikkatli inceleme ile bulunabilir(8,12).

2.1.5.2.2. Generalize deri layşmanyazisleri

Gövdenin çeşitli bölümlerinde lezyon açısından zengin, çok sayıda lezyonlarla karakterizedir. Morfolojik olarak lepromatöz lepraya benzer. Hastalardaki hücrel immüniteye ait spesifik bir yanıt yetersizliği mevcuttur. Çünkü visseral ve sistemik tutulma yoktur. Aşırı sayıda parazite maruz kalmanın lenfosit aktivitesini baskıladığı ve sonuçta azalmış immün yanıtın oluştuğu iddia edilmektedir.

Diffüz Deri Layşmanyazisi (Dissemine Anerjik Layşmanyazis, Layşmanyazis Cutis Diffusa): Deri layşmanyazislerinin lepraya benzeyen generalize formu, Orta ve Güney Amerika'da ve son olarak Etiyopya ve Japonya'da görülmüştür. Hastalıkta lezyonlar ülser olmayan nodüllerdir. Lokal olarak yayılır ve derinin büyük alanlarını kapsar. Lezyonlar yavaş yavaş gelişir ve kronikleşir. Hastalık iç organları tutmaz. Lezyonlarda bol sayıda parazit bulunur. Layşmanyazis'in testi negatiftir. Karakteristik histolojik bulgu olarak amastigotlar ile dolu makrofajlar gözlenir.

Leishmanid: Çok seyrek görülen bu tabloda akut kutanöz layşmanyazisli hastalarda generalize erüpsiyonlar ortaya çıkar. Leishmanid lezyonları parazit içermezler. İki üç ay sürebilen bu tablo asemptomatiktir(8).

2.1.5.3. Mukokutanöz Layşmanyazis (ML) (Espundia)

Bu hastalığın etkeni *L. Brasiliensis*'dir. Bir veya birkaç deri lezyonu ile başlar. Nadiren kendiliğinden iyileşirse de genellikle düzgün olmayan bir şekilde yayılarak oronazofaringeal mukozaya metastaz yapar. Burundaki lezyonlar sonucu septumda ve burun kanatlarında doku kaybı ve deformiteler oluşur. Destruksiyon ilerlerse burnun, üst dudakın, hatta alt göz kapağının tamamen harabiyeti sonucu çok çirkin bir görünüm

oluşur. Lezyonların yumuşak damak, dil, farinks, larinks ve trakeaya yayılması sonucu disfaji, disfoni hatta asfiksi meydana gelebilir(8,12).

2.1.6. Layşmanyazis Tanısı

Kutanöz Layşmanyazis'in tanısında coğrafik bölge, klinik görünüm ve laboratuvar bulguları önemlidir. En basit tanı yöntemi pastör pipeti ile lezyonun kenar kısmından alınan serözitenin veya alınan biyopsi materyalinin lama sürülmesi ile elde edilen preparatta hücre içinde veya dışında amastigotların gösterilmesidir. Parazitin belirlenmesi direkt smear, kültür ve hayvan inokülasyonları ile mümkündür, Dokudan örnek temini için iğne biyopsisi de kullanılabilir.

İğne biyopsisi: Kutanöz lezyonlarda lezyon kenarından alınan materyal kültür, smear için kullanılışlıdır.

Biyopsi: Ülser kenarından alınan *full thickness* materyal kültür ekimi için kullanılabilereği gibi fikse edilerek Giemsa veya hematoksilen eozin (H+E) ile boyanabilir. Giemsa ile parazitler araştırılır, H+E yöntemi ile histolojik inceleme yapılabilir. Biyopsi materyalinden hazırlanacak preparatlar yine Giemsa ile boyanabilirler.

Kültür: NNN (*Novy-Mc Neal-Nicolle*) besiyerinde veya *Schneider*'ın insekt kültür mediumunda promastigot formlar üretilmeye çalışılır.

Hayvan inokülasyonları: Golden hamster birçok leishmania türüne karşı çok duyarlıdır. İntraperitoneal ve intrakutanöz inokülasyon uygulanabilir.

Serolojik tanı: Hücrel immünite ve geç hipersensitiviteyi *Leishmanin* veya *Montenegro* deri testi ile değerlendirmek mümkündür. Humoral antikörlerin belirlenmesi ise complement fixation test (CFT), haemagglutination test (HI), indirect fluorescent antibody test (IFAT), countercurrent immunoelectrophoresis (CIEP), ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemleri ile mümkündür.

Deri testleri: *In-vitro* kültürlerden elde edilen eksoantijen preparatların intradermal uygulamasıyla yapılan deri testlerinde erken ve geç tipte iki reaksiyon oluşur. Erken reaksiyonun tanıda veri yoktur. Fenolize edilmiş promastigotların intradermal injeksiyonundan 48-72 saat sonra oluşan geç tipteki reaksiyon

(Montenegro) tanıda oldukça değerlidir. Oluşan endüre nodülün çapına göre skorlandırma yapılır(8,12).

2.1.7. Layşmanyazis Tedavisi

Basit KL tedavisiz iyileşir ve kişide o türe karşı immünite gelişir. Bu yüzden Güney-Batı Asya'nın birçok bölgesinde bebeklerin kalçalarında bilerek enfeksiyonun gelişmesi sağlanmakta ve dolayısıyla daha sonraki muhtemel enfeksiyonlara karşı bağışıklık sağlanmaktadır. Böylece çocuk multipl lezyonlardan ve yüzde gelişecek şekilsiz skatrislerden korunmuş olmaktadır.

Tedaviye dirençli olan *L. aethiopica*'nın neden olduğu layşmanyazisler hariç tüm *Layşmanyazis* enfeksiyonlarında ilk seçenek beş değerli antimon bileşiklerinin kullanımındır. Layşmanyazisin diğer türleri sodyum stiboglukonat (*Pentostam*[®]) veya meglumine antimonat (*Glucantime*[®]) gibi beş değerli antimon bileşikleri ile uzun süreli günlük enjeksiyonlar şeklinde tedavi gerektirir. Antimon ile ilk Kutanöz *Leishmania* tedavisi 1913 yılında Viyana'da Tartar emetik kullanılarak tedavi edilmiştir. 1937 yılında pentavalan tartar emetikten daha az toksik olan *Salustibosan* kullanılmıştır. Savaş yıllarında İngiltere ve Fransa'da *Pentostam* ve *Glucantime*, *Salustibosan* yerine geliştirilmiştir. Halen *Leishmania*'ya karşı daha etkili ve daha az toksik başka ilaç geliştirilememiş olup Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından *Pentostam* ve *Glucantime* halen ilk ilaç olarak önerilmektedir. Antimon kullanılırken Elektrokardiografi (EKG) değişiklikleri, karaciğer, böbrek fonksiyonları, aritmi ve akut böbrek yetmezliği yönünden takip edilmelidir(2,5,6,8).

İkinci seçenek ilaçlar ise katekonazol, amfoterisin-B, allopurinol, pentamidin'dir. Ancak bu ilaçlar güçlü toksisiteleri yüzünden diğer tedavilerden yanıt alınamayan olgularda kullanılmaktadır. Bu klasik ilaçların yanı sıra çok çeşitli ilaçlar ve tedavi yöntemleri KL'de kullanım alanı bulmaktadır.

Tablo 5: Kutanöz Layşmanyazis tedavisinde kullanılan çeşitli ilaçlar

Antimon Bileşikleri

- Stibofen (Fuadin)
- Meglumin antimonat (*Glucantime*)
- Sodyum stiboglukonat (*Pentostam*)

Antimalaryal ilaçlar

- Mepakrin (Quinacrine hydrochloride)
- Klorokin

Diamidine Bileşikleri

- Pentamidin
- Stilbamidin

Kriyoterapi

Elektrokoagülasyon

Fitoterapi

- Sarımsak
- Echinacea

İmmünoterapi

- BCG
- BCG + *Leishmanial* antijenler
- İnterferon- γ
- IFN- γ + Antimon bileşiği

Sistemik Metranidazol

Amfotericin-B

Paromomisin

Rifampisin

İsoniazid

Ketokonazol

Itrakonazol

Topikal imidazol

Sikloguanil pamoat

Atebrin

Berberin türevleri

Bleomisin

Monomisin

Allopurinol

Nifurtimoks

Dihidroemetin

Klofaz

2.1.8. *Layşmanyazis*'i Öldürme Mekanizması

Dokulardaki makrofajlar ve mononükleer fagositik hücreler çoğu enfeksiyon ajanını yok eden başlıca hücrelerdir. Bu işlevi de geniş bir yelpazesi olan toksik moleküller ve hidrolitik enzimler aracılığıyla yaparlar. Bu duruma ters olarak çeşitli protozoa, bakteri, mantar ve virus, makrofajların ve mononükleer fagositik hücrelerin içinde yaşar ve çoğalırlar. Çoğalma bölgeleri sadece fagolizozom değil aynı zamanda enfekte hücrenin sitoplazmasıdır(4).

Bağışıklık sisteminin yardımı ile bu mikroorganizmaların öldürülme işi yine makrofajlar içerisinde gerçekleşmektedir. Protozoanın öldürülmesinde T hücrelerince makrofajların aktivasyonu sonucu reaktif oksijen metabolitleri (ROS: süperoksit, hidrojen peroksit), reaktif nitrojen metabolitleri (RNS: nitrik oksit, nitrojen dioksit) ve lipid türevleri (prostaglandin, lökotrien) üretiminin etkili olduğu bildirilmiş ve bu aktivasyonu da pro-enflamatuar sitokinlerin regüle ettiği gösterilmiştir(8,11,13,15).

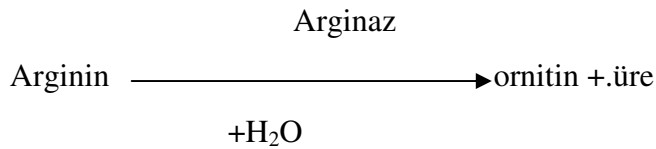
Reaktif oksijen ve nitrojen metabolitleri antimikrobial savunma mekanizması olarak pek çok paraziter hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadır. Bu mekanizmada L-Arginin'e etki eden iki enzimden biri olan Nitrik Oksit Sentaz-II (NOS-II) makrofajlar tarafından salınarak nitrik oksit (NO) üretimine neden olurken, diğer enzim arginaz ise L-argininden L-ornitin ve üre oluşumuna neden olmaktadır. NO, mikromolar konsantrasyonlarda mikrobik organizmalar ve tümör hücreleri için sitotoksik etki etmekte, Arginaz tarafından üretilen L-Ornitin ise parazit gelişimi için faydalı olup poliaminler için de prekürsör olmaktadır(12).

Leishmania'nın gelişimi için L-ornitin'den poliamin sentezi esansiyeldir. N^ω-Hydroxy-L-Arginine (LOHA) Arginaz'ın fizyolojik inhibitörüdür L-N^G-monometil Arginin (L-NMMA) da NOS-II enziminin inhibitörüdür. L-NMMA ile NOS-II enzimi inhibe edilen sıçanlarda, makrofajların Arginin metabolizması, IL-4 ile indüklenen Arginaz ile Ornitin üretimi yönünde uyarıldığı zaman parazitin gelişmesi artmış. Bu etki LOHA tarafından ters çevrilebilmiştir. L-NMMA ile NOS-II enziminin inhibisyonu IFN- γ ile LPS verilmesiyle tekrar aktive edilerek parazitin öldürme yeteneği tekrar kazandırılmış, LOHA ile Arginazı baskılanan sıçanlara dışarıdan L-ornitin verilmesiyle parazitin öldürülmesi tamamen inhibe edilmiştir(13).

3. ARGİNAZ

3.1. Tanımı ve İşlevi

Arginaz (L-Arginin amidinohidraz.) üre döngüsünün son enzimi olarak arginini üre ve ornitine hidroliz eder (15,16). Enzim ilk kez 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından tanımlanmış olup(17), 1932 yılında Krebs-Henseleit tarafından üre döngüsünün bir enzimi olduğu kanıtlanmıştır (15,17)



Üreotelik organizmalardan memeli karaciğer hücrelerinde, arginaz enziminin en yüksek aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (17). Ekstrahepatik dokulardaki aktivitesi karaciğerdeki aktivitesinden belirgin olarak daha düşük değerdedir ve bu dokularda farklı işlevlere sahiptir. Bu dokuların başında eritrositler, lökositler, böbrek, tiroid, tükürük ve meme bezleri, plesenta, deri ve testisler gelmektedir. Örneğin; meme bezinde arginaz enziminin primer fonksiyonu prolin ve poliamin sentezi için ornitin üretmektedir(18,19). İnsan serumunda ise arginaz enzim aktivitesi eritrosittekinden 200 kat daha düşük bulunmuştur(16,17).

Arginazın karaciğerde üre döngüsündeki asıl rolüne ek olarak lenfositler, makrofajlar, karaciğer hücreleri ve tümör hücrelerinde farklı biyolojik etkileri vardır. Karaciğer hücresindeki yüksek arginaz aktivitesi hücre büyümesini inhibe etme yeteneğindedir ve hücre kültüründe yüksek arginaz aktivitesi antimitotik olarak etkili olabilir. Bu nedenle malign hücreleri yok etme aşamasında makrofajlardan sekrete edilebilir(15).

Fitohemaglutinin (PHA) ile uyarılmış lenfositlerde protein, DNA ve RNA sentezleri arginaz tarafından inhibe edilir. DNA, RNA ve protein sentezleri farklı miktarlardaki arginazla inhibe olurlar. Bunlar içinde en çok inhibe edilen DNA sentezidir. PHA ile stimüle edilen lenfositteki hücre proliferasyonuna sebep olarak arginazın inhibisyonu düşünülebilir(19).

3.2. Arginazın İzoenzimleri ve Özellikleri

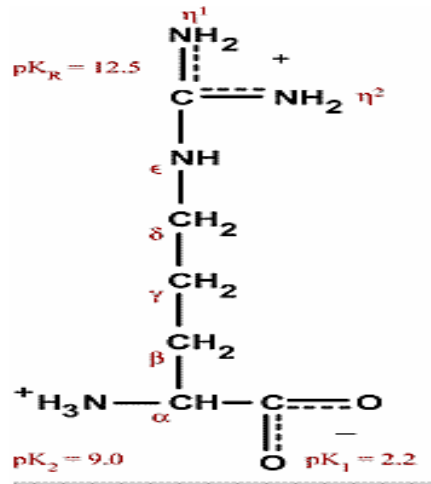
Gerek insan gerekse kobay dokularında çeşitli çalışmalar sonucunda arginaz enziminin beş izoenzimi mevcut olduğu immunoelktroforez ve dudle immüdiffüzyon testleri ile anlaşılmıştır. Bu beş izoenzim A₁, A₂, A₃, A₄, A₅ olarak simgelenmiştir olup, dokulara göre dağılımı şu şekilde belirtilmiştir (19).

<u>Karaciğer</u>	<u>Böbrek</u>	<u>Tükürük Bezi</u>
A ₂ , A ₅	A ₁ , A ₄	A ₃

3.3. Arginin Metabolizması

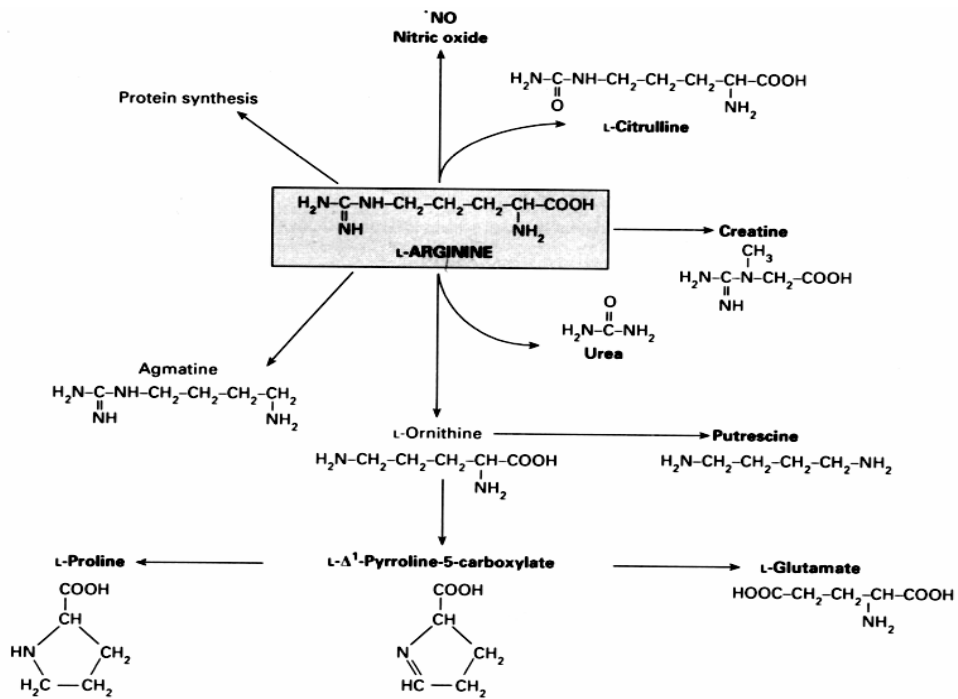
Arginin; üre, guandino bileşikleri, kratin ve poliaminlerin oluşumunu içeren birkaç önemli yolda bulunan anahtar bir aminoasittir (18,19). Arginin sentezinin böbrekte ve karaciğerde olduğu bilinmektedir (18,19). Böbrekler tüm vücut arginin sentezinde önemli bir rol oynar. Böbreklerde argininin asıl kaynağı sitrüllindir. Wang ve Ark (9) yaptıkları çalışma sonucunda arginin yara iyileşmesi ve immunitede yararlı olduğu sonucuna varmışlardır. Karaciğer yüksek arginin sentez aktivitesi göstermekle beraber çok fazla arginini kan dolaşımına vermez (19,20). Bunun nedeni hepatositlerin sitrülline permeabilitesinin zayıf olması ve hepatositlerde oluşan argininin çoğunun ornitin ve üreye dönüşmesidir. Bunun aksine böbrek tarafından üretilen argininin büyük kısmı renal venöz kana salınır. Renal arginin sentezi, normal büyüme ve vücuttaki daimi proteinin yenilenmesi olarak kabul edilir. Buna ek olarak arginin damar tonusunda etkili bir düzenleyici olan ve “endotelium derived relasing faktör” (EDRF)

adı verilen nitrik oksitin (NO) öncüsü olduğu gösterilmiştir. NO, düz kas hücrelerinde guanil siklaz aktivitesini uyararak cGMP üretimini artıran bir nöronal haberci gibi davranmaktadır (15,19).



Şekil.2. Molekül ağırlığı 174 dalton'dur

D- ve L-arginin izomerlerinden L-arginin formu proteinlerin yapısına girer



ŞEKİL. 3. Memeli Hücrelerinde Argininin Metabolik Yol

3.4. Arginin Sentezi

Memelilerde arginin metabolik sentezi için; L- Δ^1 -pirolin -5- karbosiklat sentaz (P5C) ve pirolin oksidaz aracılığıyla gerçekleşir (20,21). Çeşitli hücre tiplerinde metabolik yolun bazı enzimleri, diğer enzimlere karşı sınırlıdır. Fosfat bağlı glutaminaz, ornitin aminotransferaz (OAT), arginosüksinat sentaz (ASS), Arginosüksinat liyaz (ASL) ve aspartat aminotransferaz (AAT) bir grup memeli hayvanda iken (22), (CPS-1), ornitin karbomoil transferaz (OCT), N-asetil glutamat sentaz karaciğer ve barsak mukozasında sınırlıdır. Prolin oksidaz; çoğunlukla ince barsakta, karaciğer ve böbreklerde (42-48), P5C yalnızca barsak mukozasında düşük, diğer memelilerde ise sadece bir miktar izlemek mümkündür (20-21).

Prolin; aynı zamanda P5C` ye dönüşebilmesi için L-pipekolik asid oksidaz ve sarkozin oksidaz, bu enzimler argininin 2 endojen sentezinde rol oynayan enzimlerdir. Bu nedenle net arginin sentezi Şekil 4. de gösterilmiştir. Yeni doğanların ince barsaklarında; domuzlarda, bununla birlikte yetişkinlerde endojen arginin sentezi organlar arası yol, ince barsakta sitrullin serbest kalarak kanla sikülasyonu, bu dönüşümü böbrekler, primer eksrakte eder.

Arginin organizmada pek çok organ ve dokuda sentez edilmektedir. Yetişkin insanlarda ve hayvanlarda değişebilir endojen argininin sadece %5-15 De novo arginin sentezinde önemlidir. Vücut proteinlerinin dönüşümünde değişebilir endojen arginin büyük katkıda bulunmaktadır. Neonatal domuzlarda bununla birlikte değişebilen endojen arginin, aşağı yukarı % 33`ü için De novo arginin sentezi önemlidir. Buna bağlı olarak toplam vücut proteinlerinden daha az önemli olan süt proteinindeki arginin miktarıyla ilgili bilgi neonat peryot esnasında endojen arginin sentezi için gereklilik göstermektedir.

Argininin endojen sentezi, neonatal ve yetişkin domuzlarda arginin, homeostazis regülasyonunun sağlanmasında önemli rol oynar; fakat sağlıklı yetişkin insanlarda arginin homeostazis regülasyonunda büyük rol oynamaz. Sürekli değişiklik gösteren plazma sitrullinin farelerde ve yetişkin insanlarda arginin endojen sentezi görülmektedir. Yetişkin köpeklerde böyle bir durum söz konusu değildir. Sitrullinden

argininin endojen sentezinde, insanda ve yetişkin farede argininin diyetle girişini azaltmak yanıt vermektedir.

Bağırsak glutamin ve glutamat, plazma glutamin, sitrullin; arginin intestinal sentezi için önemli nclerdir. İnce bağırsaklarda kapsamlı katabolizmada rol oynar. Windmueller ve Spaeth (68), fare ince bağırsaklarındaki luminal ve arterial glutaminin sonucuna karşın, sitrullinin serbest bırakılması olayını kanıtlamışlardır(64). Sonraları, yetişkin farelerdeki sitrullin sirkülasyonu'nun fare ince bağırsaklarında gerçekleştiği kanıtlanmıştır (20).

Domuz ve köpeğin ince bağırsaklarında, koyun ve insanların i organlarındaki toplardamarlarda sitrullinin büyük miktarı serbest bırakılır. Glutamin/glutamat, argininin ya da sitrullinin intestinal sentezi için sorunludur. Yabani hayvanlarda ve yetişkin memelilerdeki çalışmaların hepsinde, bazı domuz cinslerinde toplardamarlarla ilgili sirkülasyonda arginin sentezi ince bağırsakta çoğalarak serbest bırakılır. Sitrullinin az miktarı köpek ve benzeri hayvanların kalın bağırsağında serbest durumda, yapılan yeni çalışmalarda ise fare kolonosistlerinde glutaminden sitrullinin sentezi meydana gelmektedir.

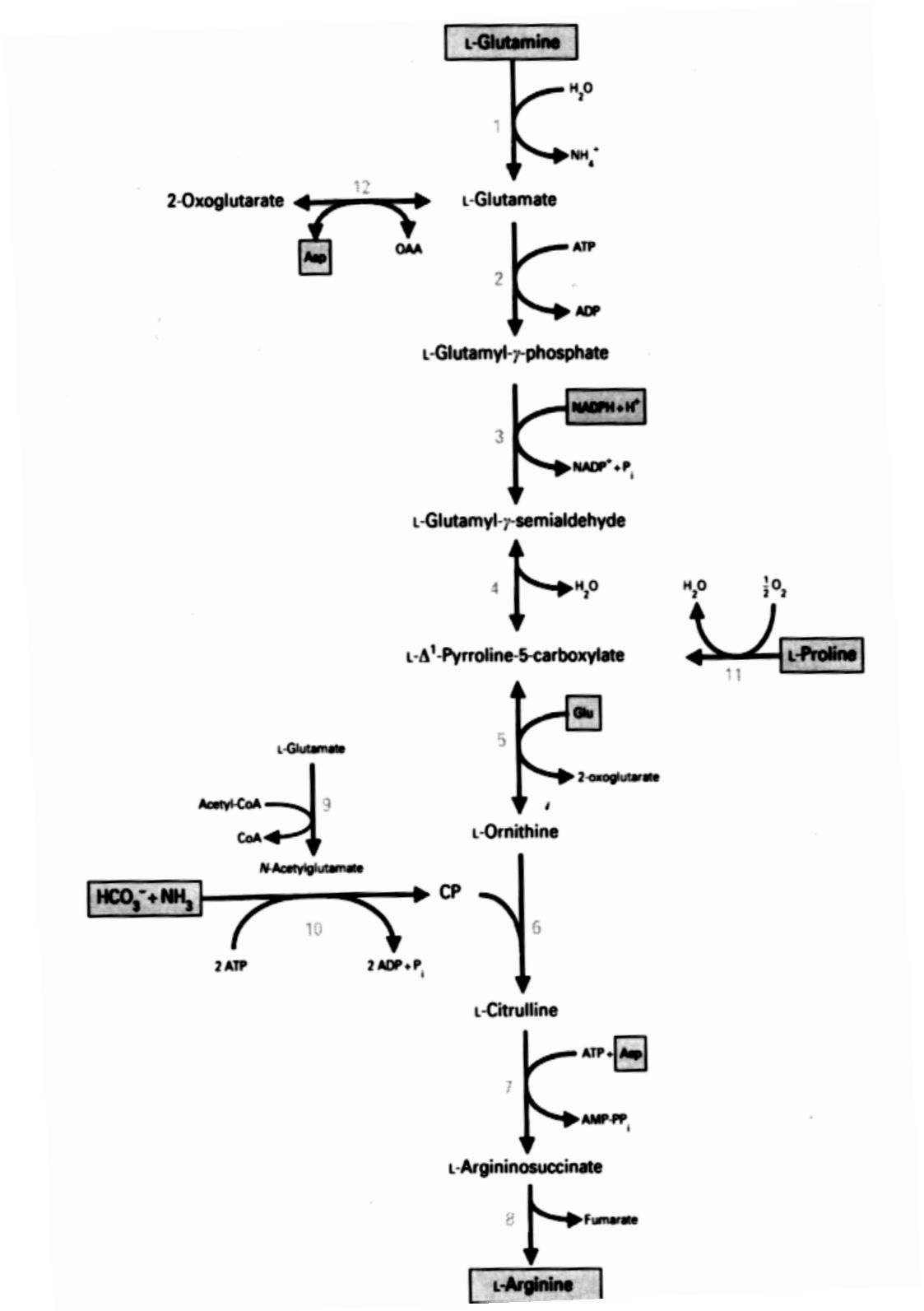
Glutaminden argininin intestinal sentezinde gelişmeye yönelik değişimler vardır. Başlangıçta, net arginin sentezinin önemli yeri ince bağırsakta; fakat bağırsak arginaz ekspresyonunu artırmak kadar, net sitrullin ürününün de yavaş yavaş önemli olmaya başladığı görülmüştür. Domuzlarda enterosit ile glutaminden net arginin sentezi, başlangıç net sitrullin ürününden daha büyüktür.

Enterositlerde, sitrullin sentezi için prolinin önemli kaynağı enteral diyettir. Domuzlara prolin verilmesi sitrullin oluşumuna yol açmaktadır. Domuz ince bağırsaklarındaki prolin oksidazın aktivitesi karaciğer ve böbrekte oldukça büyüktür.

Endojen arginin sentezinin majör organı böbreklerdir. Yetişkin memelilerin böbreklerinde net arginin sentezi aşağı yukarı %60 oranında meydana gelir (22). Renal sitrullin yolu ve renal arginin üretimi arasında sıkı bir korelsyon olduğu insanlarda ve farelerde kanıtlanmıştır. Renal arginin biyosentez kapasitesi, sitrullinin intestinal üretim kapasitesinden daha büyük görünmektedir. Şiddetli açlık sırasında arginosüksinat sentaz

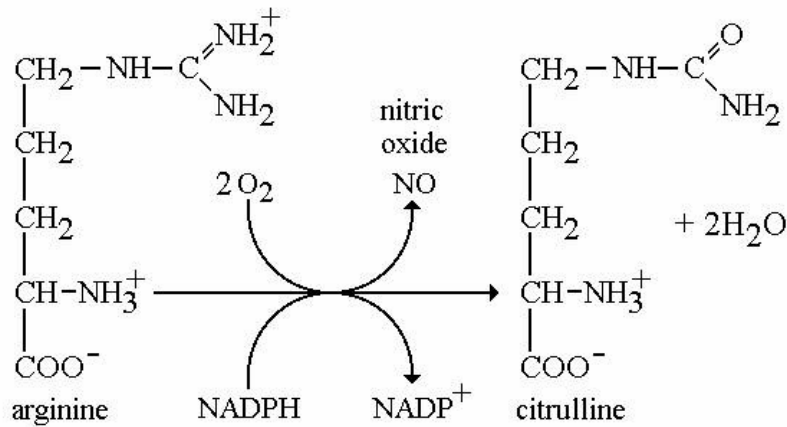
(ASS) ve arginosüksinat liyaz (ASL) için mRNA seviyeleri artmaktadır. Plazma arginin seviyeleri diyet proteinlerinin eksikliğinde artmaktadır. Renal yetmezlik durumunda sitrullin plazma seviyeleri yükselir, bununla birlikte hastalarda plazma arginin seviyelerinde azalma yoktur ya da çok azdır (20,21,22). İskelet kasında protein katabolizması ile arginin serbest kalması dahil, ekstrarenal yerlerde arginin sentezi artmakta, proksimal tubullerin hipertrofisi ve hiperfiltrasyonu armakta, sitrullin plazma seviyelerinin yükselmesine karşın arginin sentezi oranında bir azalma vardır.

Hepatik üre siklusu içerisinde meydana gelen arginin sentezinin yüksek oranları, periportal hepatositler içerisinde lokalize'dir. Sağlıklı ve yetişkin insanlarda; üre ürünlerinin oranları , NO sentezi oranından daha büyüktür ve aynı zamanda kreatin sentezi oranından da yüksektir. Üre siklusu enzimleri aynı zamanda düzenleyicidir. Hepatik üre siklusu enzimlerinin ekspresyonu fetal gelişme esnasında başlar ve doğumdan sonra artışına devam eder. Protein ve aminoasit katabolizmasını içeren durumlarına neden olan üre siklusu enzimlerinin seviyeleridir. Bu şekilde diyet proteinlerinin girişinin artması, şiddetli açlık ve karaciğer glukokortikoidlerinde artmaya neden olur . Enzimleri kodlayan genlerin transkripsiyon oranlarının artması çoğunlukla yüksek sıcaklıkla gerçekleşir. N-asetil glutamatın mitekondriyal konsantrasyonunun değişimi ile döngü düzenlenir. CPS-1 katalitik etkisi aracılığıyla öncelikle üre siklusu aktivitesi hızlanır, toplam ürede NO üretimine neden olabilen hepatositler kan zehirlenmesi durumunda artmaktadır. NOS, üre siklusu içinde total arginin sentezinin sadece küçük bir bölümünde kendisini gösterir. Üre siklusu ile arginin sentezi için hepatic kapasite, ASS ve ASL için mRNA seviyeleriyle gösterilir.(20,21,22)



ŞEKİL 4. Arginin Sentezi Yolu

Şekil 4 de reaksiyonda rol oynayan kataliz enzimler; 1, fosfat bağlı glutaminaz (EC3.5.1.2); 2 ve 3 P5C sentaz; 5, ornitin aminotransferaz (OAT;EC 2.6.1.13); 6, ornitin karbomoiltransferaz (OCT;EC 2.1.3.3); 7, arginosüksinat sentaz (ASS;EC 6.3.4.5); 8, arginosüksinat liyaz (ASL;EC 4.3.2.1); 9, N-asetil glutamat sentaz (EC 2.3.1.1); 10,CPS-1; 11, prolin oksidaz mitokondride görev alır. Arginosüksinat liyaz, arginosüksinat sentaz, sitozolde gerçekleşen reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir



Şekil.5. 1988 yılında Salvador Moncada, L-argininin endotel kökenli nitrik oksidin (NO•) prekürsörü olduğunu saptamıştır

3.4.1 Argininin İmmünomodülatör Etkisi

- L-argininin metabolizması makrofajlar ve T lenfositleri için çok önemlidir.
- Sitotoksik T hücre sayısını azaltarak Th/CD8 oranını artırır.
- Makrofajlar enfeksiyonla NO salınımı ve peroksi nitrit oluşumu üzerinden savaştığı için, ciddi enfeksiyonlar ile mücadelede arginin önemli işlevleri vardır.

3.4.1.1. Arginin Eksikliği

- Çok hızlı büyüme
- Gebelik
- Travma

- Sepsis
- Kanda aşırı amonyak
- Arginine Antagonist olan lizin varlığı
- Malnütrisyon eksiklik nedeni olabilir.

3.4.1.2. Arginin Fazlalığı

- Hiperargininemi, OR kalıtımla geçen arginaz eksikliğine bağlıdır.
- Defekt tam veya kısmi olabilir.
- Bu hastalık şimdye kadar 27 hastada rapor edilmiştir.
- Diyetteki protein miktarı arttıkça bulgular ortaya çıkar.
- Mental gerilik, epileptik nöbetler, hiperammonemik koma oluşabilir.
- Eritrositlerde düşük arginaz aktivitesi saptanır.

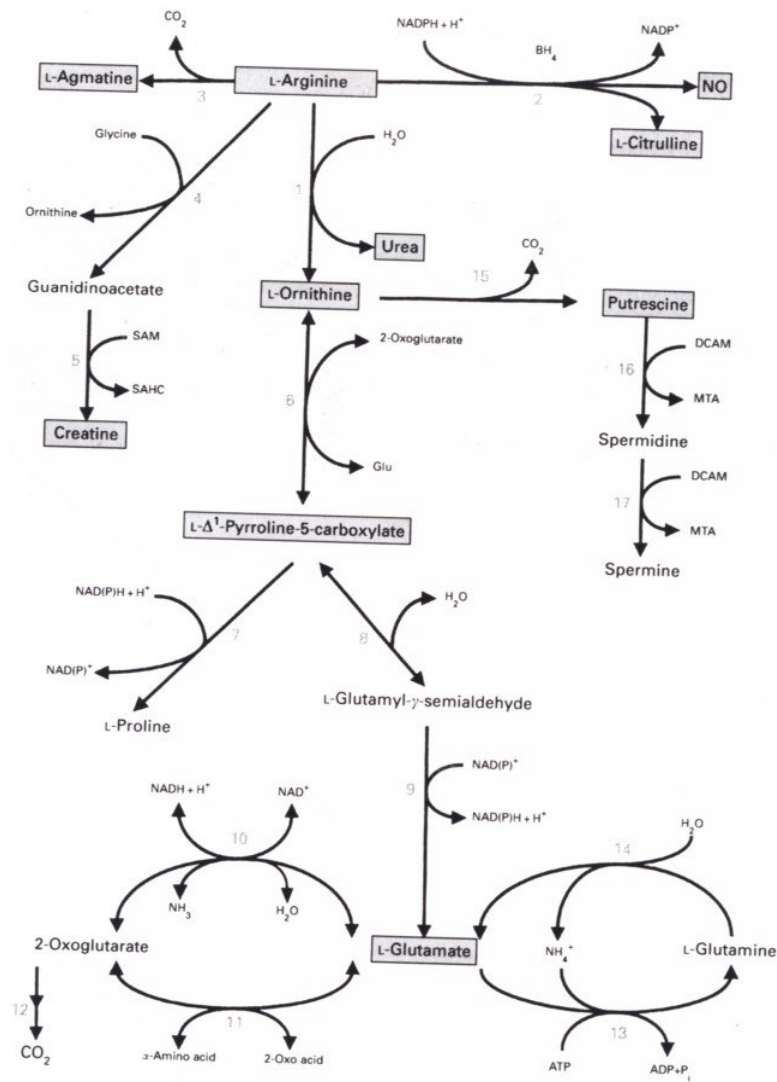
3.5. Arginin Katabolizması

Arginin katabolizmasının çeşitli metabolik yolları şekil 6' da gösterilmiştir. N^G-hidroksi arginin ile arginazın inhibisyonu sırasında, diğer enzimin aktivitesini engelleyebilen enzimin ürünü, karmaşık etkileşimlerle sonuçlanabilmektedir. Karmaşık hücresel bölümlerde ve memelilerin iç organlarında bulunan arginin katabolizması kısadır.

Poliaminler, L-ornitin L-metiyonin aminoasitlerinin metabolik ürünleri olarak düşünülebilmektedir. Spermidinin ön maddesi olan putressin, memeli hücrelerinde ornitinin direk olarak dekarboksilasyonu ile meydana gelir. Reaksiyonu ornitin dekarboksilaz (ODC) katalizler. Putressinden spermidin, spermidinden spermin oluşur. Bu reaksiyonlarda iki farklı aminopropil transferaz etki eder. Bu enzimler aminopropil vericisi olarak dekarboksile S-adenozil metiyonini kullanırlar. Poliamin biyosentez enzimleri hücre büyümesi ve farklılaşmasını stimüle eden çeşitli ajanlar tarafından uyarılmaktadır. Poliaminler molekülle sıkı kompleksler yaparlar ve böylece DNA, RNA ve protein moleküllerinin oluşumu, dönüşüm hızı ve sentez sonrası değişimlerini

etkilerler. Spermin, spermidin ve putresin aynı zamanda direk olarak diğer metabolik olayları da düzenler veya hızlandırır. Poliaminlerin hem normal hem de kanser hücrelerinin büyümesini ve fonksiyonunu artırmakta rolü olduğu kesin olarak bilinmektedir.

Argininin katalizlediği reaksiyonun ürünü olan ornitin hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı bilinen poliaminlerin ön maddesidir. Ornitin aynı zamanda prolin sentezine gidebilir; bu özellikle laktasyondaki meme bezlerinde ve kollagen sentezi yapan organlarda önemlidir.(21-22)



Şekil.6. Arginin Katabolizması Yolu

Reaksiyonu katalizleyen enzimler; 1, arginaz; 2, NOS; 3, arginin dekarboksilaz; 4, arginin; glisin aminotransferans; 5, guanidoasetat N-metiltransferas; 6, OAT; 7, P5C redüktaz; 9, P5C dehidrogenaz; 10, glutamat dehidrogenaz, alanin aminotransferaz; 13, glutamin sentaz; 14, glutaminaz; 15, ornitirin dekarboksilaz (ODC); 16, spermidin sentaz; 17, spermin sentaz.

4. NO (Nitrik Oksit)

Azotmonoksit olarak da adlandırılan NO (:N: :O:) son derece toksik ve renksiz bir gazdır. Serbest radikal tanımına uyan reaktif bir oksijen türevidir(75). Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir (76). Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO, bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücreleri sekresyon ürünüdür(77,79). Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir(4). NO, suda az çözünen, basit gaz yapısında kolay difüze olabilen, bir adet eşleşmemiş elektron içeren ve oksijen(O₂) süperoksit radikalleri ve Fe, Co, Cu gibi transisyon metalleri ile reaksiyona giren bir moleküldür(77). NO'nun yarı ömrü O₂ 'li dokularda çok kısadır (t< 15s). Ortamdan ne kadar hızlı uzaklaştırılırsa ya da metabolize edilirse etkinliği o kadar azalır (78).

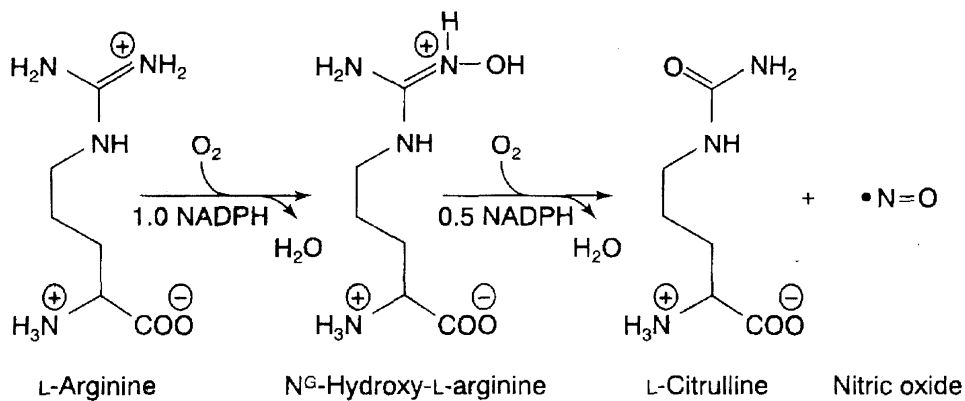
4.1. NO Metabolizması

NO'nun çözünen (sitoplazmik) guanilat siklaz enzimini aktive ettiği ve damar düz kaslarında gevşemeye neden olduğu 1970'li yılların sonlarından beri biliniyordu. NO, organik radikallerle diffüzyon limitine yakın bir hızla tepkimeye girerek nitrojen içeren

organik bileşiklerin oluşumuna neden olur. NO endojen olarak üretilen bir biyomoleküldür. NO; konak savunması ve immunitiyi etkilediği gibi kan damar tonusu ve nöronal ileti dahil bir çok fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynar. NO, sinir sisteminde fizyolojik ve patolojik rolleri vardır. Sinir sistemi morfogenezinde ve sinapsların şekillenmesinde rol oynar, nörotransmitter salım ve gen ekspresyonunu düzenleyebilir. NO'in aşırı üretilmesi halinde, çeşitli sinir sistemi hastalıklarında önemli nörotoksin olarak karşımıza çıkar. Ayrıca bir çok çalışmadaki NO'in inflamatuvar cevapları modüle etmede kompleks bir rol oynadığı anlaşılmıştır (83-85).

4.2. Nitrik Oksidin Sentezi

Memeli dokularında L-arginin'den NO'in sentezlenmesi için (NOS) enzimi gereklidir. Bradikinin, asetilkolin gibi agonistlerin katkısıyla L-arginin'den NO sentezi iki ayrı adımda gerçekleşmektedir. Birinci adımda bir molekül L-arginin yükseltgenerek N^G-hidroksi-L-arginin (OH-L-Arg) ara ürününü oluşturur. Bu reaksiyon için gerekli olan NADPH ve O₂, NADP⁺ ve H₂O'ya dönüşür. İkinci adımda ise OH-L-Arg daha fazla yükseltgenerek bir molekül NO ve L-Citrullin ürünlerini oluşturur. Görüldüğü gibi bu reaksiyonda iki molekül O₂ ve bir molekül NADPH, iki molekül suya ve bir molekül NADP⁺'a dönüşür(Stvehr et al.,1999;Knowles,1997).



Şekil.7. L-Argininden NO oluşumu

4.3. Nitrik Oksit Sentetazlar (NOS)

NOS, ilk olarak 1989 yılında tanımlanmış, 1990 yılında izole edilmiş ve 1991 yılında klonlanmıştır (81,82). Daha sonra yapılan çalışmalarda NOS enziminin NADPH diaforaz enzimi ile aynı enzim olduğu bildirilmiş ve NADPH diaforaz boyama tekniğiyle, NOS'ın dokulardaki dağılımı gösterilmiştir (Hecker et al.1990; Knowles and Moncada, 1992).

NOS terimi, L- argininin L-citruline ve bir guanido nitrojen atomunun büyük olasılıkla NO olan bir ya da daha fazla oksijenizasyon ürününe oksijenizasyonunu kataliz eden, IUB sisteminde EC 1.14.13.39. olarak adlandırılan bir grup enzimi kapsar. Substrata iki oksijen atomu sokmaları nedeniyle “dioksijenazlar” olarak da adlandırılabilirler(87)

Kodlandığı genlere, elde edildiği organa ve Ca^{+2} a duyarlılığına göre iki ana grup NOS enzimi izole edilmiştir(79).

1-Yapısal (Constitutive, cNOS)

a)Nöronal (nNOS, Tip 1 NOS)

b)Endotelial (eNOS, Tip 3 NOS)

2-İndüklenebilen (Inducible, iNOS, Tip 2 NOS)

NOS enziminin iki ana sınıfının temel özellikleri tabloda 6'da gösterilmiştir (17,18,19).

	Yapısal	İndüklenebilen
Kaynak	Endotelial hücreler Nöronlar Mast hücresi Plateletler Adrenal Medulla	Makrofajlar Hepatositler Tümör hücresi Endotelial hücreler Mezenşiyal hücreler
Yerleşim	Sitozolik /Spesifik	Sitozolik
Ca bağımlılık	Bağımlı	Bağımsız
Salınım	Geçici Düşük miktar (Pikomol)	Devamlı Yüksek miktar (Nanomol)
Aktivatörler	Eksitator amino asitler Asetilkolin, otokoidler Trombin, ADP, ATP	Endotoksin Sitokinler
İnhibitörler	L-Arginin analogları (ADMA, NAME, NMMA,NNA)	L-Arginin analogları (NMMA)
Selektif inhibitörler	7-Nitroindazoller	Aminoguanidin Deksametazon Progesteron Glukokortikoidler Sikloheksimit, Aktinomisin

TABLO.6. NOS enziminin 2 ana sınıfının temel özellikleri

4.3.1. Yapısal (Constitutive) NOS (cNOS)

Bu izoformun ayırıcı özelliği, aktivitesinin Ca^{+2} ya (ikincil haberci) bağımlı olmasıdır. İnsan vücudunda tespit edildikleri başlıca dokular şunlardır (81,87): Damar endotel hücreleri, ürogenital sistem dokuları, santral ve periferik sinir sistemi nöronları, adrenal korteks ve medulla hücreleri, trombositler ve barsak interstiyumu. Hücre içi iyonize kalsiyumu artıran her türlü etkileşimde, kalsiyumun kalmoduline bağlanması ile oluşan kompleks (Ca^{+2} /kalmodulin) cNOS' un aktifleşmesini sağlar ve NO sentezlenir. Ancak kalsiyumu artıran uyarı kesilince, hücre içi Ca^{+2} da azalmaya başlar ve enzim aktivitesi ortadan kalkarak NO sentezi durur. Bu yüzden bu izoform, normal biyolojik sistemlerde düşük miktarlarda NO sentezler. cNOS ilgili hücrelerde daima mevcuttur fakat Ca^{+2} düzeyi yükselinceye kadar inaktif durumdadır. Vasküler yatakta bulunan cNOS dimerik yapıdadır. Endotel hücrelerinin asetilkolin(ach), bradikinin, trombin gibi vazoaktif agonislerce stimülasyonu membran fosfolipazlarını aktive ederek inositol trifosfat (IP3) oluşumunu artırır. IP3 endoplazmik retikulum üzerindeki reseptörlerine bağlanarak hücre içi Ca^{+2} iyon salınımına yol açar. Ca^{+2} iyonlarının kalmodüline bağlanması ile enzimin aktivitesi için temel yapı oluşur. Oluşan NO, feedback mekanizması ile NOS' ı inhibe eder(76).

Yapısal NOS (cNOS) ; nöronal (nNOS) ve endotelial (eNOS) olmak üzere, buldukları yere göre isimlendirilen iki farklı formda bulunmaktadır(77,78).

4.3.1.1. Nöronal NOS (nNOS)

160kDA molekül ağırlığındadır. Beyin hücrelerinde, periferik sinir sisteminde (miyenterik plesus vb.), medulla spinaliste (dorsal kök gangliyonu) ve adrenerjik kolinerjik olmayan sinirlerin sitozollerinde bulunur. nNOS enzimi, glukokortikoidlerle inhibe edilemez. Nöronal hücrenin özellikle glutamat gibi agonist bir madde ile uyarılması, hücre içi kalsiyumun artmasına ve nNOS enziminin aktivasyonuna neden olur. nNOS ile oluşturulan NO çok az miktarlarda (pmol düzeyinde) ve çabuk salıverilirler (Moncada et al 1981).

4.3.1.2. Endotelyal NOS (eNOS)

Endotel (e) NOS vasküler endoteliumda bulunan yapısal bir enzimdir. Damarların parasempatik innervasyonla kolinerjik stimülasyonu intraselüler serbest kalsiyum konsantrasyonunu arttırarak, eNOS'u aktif hale getirir. Oluşan NO diffüzyon ile düz kaslara geçer ve siklik guanilat siklazı (cGC) aktif hale getirir. Salınan cGMP intrasellüler kalsiyumu düşürür. Düz kasların gevşemesini sağlar ve platelet agregasyonunu inhibe eder. Kısa süreli bir etkisi vardır (84,86).

4.3.2. İndüklenebilen (Uyarılabilir) NOS (inducible iNOS)

İlk olarak endotoksin ve sitokinler tarafından uyarılan makrofaj ve karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. Bu izoform aktivite için Ca^{+2} ya bağlı değildir. Bunun nedeni enzimin kalmodulinle çok sıkı bağlanmış olması olabilir. Fakat kalmodulinin buradaki rolü bilinmemektedir. iNOS başta makrofajlar (monosit, histiyosit, kupfer hücreleri vs.) olmak üzere polimorfonükleer lökositler (PMNL), hepatositler, damar düz kası, damar endoteli, astrosit ve kondrositler tarafından üretilir. Enzim indüklendiği zaman NO üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce devam edebilir(77,78). Özellikle nonspesifik immünyetede önemli rol oynar. Bakteri, mantar, virüs, tümör hücreleri ve protozoonlara sitotoksik veya sitostatik etki oluşturur. İnflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda da rol oynadığı bildirilmiştir. iNOS hücre içinde genel yapıda mevcut değildir(80). Ancak bakteriyel ürünler ve sitokinler ile teması takiben, birçok doku ve hücre tipinde üretimi uyarılarak (transkripsiyonel indüksiyon: mRNA artışı) miktarını artırır(87). iNOS'ın molekül ağırlığı 130 kDA'dır. iNOS ile sentez edilen NO, çok daha yüksek miktarlarda (nmol düzeyinde) ve yavaş salıverilirler.

cNOS ile iNOS'un özellikleri ve bazı önemli farklılıkları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir

TABLO.7. cNOS ile iNOS'un özellikleri ve bazı önemli farklılıkları

ÖZELLİK	cNOS	iNOS
Ca bağımlılığı	Var	Yok
NO oluşum düzeyi	Pikomol	Nanomol
Uyurana yanıt	Ani	Geç
NO üretim süresi	Kısa	Uzun
Glukokortikoidlere in Etkisi	Etkilenmez	Uyarılması inhibe edilir

4.3.3. NOS'un Kofaktörleri

NO sentezinde hem, tetrahidrobiopterin (BH₄) flavin mono nükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD) ve kalmodulin (CaM) kofaktörleri gereklidir (Macmicking et al.,1997). Memelilerde bulunan NOS yalnızca dimerik formda fonksiyonel olarak aktiftir. BH₄ kritik bir kofaktördür ve iNOS'ın dimerizasyonu için gereklidir. BH₄'in yetersiz olduğu hücrelerde, inaktif, monomerik formda olan iNOS, BH₄'in varlığında aktif dimerik forma dönüşür (Tzeng et al.1995). NOS'ın bütün izoformları kofaktör CaM'e ihtiyaç duyar ve esansiyeldir. İzoenzimler arasındaki önemli bir fark, eNOS ve nNOS da CaM bağlamalarına ve Ca⁺² fizyolojik değişikliklere aktif olarak cevap vermesine rağmen iNOS, CaM'e sıkıca bağlıdır ve in vivo çok düşük Ca konsantrasyonların da bile tamamen aktiftir. Böylece iNOS substrata kadar sınırsız

olarak NO sentezini devam ettirebilir ve diğer kofaktörler sınırlıyıcı olabilir (Macmicking et al.1997).

4.3.4. NOS İnhibitörleri

Bu maddeler 1-arginin –NO yolundaki patolojilerin araştırılmasında önemlidir, terapötik kullanımları sınırlıdır. Birinci grupta NOS indüksiyonun inhibisyonu için glukokortikoidler, TNF antikorları, IL-1 antagonistleri kullanılabilir. Ancak bu maddeler NOS indüksiyonu başladıktan sonra etkili olmazlar. Diğer grupta ise enzimin ya da kofaktörlerinin direkt inhibitörleri olan 1-arginin analogları yer almaktadır. N-monometil 1-arginin (L-NMMA), N-nitro1 arginin metil ester (L-NAME) L-nitro1-arginin (L-NA). Bu maddeler NOS'u inhibe edip; kan basıncını yükseltirler ve asetilkolinin hipotansif etkisini kısmen ortadan kaldırır. Trombosit agregasyonunu artırır. Özellikle periferik arteriol vazodilatasyonu ile karakterize septik şokta kullanımları gündeme gelmiştir. Çeşitli hayvan modellerinde NOS inhibitörlerinin endotokseminin hemodinamik etkilerini doza bağlı olarak düzelttikleri gösterilmiştir. İnsanlarda yapılan bir çalışmada NOS inhibitörlerinin ortalama arter basıncını, sistemik ve pulmoner vasküler rezistansı ve santral venöz basıncı artırdıkları gösterilmiştir. S-nitroso-N-asetil-penisilamin (SNAP), sodyum nitro prussid (SNP), 3-morfolinosidononimin (SIN1), S-nitrozotioller NO donörleri olarak kullanılırken, N^G-monometil-L-arginin(L-NMMA), N^G-nitro-L-arginin(L-NNA),N^G-nitro-L-arginin-metil ester(L-NAME), N^G-iminoetil-L_ornitin(L-NIO) ve N^G-amino-L-arginin(L-NAA) gibi L-Arginin deriveleri ise NOS enziminin yarışmalı inhibitörü olarak kullanılmaktadır.

Nitrik oksit sentaz enzimi için özel olmayan, ancak enzim inhibitörü olarak kullanılabilen bir diğer madde, NADPH inhibitörü difenileniodinium'dur (Stuehr et al.1991). Ayrıca trifluperazin, klorpromazin, kalmidazolium, W₇,W₁₃ gibi kalmodulin antagonist'leri, kalsiyum kalmodulin bağımlı NOS alt tiplerinin inhibisyonunda kullanılabilir (Bredt and Synder, 1990;Gross and Levi, 1992). NOS enziminin aktivasyonunu engellemenin bir yolu ise, tetrahidrobiopterinsentezini engellemektir. 2,4-diamino-6-hidroksipirimidin (DHAP), N-asetil-5-hidroksitriptamin, N-

metoksiasetil-5-hidroksitriptamin, tetrahidrobiopterin sentezini engelleyerek, bloke eden madde NO sentezini inhibe eden bir diğerk madde ise, metilen mavisidir. Hem grubu içeren enzimleri inhibe eden bu maddenin, çGS enzimini inhibe ettiği pek çok yayında bildirilmiştir (Pearce et al.1990). Metilen mavisini NO'in çGS'in hem grubuna bağlanmasını engeller.(84,85,86)

4.3.5. NO Katabolizması

Metilen mavisinin, NO yıkımında rol alan süper oksid anyonu oluşumunu sağlayarak NO yıkımını arttırdığı bildirilmektedir (Mayer et al.1993). Metillenmiş argininler, aslında doğal maddelerdir ve organizmada varlıkları saptanmıştır (Vallance et al. 1992). Bu durum, NO sentezinin düzenlenmesinde endojen mekanizmaların varlığını göstermektedir.

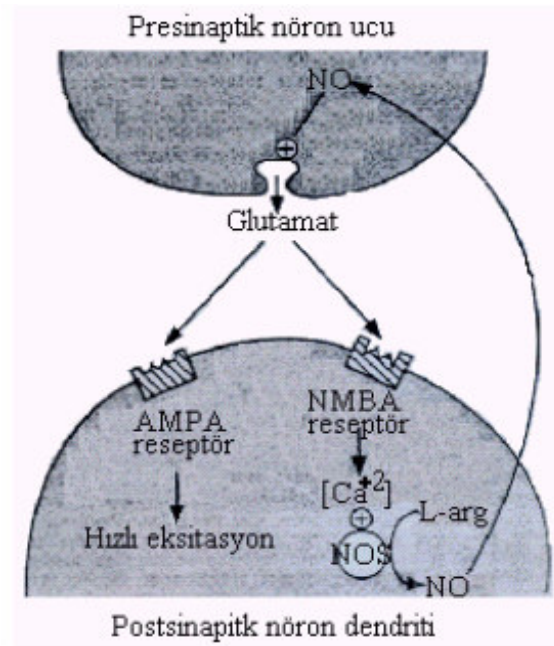
L-NMMA ve dimetilarginin türevleri (SDMA ve ADMA), L-arginin/NO yolağının, endojen inhibitör maddeleridir. Bunlar idrarla değişmeden atılırlar. İnsanda 24 saatlik idrar ile 10mg kadar atıldığı saptanan asimetrik dimetil arjinin (ADMA) kronik böbrek yetersizliğinde birikerek, hipertansiyon ve immün fonksiyon bozukluğu gibi patolojilere neden olduğu ileri sürülmüştür (Granger et al. 1991). ADMA proteinlerde ve protein hidrolizinin ürünlerindeki arjinin kalıntısının metillenmesiyle sentezlenir. ADMA'nın konsantrasyonu vasküler hastalıklı hastalarda artmaktadır. Ayrıca ADMA, dimetil arjinin dimetilaminohidrolaz enzimi ile düşürülür. Bu enzim NOS gibi bazı yumuşak dokularda bulunur ve ADMA ile NO'in sentezinde kesilir.(88,89)

4.3.6. NO'nun Sinir Sistemindeki Rolü

4.3.6.1. Santral Sinir Sistemi

4.3.6.1.a. Fizyolojik Rolü

Yapılan çalışmalarda, beyin dokusunda aktif çalışan arginin-NO yolunun varlığı ispatlanmıştır(41). NO bu reseptörleri etkilemekte ve hücre içindeki cGMP konsantrasyonunu arttırarak fizyolojik etki göstermektedir. Glutamat tarafından indüklenen sinirsel ileti işleminde NO'nun bir nörotransmitter olarak rol oynadığı tam olarak ispat edilmiştir(71-75). NO beyinde nörotransmitter olarak etki gösterir. Öğrenme, bellek oluşumu, görme koklama ve ağrı algılamasında rolü vardır. Öğrenmede uzun süreli potansiyasyonun önemi bilinmektedir. Bu olayda eksitator nörotransmitter glutamat presinaptik nöronun sinaptik boşluğuna salınır ve postsinaptik nörondaki N-metil D aspartat reseptörüne bağlanarak onu aktive eder. Kalsiyum kanalları açılır nöron içine giren Ca²⁺ iyonları kalmodüline bağlanır ve nNOS aktivasyonu ile L-argininden NO oluşur. Hücre dışına çıkan NO nöronun presinaptik ucuna retrograd etki eder ve glutamat salınımında artışa yol açar. Bu olay long term potansiyasyon olarak bilinir ve bellek oluşumunu sağlar; L-arginin ilavesi ile aktive edilip, NOS inhibitörleri ile inhibe edilebilir



Şekil 8. Beyin dokusunda arjinin-NO yolu

4.3.6.1.b. Patolojik Rolü

Eksite edici aminoasitlerin(aspartat, glutamat) aşırı salınımı konvülsiyon ve nörotoksisiteye neden olmaktadır(75). Bu aminoasitlerle reseptörlerin uyarılması ve sonrasında NOS'ın aktivasyonu, serebral iskemi ve epilepsi gibi durumlarda aşırı NO sentezi ve nöral defektlere neden olduğu ileri sürülmüştür. Bu hipotezi destekleyen bulgular hala tartışmalıdır(79).

4.3.6.2. Periferik Sinir Sisteminde NO

NO hayvanlarda, mide içi basınca karşı mideyi dilate ederek yeni duruma uyumunu sağlamaktadır. Ayrıca gastrointestinal sistemin özellikle sfinkterlerinde gevşemeye yol açarak bu organların fizyolojik fonksiyonlarının regüle edilmesine katkıda bulunmaktadır(79,80).

4.3.6.3. Nitrik Oksidin İmmünitedeki Rolü

Yıllar önce araştırmacılar bazı bakteri ürünleriyle nonspesifik bir mekanizma ile kansere karşı direncin arttırılabildiğini göstermişlerdir. Bugünkü bilgilerimize göre bu direnç artışı makrofaj aktivasyonu ve NO sentezi ile doğrudan bağlantılı nonspesifik bir immün olaydır. Nonspesifik immün reaksiyonlar; makrofaj aktivasyonu, NOS'ın indüklenmesi, uzun süreli ve çok miktarda NO sentezinden ibarettir. Bu nonspesifik immünite sadece RES'le sınırlı olmayıp hepatositler ve akciğer hücrelerinde de tespit edilmiştir. NO'e bağımlı nonspesifik immünitede karaciğer ve akciğerin rolü, bu iki organın, sirkülasyon'un immünolojik filtreleri gibi fonksiyon göreceği stratejik bir konumda yer almasından kaynaklanmaktadır.(82)

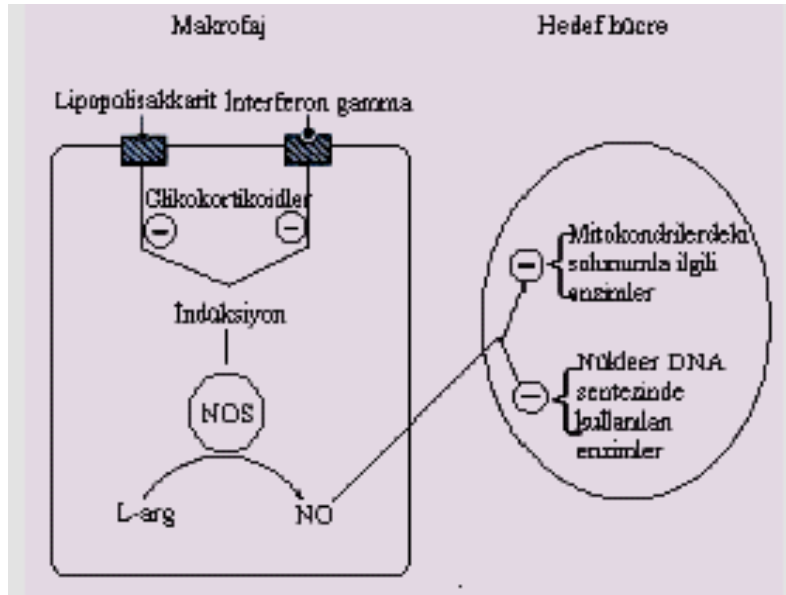
4.3.7. Nitrik Oksitin Biyolojik Sistemlerdeki Etkileri

4.3.7.1. Nitrik Oksitin Sitotoksik ve Apoptotik Etkileri

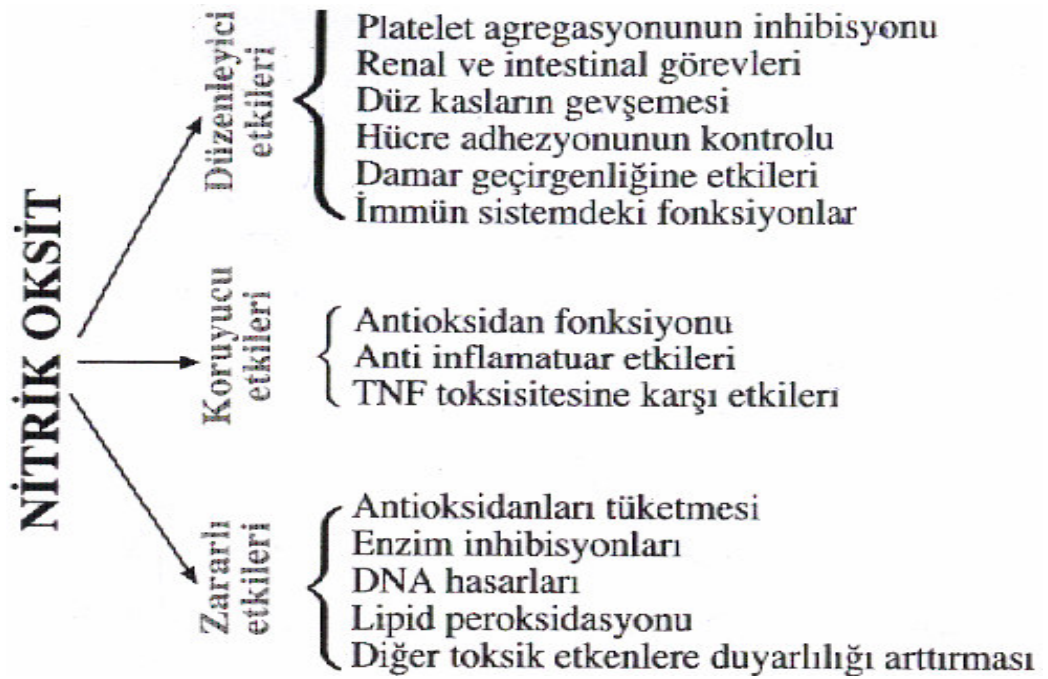
Doku hücrelerinin yenilenmelerinde önemli fizyolojik rolü olan hücre ölümleri, “nekrotik” veya “apoptotik” olarak adlandırılan ve birbirinden farklı iki yolla gerçekleşir. Çeşitli toksik ajanların veya iskeminin neden olduğu nekrotik hücre ölümleri sırasında, hücre zarının geçirgenliği artar ve hücre içeriği bulunduğu ortama bırakılır. Bu şekildeki hücre ölümlerinin embriyonal gelişim veya doku hücrelerinin yenilenmeleri sürecinde görülmesi dokularda tahrip edici etkileri neden olabilir. Oysa apoptotik hücre ölümleri inflamasyon cevabı uyarılmadığı için bu tür tehlike yoktur. Apoptosis sırasında aktif olarak ölmekte olan hücre morfolojik değişimlere uğrar, zardaki özel moleküllerin de aracılığı ile komşu hücreler veya özelleşmiş fagositler tarafından fagositoza uğrar ve böylece hücre içeriği dışarı salınmadığından inflamasyon cevabı da oluşturulmadan hücre ölümü sağlanır. İnterferon veya bakteri lipopolisakkaritleri tarafından aktive edilen makrofajlar büyük miktarda NO sentez ederler. Ancak aşırı NO sentezi hücreler için oldukça zararlı etkiler meydana getirmektedir(84). Makrofaj kaynaklı NO bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki yapmaktadır (88).

NO bakteri, parazit gibi birçok patojenin ve tümör hücrelerinin ATP üreten oksidatif fosforilasyonun (ubikinonredüktaz'ı), glikolizin (gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz'ı), TCA siklusunun (Cis-akonitaz'ı) Fe içeren bazı enzimlerini inhibe etmekte ve sonuçta bakteri, parazit, tümör hücrelerini öldürmektedir (76,81). NO, hedef hücrelerde (bakteri, parazit, tümör hücresi) DNA sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan ribonükleotid redüktazı bloke eder ve hücre DNA'sının deaminasyonu ile bu hücrelerde sitostatik etki meydana getirir (78-79). Ayrıca NO'in, bazı virüslerde viral replikasyonu inhibe ederek antiviral etki oluşturduğu bildirilmiştir (85).

Makrofajlardan özellikle monositlerde L-Arjinin-NO yolu; tümör hücreleri intra-ve ekstrasellüler mikroorganizmalara karşı çok önemli bir defans mekanizmasıdır



Şekil.9. Makrofaj kaynaklı NO, bakteri, parazit ve tümör hücrelerinde çeşitli enzimlerin fonksiyonunu etkileyerek sitotoksik etki yapmaktadır.



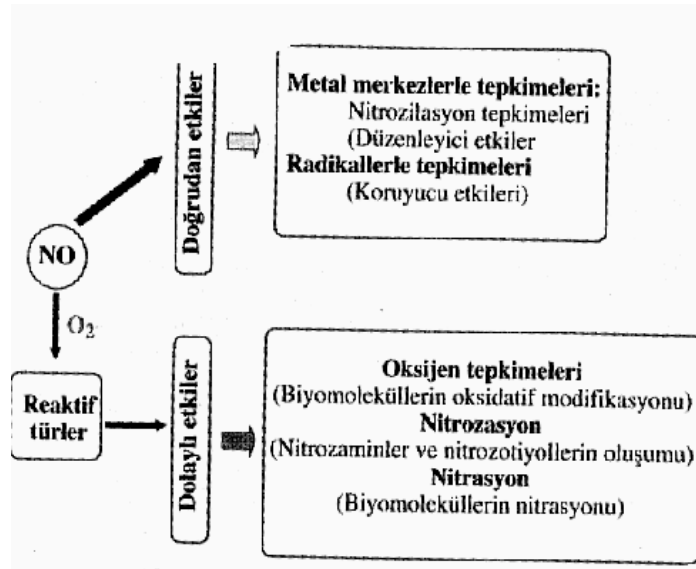
Şekil.10. NO molekülünün çok yönlü etkileri. Çok sayıda düzenleyici ve koruyucu fonksiyonları bulunan NO, hücrelerin fonksiyon ve yaşamlarını tehdit edebilecek çok sık etkilere de sahiptir.

4.3.7.2. NO'nun Doğrudan ve Dolaylı Etkileri

NO'nun düşük derişimlerinde (1 μM 'ın altında) gözlenen etkileri "doğrudan etkiler" olarak adlandırılır. NO'nun doğrudan etkileri içerisinde koruyucu ve regülatör etkileri dahil edilir. Düşük derişimdeki NO daha uzun ömürlüdür ve oksijen ile tepkimeleri daha yavaştır.

NO'nun fizyolojik fonksiyonları için gerekli olan derişimin üstündeki yüksek derişimlerinde (1 μM 'ın üstünde) görülen etkileri ise "dolaylı etkiler" diye adlandırılır. NO'nun derişiminin artması ile oksijen ile tepkimeleri hızlanır. NO'nun kendisinin biyomoleküllerle tepkimeleri doğrudan etkilerini oluştururken; NO'dan kaynaklanan reaktif türlerin tepkimeleri dolaylı etkileri oluşturur.

Biyolojik koşullarda doğrudan etkilerin ya da dolaylı etkilerin görüleceğini belirleyen NO'nun derişimi ve ortamda bulunma süresidir. NO'nun başlıca kaynağı NOS enzimleri olduğundan; gözlenen etki ile NO sentezinden sorumlu enzimler arasında doğrudan bir bağlantı vardır.



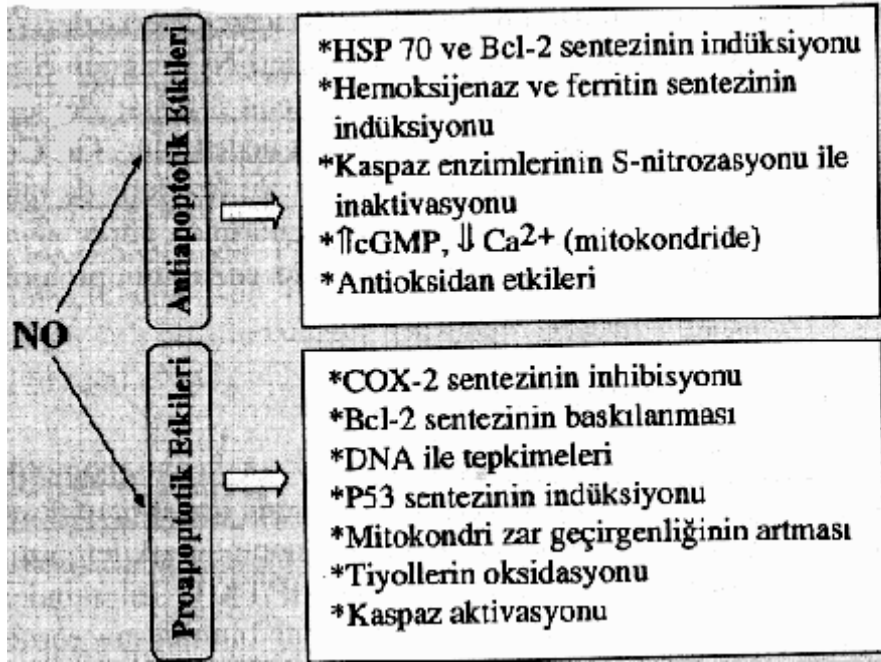
Şekil 11. NO'nun metal içeren merkezler ve radikallerle tepkimeleri doğrudan tepkimeler olup; koruyucu ve düzenleyici etkileri olur NO'nun aerobik ortamda oksitlenmesiyle oluşan reaktif nitrojen oksit türlerinin biyomoleküllerle tepkimeleri dolaylı etkileri olup, biyolojik sistemlerde zararlı etkilere neden olurlar

4.3.8. Nekrotik Hücre Ölümünde Nitrik Oksitin Etkisi

Sitokinler ve toksinler makrofajlar ile çok sayıdaki diğer hücre türleri de iNOS sentezini indükleyerek uzun süreli ve yüksek derişimli NO sentezine neden olurlar. Bu nedenle inflamasyon, sitokinler, bakteriyel toksinler nitrit ve nitrat oluşumunu artırır. Nitrik oksitten kaynaklanan reaktif türler sitotoksik etkili olduklarından, mikroorganizmalara karşı immün savunma sistemine katkıda bulunurlar. Bu nedenle, iNOS eksikliği oluşturulmuş deney hayvanları patojenlere karşı çok daha duyarlıdır. NO'nun sitotoksik etkilerinin glikoliz, sitrik asit döngüsü ve özellikle de mitokondri solunumun inhibisyonundan kaynaklandığı kabul edilmektedir.(87,88,89)

4.3.9. Nitrik Oksitin Apoptosisdeki Etkileri

Hücre tipine bağlı olarak NO proapoptotik ya da antiapoptotik etkilere sahiptir. Endotel hücrelerde, hepatositlerde ve nöronlarda antiapoptotik etkili olan NO; düz kas hücrelerinde ve tümör hücrelerinde proapoptotik etkilere sahiptir.



ŞEKİL.12. Nitrik Oksitin Proapoptotik ve Antiapoptotik Etkilerinin Mekanizmaları

4.3.10. NO- Arginin Yolunun Hastalıklarda Değişimi

Arginin metabolizmasını kullanan makrofajların, kendilerinin ya da bağlantı kurdukları hücrelerin fonksiyonlarını hızlandırdığı veya baskıladığı tespit edilmiştir. Murine makrofajlarında L-arginin-NO yolunun, tümör hücreleri ve mikroorganizmalara karşı başlıca savunma mekanizması olduğu belirtilmektedir (83,84). NO tümörostatik (tümör gelişimini durdurucu) ve tümörisidal (tümör hücrelerini öldürücü) olduğu için, makrofaj arginin metabolizmasının tümör yatağında NO sentezi yoluyla tümör

gelişimini baskılama yönünde çalıştığı ileri sürülmüştür (85). Tümör içi makrofajların metabolizması, NO sentezinden ziyade arginaz yoluyla oluyorsa tümör gelişimi daha da hızlanabilir, çünkü ornitin hücre çoğalması için gerekli poliaminlerin ön maddesidir.

İmmunolojik çalışmalarda, kanserli hastaların hücrel bağışıklık sistemlerinin belirgin şekilde bozulduğu bulunmuştur. Bu bozukluğun kısmen arginazın immun baskılayıcı etkisine bağlı olabileceği belirtilmiştir.

5. SERBEST RADİKALLER

Bilindiği gibi atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar, belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya eğilimlidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momenti dengelenmemiş bu tek elektron; atoma (ya da moleküle) büyük bir aktiflik kazandırır. En dış yörüngede eşlenmemiş bir elektronu bulunan molekül ya da molekül gruplarına “radikal” adı verilmektedir ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle gösterilir ($R\cdot$, $R\dot{\cdot}$) (23-28).

5.1. Reaktif Oksijen Türleri

Oksijen 8 atom numaralı doğada dioksijen (O_2) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu, enerji düzeylerinde bulunan elektronlarının yapısıyla ilişkilidir (23,24).

Oksijen molekülündeki aynı yöne dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde “singlet oksijen” oluşur. Orbitallerden birine

ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse “oksijen radikali” elde edilir.

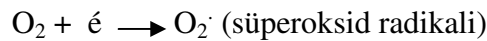
Tablo.8. Oksijen türevi bileşikler

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil (HO [·])	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)
Alkoksil (RO [·])	Singlet Oksijen (O ₂ ^{↑↓})
Peroksil (ROO [·])	Ozon (O ₃)
Superoksit (O ₂ [·])	Hipoklorid (HOCl)
Nitrik oksit (NO [·])	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Azot dioksit (NO ₂ [·])	Peroksinitrit (ONOO [·])

Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdaki kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Sonuçta nonradikal yapıyı radikal şekle dönüştürebilirler. Bu özellikleri ile reaktif oksijen partikülleri iki ana başlık altında incelenmektedir (23,24).

5.1.1. Süperoksit Radikalleri(O₂[·])

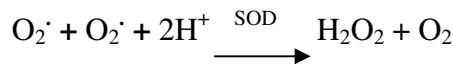
Süperoksit radikalleri(O₂[·]), hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu ile üretilmektedirler. Süperoksit oluşumu; a-) elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve b-) ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır. Zayıf bir oksidan olan süperoksit radikalinin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak süperoksit radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir(29). Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda O₂ ve H₂O₂ demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan HO[·] radikallerini oluşturmaktadırlar.





Üretilen bu OH^\cdot Radikalleri oldukça reaktif olup DNA gibi yapılarla reaksiyonlara girerek önemli hasarlara yol açabilmektedir (30).

O_2^- radikalleri, hücre içi demir depolarından demiri serbest hale getirir. Serbest hale geçen demir iyonu Haber-Weiss gibi radikal üreten reaksiyonlarda veya diğer serbest radikal aracılıklı hücre hasarında rol oynayabilir. Superoksit radikalleri çok kısa bir yarı ömre sahip olup dismutasyon reaksiyonu ile H_2O_2 ve oksijen üretirler. Dismutasyon reaksiyonu spontan olarak meydana gelmekte ve reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile katalizlenmektedir.



5.1.2. Hidroksil Radikalleri (HO^\cdot)

Hidroksil radikali (HO^\cdot), biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldir. Dokular radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorblanır ve radyasyon oksijen-hidrojen arasında kovalent bağa neden olur. Sonuçta şekilde görüldüğü gibi iki radikal meydana gelir. Bu radikallerden biri hidrojen (H^\cdot) ve diğeri ise hidroksil radikali (OH^\cdot).



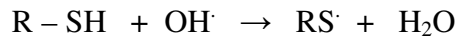
Hidrojen peroksitin (H_2O_2) Fe^{+2} veya Cu^{+2} ile reaksiyona girmesiyle de OH^\cdot oluşmaktadır. H_2O_2 toksisitesinin büyük çoğunluğunun temelinde bu oluşan OH^\cdot olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyon ilk defa 1894 yılında Fenton tarafından gözlenmiş ve günümüzde de Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.



OH^\cdot radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. OH^\cdot DNA da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve bu oluşan ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları görülmüştür. Yine OH^\cdot aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiklerinden DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşumuna neden olurlar. Örneğin: Timine katılarak timin-

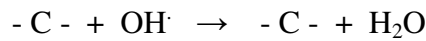
radikalini oluşturur ve bu radikal oksijenle reaksiyona girerek son derece reaktif olan timin peroksil-radikaline dönüşmektedir. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen OH[·] DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik kırılmalarına neden olurlar. Hasar çok kapsamlı olursa hücrel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir (29,31).

DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşmenin yanısıra tiol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu da koparabilmektedir.

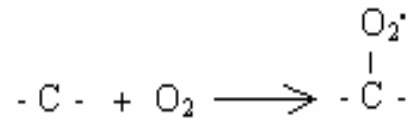


Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O₂ ile kombine olabilir ve oksisülfür radikallerini oluşturur. RSO₂[·] ve RSO[·] gibi bunların bir çoğu da biyolojik moleküllerde hasara neden olurlar.

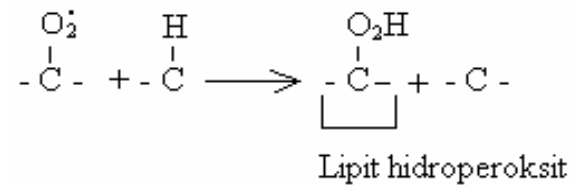
OH[·]'ın sebep olduğu en iyi karakterize edilmiş olan biyolojik hasar lipid peroksidasyon olayıdır. OH[·] membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle araşidonik asit gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinden -C atomunun birinden H atomunun çıkartılması ve su oluşumu şeklinde gerçekleşir



Bu reaksiyon sonunda membranda -C[·]- radikali kalır. Bu -C[·]- radikali oksijen ile kombine olarak peroksil radikalini oluşturur.



Peroksil radikaller reaktiftir ve yakınındaki doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerine saldırır;



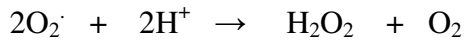
Böylece OH[·] radikalleri, yüzlerce yağ asitlerinin yan zincirlerini lipit hidroperoksitlere dönüştürür. Membranda lipit hidroperoksitlerinin birikimi membran fonksiyonunu bozar. Peroksil radikaller ve sitotoksik aldehytler, membran proteinlerinde

ciddi bir hasara neden olurlar ve membrana bağılı bazı enzimleri ve reseptörleri inaktive ederler (24, 32, 33).

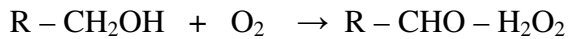
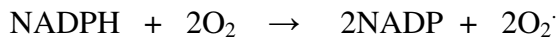
5.1.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından aslında bir radikal değildir. Süperoksit anyonunun (O₂⁻) hidrojenle yaptığı reaksiyona Dismutasyon reaksiyonu adı verilir ve Dismutasyon hızı asidik pH değerlerinde hızlanır (24, 34).

Reaksiyon şu şekilde ifade edilir;

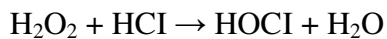


Bazı enzimler ya tekli (NADPH oksidaz) ya da çiftli (Glukoz oksidaz) elektron eklenmesini katalize ederek O₂⁻ veya H₂O₂ oluşmasını sağlarlar.



5.1.4. Hipoklorik Asit (HOCl)

Hipokloröz asit de radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) içinde yer almaktadır. Fagositik hücrelerin bakterileri öldürülmesinde önemli rol oynarlar. Aktive olan nötrofiller, monositler, makrofajlar ve eozinofiller süperoksit radikallerini (O₂⁻) üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz etmektedir. Özellikle nötrofiller miyeloperoksidaz enzimleri aracılığıyla önce O₂⁻'in oluştururlar ve daha sonra dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'i meydana getirirler.



5.1.5. Singlet O₂ (O₂^{↑↓})

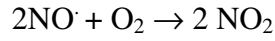
Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmadığından serbest radikal değil ancak serbest radikal reaksiyonlarını başlattıklarından serbest radikal sınıfına dahil edilmiştir. Singlet O₂, oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça oluştuğu tespit edilmiştir.

Serbest oksijen radikallerinin etkisiyle peroksil radikalleri (ROO[·]), alkoksil radikalleri (RO[·]) karbon merkezli radikaller (R[·]) veya tiol radikalleri (RS[·]) oluşur. Bu radikaller oksijenle tekrar reaksiyona girerek yeni serbest radikaller üretirler (35).

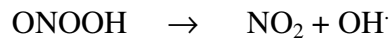
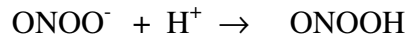
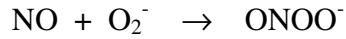
5.2. Reaktif Nitrojen Türleri (NO, NO₂, NO⁺, NO⁻)

Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir (36). Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO, bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür (37,38, 39). Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir (36). NO[·]; bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır (40). Bu lipofilik serbest radikal damar endotel hücrelerinde Nitrik Oksid Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. NOS'ın birçok izoformu tanımlanmıştır. NO[·]'in yarı ömrü 10–20 saniyedir. Kolayca düz kasa geçerek Guanilat Siklaz (GC) enziminin “hem” demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır. Sentezlenen NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO, Fe-S kümelerine afinite gösterdiği için bu grupları içeren akonitaz enzimine de bağlanır. Bu enzim hücre içi demir trafiğini kontrol eder. NO, akonitaz enzimine mRNA bağlanmasını artırır ve enzimin aktivitesini düşürür.

NO[·] metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp nitrojen dioksidi (NO₂) oluşturur:



NO[·]'in ROS'leri ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla OH[·] radikalinin oluşumuna yol açtığı ifade edilmektedir:



OH[·] radikali ise biyolojik olarak yıkıcı bir moleküldür. Ayrıca, peroksinitrit de tirozin gibi fenolik amino asitleri nitrolayarak toksik nitro- türevlerini (nitrotirozin) oluşturmaktadır. Sonuç olarak NO, endotel hücre disfonksiyonu ve buna bağlı ateroskleroz, hipertansiyon ve DM gibi bazı önemli hastalıklarda rol oynayabilmektedir.

5.3. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında olduğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkilerin etkisiyle de oluşabilir. Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanısıra radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırmırlar. Sitokrom P 450, sitokrom b5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, oksidatif stress yapan iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumlar, mitokondrial elektron transport sistemi (ETS), moleküler otooksidasyon yapan tiol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrel serbest radikalleri oluştururlar (35, 41) . Serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

5.3.1. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Normal olarak metabolizmada, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Her ne kadar serbest radikal yapısına

sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri varsa da, bazı metabolik olayların ilerleyebilmesi için bunların oluşması kaçınılmazdır.

5.3.1.1. Mitokondriyal Elektron Transport Sistemi

Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1–5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır. Fizyolojik olarak reaktif oksijen türlerinin temel kaynağı normal oksijen metabolizmasıdır. Dolayısıyla fizyolojik koşullar altında mitokondriyal elektron transport sistemi serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır (42).

5.3.1.2. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P-450 moleküler oksijeni kullanarak birçok substratı oksitler. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturur. Bu reaksiyon monooksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu olarak adlandırılır.

Kimyasal ajanların serbest radikal oluşturmadaki en önemli mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur. Bu sistem, molekülleri indirgeyerek veya oksitleyerek serbest radikal oluşturur. Son durumda bir elektron eksikliği vardır ve elektrofilik bileşik oluşur. Oluşan bu elektrofilik ürün bir nükleofil ile reaksiyona girer. Bu elektrofilik bileşiği çeken en önemli bileşik sistein kalıntıları üzerindeki tiyol (-SH) grubudur. Tiyol grubu ise pek çok endojen makromolekülde (DNA, RNA, enzimler gibi) bulunduğu için reaktif ara ürünler bu moleküllerle kovalent bağlanarak toksisite gösterbilirler (43).

5.3.1.3.Redoks Döngüsü

Ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal reaksiyonlarla olmamaktadır. Menadion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin, gibi bileşikler alternatif bir

redoks siklusuna girerler. Bu bileşikler, ilave bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikaller, tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir ve süperoksit radikalini oluştururlar (44)

Oluşan ksenobiyotik ve süperoksit radikalleri intra sellüler ferritin depolarından demiri serbest hale getirirler. Sitozole salınan demir, serbest radikaller arasında en reaktif olan ve dolayısıyla daha yıkıcı olan hidroksil radikali gibi ikincil radikallerin oluştuğu Fenton reaksiyonunda katalitik rol oynar (29).

5.3.1.4. Araşidonik Asit Metabolizması

Hücre membranlarında prostaglandin için en önemli doymamış yağ asidi prekürsörü araşidonik asittir. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonu, plazma membranlarında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin siklooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu prostaglandinleri, lipooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu ise lökotrienleri verir ve bu tepkimeler sırasında serbest radikaller oluşur (45).

Araşidonik asit oksidasyonu başlatılmış bir serbest radikal reaksiyonudur. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerinin her ikisi de aktiviteleri için peroksitlere ihtiyaç duyarlar. Siklooksijenaz aktivitesi daha sonra prostaglandinlerin sentezi içinde gerekli olan endoperoksitlerin oluşumuyla sonuçlanır. Öte yandan lipooksijenaz lipit peroksitleri üzerinden lökotrienlerin oluşumunu katalize eder (45). Aynı zamanda bazı ksenobiyotiklerden bu esnada reaktif ara ürünler oluşmaktadır. Bu ara ürünler hedef yapılarla etkileşerek toksisite gösterirler.

5.3.1.5. Fagositoz

Radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırmırlar. Aktive fagositler intrasellüler radikal oluşumuna neden olurlar

(Tablo–9). Aktive olmuş fagositlerde üretilen serbest radikaller patojenlerle savaşta önemli rol oynar.

Tablo. 9. Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler

Trombositler	H_2O_2 , $O_2\cdot$, $OH\cdot$
Nötrofiller	H_2O_2 , $O_2\cdot$, $OH\cdot$, $HOCl$
Eozinofiller	H_2O_2 , $O_2\cdot$, $OH\cdot$, $HOCl$,
Makrofajlar	H_2O_2 , $O_2\cdot$, $OH\cdot$, $HOCl$, $NO\cdot$

Kan monositleri, doku makrofajları (kupfer hücreleri, alveolar makrofajlar) gibi fagositik hücreler ve nötrofiller, eozinofiller, bazofiller gibi granüositler immunojenik veya özel bir uyararla uyarıldıktan sonra lizozomlarını dışarı vermeye başlarlar. Reaktif oksijen oluşumunun yanısıra, mitokondri dışındaki oksijen üretiminde bir patlama (respiratory burst) olur. Fagositte edilmiş, patojenler oksidan ajanlar tarafından öldürülür. Solunum yolu ile patlamanın (respiratory burst) amacı oksidan ajanlar sağlamaktır. Oluşan oksidan ajanlar patojenleri öldürmenin yanısıra myeloperoksidaz sistemine de etki eder. Hidrojen peroksit ve hipoklorit kombinasyonu myeloperoksidaz sistemine etkiyerek de güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterir. Bu radikaller memeli bakteri ve parazitlerine karşı sitotoksik etkiye sahip oksidan ajanlardır. Membran peroksidasyonu, membran proteinlerinin dekarboksilasyonu ve/veya oksidasyonuna yol açıp membran bütünlüğünü bozabilir ve DNA'yı okside ederek parçalayabilir. Fagositik kaynaklı oksidan ajanlar; ototoksik, immunosupresif ve mutajenik etki oluşturabilirler (45).

5.3.1.6. Otooksidasyon

Doku bileşenlerinin çoğu moleküler oksijenin varlığında kimyasal olarak stabil değildirler ve metabolik şartlar altında az yada çok otookside olurlar. Kolayca otookside

olabilen bu bileşenler doku ve hücrelerin son derece önemli komponentleridirler (46,47,48). Bunlar arasında, Hemoglobin gibi metalloproteinler, hormonlar, tiyoller, doymamış membran lipitleri sayılabilir.

Bütün otooksidasyonlar sırasında serbest radikal intermediyerleri kadar aktive oksijen türleri de üretilir. Böylece otooksidasyonlar vücudun radikal kaynaklarına katkıda bulunurlar.

5.3.1.7. Oksidan Enzimlerin Reaksiyonları

Aerobik organizmalarda oksijenin katıldığı birçok reaksiyonda oksijenin tek değerlikli indirgenmesiyle süperoksid anyonu meydana gelebilir. Glikojen oksidaz, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, NADH oksidaz, diamin oksidaz, urat oksidaz gibi enzimler bunlardan bazılarıdır.

Üzerinde en çok çalışılan enzim Ksantin oksidaz (XOD) aslında ksantin dehidrogenaz (XDH) olarak sentezlenmekte ve bu şekilde dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enzim elektronlarını moleküler oksijene değil NAD'ye verir ve süperoksit anyon radikali oluşturmaz. Fakat XOD sülfidril oksidasyonu ya da sınırlı proteolizis ile dehidrogenaz formunda oksidaz formuna dönüşebilir. XOD moleküler oksijeni kullanarak H_2O_2 ve $O_2^{\cdot -}$ oluşturmaktadır(49).

5.3.2. Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

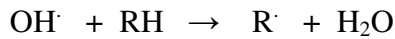
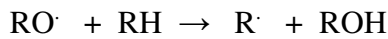
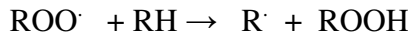
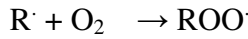
Serbest radikaller, ekzojen nedenlerle de oluşabilir. Radyasyon, sigara dumanı, zehirli gazlar, bazı ilaçlar, kanserojen maddeler ve pestisitler en önemli ekzojen serbest radikal üretim kaynakları olarak bilinirler (50).

5.3.2.1. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri

5.3.2.1.a. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

Serbest radikallerin en önemli etkisi lipitler üzerine yaptığı etkidir ki bu lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır (51–53). Lipit peroksidasyonu doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşmesi sonucu doymamış yağ asidindeki metilen grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalin süperoksit anyon radikali ile hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Süperoksit anyon radikali hidroksil radikaline dönüşmektedir. Benzer şekilde hidrojen peroksidin de hidroksil radikaline dönüştüğü bilinmektedir. Bu nedenle lipit peroksidasyonunu başlıca hidroksil radikali başlatmaktadır (51).

Hidrojen atomunun koparılmasıyla oluşan serbest yağ asidi radikali moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksit radikalini oluşturur. Oluşan peroksit radikali yüksek reaksiyon yeteneğine sahip olup başka bir yağ asidi molekülü ile yeni bir hidroperoksit ve yeni bir yağ asidi radikali oluşturacak şekilde reaksiyona girer. Oluşan bu yağ asidi radikali yeniden oksijen ile birleşir ve RH dan yeniden bir hidrojen atomunun ayrılmasını sağlar. Bu başlayan zincir reaksiyonu oluşan yeni radikallerin etkisiyle devamlı olarak artan bir hızda devam eder (51,52).



Birçok olayda bu şekilde oluşan lipit peroksiti RO \cdot Ve OH \cdot verecek şekilde parçalanır ve bu oluşan radikaller hemen substrat ile reaksiyona girerek yeni zincir reaksiyonlarını başlatacak olan R \cdot radikallerini oluştururlar. Böylece oluşan bir radikal sürekli olarak yeni radikallerin oluşmasına neden olur (52).

Lipit peroksitleri hücre zarlarının önemli bir komponentidir ve Fe, Cu gibi geçiş metallerinin varlığında alkoksi ve peroksi radikallerini verirler. Bu nedenle Fe veya Cu tuzları lipit peroksidasyonunun hızını artırırlar. Sonuçta hücre zarının akışkanlığını ve permabilitesini azaltarak zar bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Lizozomal

membranların tahribi hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olur. Biriken hidroperoksitler direkt olarak toksik etki göstermenin yanısıra duyarlı aminoasit kalıntılarını (methionin, histin, sistein, lizin) okside eder veya zincir polimerizasyon reaksiyonlarıyla enzimleri inaktive edebilirler (45, 52, 54).

5.3.2.1.c. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar (56).

Enflamatuar eklem hastalıklarında synovial sıvıya geçen PML'lerden extrasellüler sıvıya salınan H₂O₂ ve O₂ buradaki mukopolisakkarit olan hyalüronoik asidi parçalarlar (58). Gözün vitöz sıvısında bol miktarda hyalüronik asit bulunur. Bununda oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunur (58).

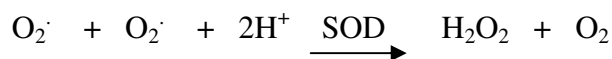
5.3.3. Antoksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta “antioksidan savunma sistemi” adı verilen birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bütün hücreler güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidatif strese karşı savaşmaktadırlar savunma sistemlerini serbest radikal tutucuları ve bazı enzimler oluşturmaktadır ve savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi etkili olmaktadır (68).

5.3.3.1.Enzimatik Antioksidanlar

5.3.3.1.1 Süperoksit Dismutaz (E.C.1.15.1.1)

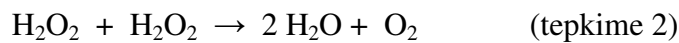
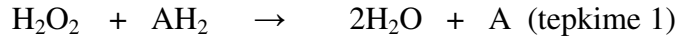
SOD süperoksit anyonunun hidrojen perokside dismutasyonunu katalizler.



SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı başlıca enzimatik savunma mekanizmalarıdır. SOD ile O₂'nin dismutasyonu ile H₂O₂ çıkarılması hücre için biyolojik avantaj sağlar. Hücreden H₂O₂ çıkarılması için SOD; katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile birlikte çalışır (68,69).

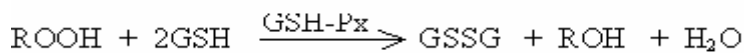
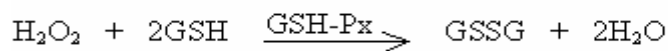
5.3.3.1.2. Katalaz (E.C. 1.11.1.16)

Katalaz yapısında hem grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir (70). Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve müköz membranda yüksek miktarda bulunmaktadır (71). H₂O₂ oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle (tepkime 1) veya H₂O₂ oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle (tepkime 2) hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdaki uzaklaştırır (46).

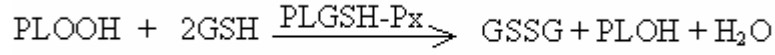
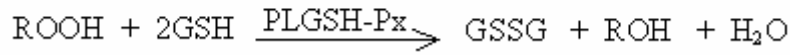


5.3.3.1.3 Glutatyon Peroksidaz (E.C 1.11.1.9)

Glutatyon peroksidaz, hidrojenperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik ve 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Birbirine kenetli enzim sistemi GSH-Px ve GSH-Rd glutatyon harcayarak H₂O₂ 'nin redüksiyonunu katalizler (68).

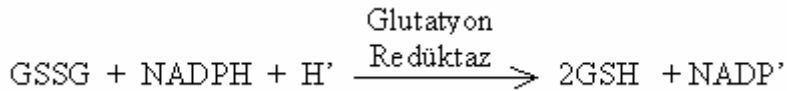


Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz da (PLGSH-Px) molekül ağırlığı 20.000 dalton olan, monomerik selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksidlerini, alkollere indirger.



Membrana bağılı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğu zaman PLGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar.

Hidroperoksidlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür.



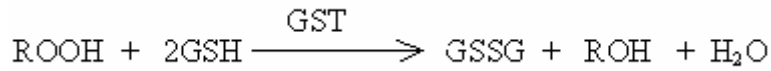
GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller.

Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar.

5.3.3.1.4. Glutation-S-Transferazlar (E.C.2.5.1.18)

GST'lar antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Son zamanlara kadar GST'lar katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılmaktaydılar. (aril transferaz, alkil transferaz, epoksit transferaz, aralkil transferaz ve alken transferaz gibi). Daha sonra yapılan çalışmalar bu enzimlerin söz konusu reaksiyonların herhangi birine özgül olmadığını, iç içe geçmiş substrat özgüllüğüne sahip olduğunu ortaya koymuş ve bunlar 'glutatyon-S-transferaz' lar adı altında toplanmıştır. Günümüzde ise türe bağımsız bir sınıflama yapıldığında GST'lar geleneksel olarak üç sitozolik bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar.

Başta araşidonik asid ve lineolat hidroperoksidleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı GST'lar Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar.

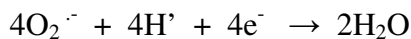


Homodimerik veya heterodimerik enzimler olan GST'lerin, araştırılan tüm canlı türlerinde bulunması bunların hayati öneminin göstergesidir. Bu enzimler katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; yabancı maddeleri glutatyon (GSH)'daki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar. Bu yol, GST'lerin kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu gösterir.

Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimler için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir. Birçok pigment (bilirubin, hematin, bromsülfattalein, indosiyanın gren gibi), kolik asitler, steroid hormonlar, polisilik aromatik hidrokarbonlar bu proteinler tarafından bağlanıp taşınabilmektedirler.

5.3.3.1.5. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir.



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak, süperoksit üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksitin zararlı etkilerine engel olurlar.

5.3.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

5.3.3.2.1. Askorbik Asit

C vitamini, Suda çözünme özelliği gösterir; ancak lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur.

C vitamini, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. E vitaminin rejenerasyonunda görev alarak tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte LDL oksidasyonunu etkili bir şekilde engellemiş olur.

C Vitamini, fagositoz için de gereklidir. Bu vitaminin kemotaktik cevabı artırdığı görülmüş; oksidatif patlama sırasında çevreye yayılan reaktif bakterisidal moleküllerin antibakterisidal etkisini sağlayan intrasellüler konsantrasyonlarında bir azalma yapmadan, oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini önlediği gözlemlenmiştir.

C Vitamini, antioksidan etkileri yanında organizmada fenton reaksiyonunda ferri demiri ferro demire indirgeyerek hidrojen peroksitle etkileşmeye uygun olan süperoksit radikalının üretimine neden olur.

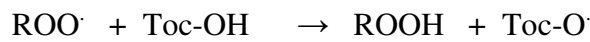
Bu etkisi sebebiyle askorbik asit aynı zamanda pro-oksidan olarak kabul edilmektedir; fakat bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki gösterir (73).

5.3.3.2.2. α -Karoten (Vitamin A ön maddesi)

α -karoten yağda çözünen bir antioksidan olarak serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksiyonuna girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu önler (72,73).

5.3.3.2.3. Vitamin E (α -Tokoferol)

α -Tokoferol yağda çözünen ve zincir-kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki yağ asitlerini korumaktır. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membran fosfolipitlerinin - α tokoferole karşı çok yüksek affinitesi vardır. Tokoferoller fenolik bir hidrojeni peroksidasyona uğramış bir doymamış yağ asidindeki serbest peroksit radikale aktarırlar (44). Bunun sonucunda serbest radikal zincir reaksiyonları kırılır.



Oluşan serbest α -tokoferol radikali bundan sonra yeni bir serbest peroksit radikaliyle reaksiyona girer. Böylece α -tokoferol kolay reversibl oksidasyona uğramaz. Kroman halkası ve yan zincir şeklindeki serbest olmayan radikal ürününe okside olur. Bu oksidasyon ürünü ikinci konumundaki hidroksil grubu üzerinden glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yoluyla atılır (74).

Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. Bundan dolayı en yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipit yapılarında örneğin eritrosit ve solunum sistemi membranlarında etkileri belirgindir (75,76).

5.3.3.2.4. Polifenoller

Fenoller, aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren etkili antioksidanlardır, çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir, bu nedenle diğer radikallere göre etkin olmayan radikallerdir.

5.3.3.2.5. Transferin ve Laktoferrin

Demiri bağlayarak lipid peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır.

5.3.3.2.6. Seruloplazmin

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmını akut faz proteini olan seruloplazminden kaynaklanır. Seruloplazmin oksijen radikal ara ürünleri salınmaksızın Fe(II)'yi Fe(III)'e oksitler. Seruloplazmin demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonu inhibe eder. Daha az önemli olmakla birlikte süperoksit radikali ile reaksiyona da girer

5.3.3.2.7. Albümin

Albümin kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Yüksek konsantrasyonlarda (40-60 mg/ml) bulunur. Albumine bağlı bakır, Fenton reaksiyonuna katılabilir fakat albumin yüzeyinde oluşacak olan OH radikali albumin tarafından temizlenir ve radikalın serbest solüsyona kaçmasına izin vermez. Bu biyolojik olarak önemli olmayan, albumine ait bir reaksiyon örneğidir. Aynı zamanda myeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl'i hızlı bir şekilde temizler.

5.3.3.2.8. Ürik Asit

Kuvvetli olarak demir ve bakır bağlama yeteneği, antioksidatif rolünün önemli bir parçasıdır. Lipit peroksidasyonunu inhibe etme ve radikalleri temizleme görevine sahiptir.

5.3.3.2.9. Bilirubin

Hem katabolizması ile meydana gelen ve albumine bağılı olarak taşınan bir safra pigmentidir. Yağ asitlerini peroksidasyona karşı kuruma görevine sahiptir.

6. MATERYAL ve METOD

6.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışmamızda Harran Üniversitesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında rutin olarak kullanılan cihazlardan yararlanılmıştır.

1. Santrifüj (Hettich Universal 30 RF)
2. Spektroflorometre (Shimadzu RF-1501 MODEL, Japon)
3. Derin dondurucu (New Brunswick Scientifi, C54285 model)
4. Vorteks (Nüve, NM 110 model, Türkiye)
5. Hassas terazi (Sartorius marka 0,0001 g'a duyarlı)
6. Su banyosu (Nüve, BM 402 model, Türkiye)
7. Dijital pH-metre (Hanna, pH 211 model Japon)
8. Otomatik biyokimya analizörü (Aeroset, U)

6.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. $MnCl_2$ (sigma)
2. L-Arginin(sigma)
3. Karbonat tamponu
4. $HClO_4$ (Merc)
5. $FeCl_3$ (Merc)
6. H_3PO_4 (Carlo ERBA)
7. H_2SO_4 (Merc)

8. DAM(Diasetil Monoksim Carlo ERBA)
- 9.Thiosemi carbazid (Sigma)
10. Üre(3mg),benzoik asit
- 11.ZnSO₄(Merc)
- 12.NaOH(Merc)
- 13.Naphyle-etilen –diaminoklorid(Merc)
- 14.Sülfanilamid(Merc)

6.3. Yapılan İstatistiksel Analizler

Ticari bir program olan SPSS 11.5 paket programı ile tekrarlı varyans analizi kullanılarak gerekli istatistiksel analizler ve şekiller yapıldı. $p < 0,05$ ve $p < 0,001$ olması anlamlı olarak kabul edildi. Grupların arasındaki farkı değerlendirmek için student t-test kullanıldı. Parametrelerin arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için ise korelasyon analizi yapıldı.

6.4. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Hasta Grubu: Bu çalışmamızda Şanlıurfa'nın Harrankapı Sağlık Ocağına başvuran ve deneysel tedavi yöntemiyle layşmanyazis paraziti taşıdığı kesinleşen, anamnezinde infeksiyon dışında herhangi bir şikayeti olmayan, fizik muayenesinde herhangi bir patoloji saptanmayan, klinik ve laboratuvar tetkiklerinde lokal veya sistemik hastalık tespit edilmeyen, alkol ve sigara kullanmayan, herhangi bir kanser risk faktörü taşımayan 20 şark çıbanlı hastaların ve bu hastaların tedavi almadan önceki kanlarının alınması yanı sıra 1.doz, 2.doz, 3.doz, 4.doz ve 5.doz tedavileri sırasındaki kanları alınıp hasta gurubu oluşturuldu hasta gurubunun yaş ortalaması $46,48 \pm 21,30$ arasındadır.

Kontrol Grubu: Bu çalışmada kontrol grubu olarak yine aynı bölgelerde bulunan, deneysel tedavi yöntemi ile şark çıbanı paraziti taşımadıkları kesinleşen, anamnezinde herhangi bir şikayeti olmayan, fizik muayenesinde herhangi bir patoloji saptanmayan, klinik ve laboratuvar tetkiklerinde lokal veya sistemik hastalık tespit

edilmeyen, alkol ve sigara kullanmayan, herhangi bir kanser risk faktörü taşımayan 20 kişi randomize olarak seçildi. Kontrol grubunun yaş ortalaması 24 – 48 idi.

6.5.Örneklerin Hazırlanması

Şark çıbanı hastalarında heparinli tüplere 8 cc kan alınıp, 3500 rpm'de 5 dakika santrüfjü edilerek plazması ayrıldı. plazma ve -80 derece saklandı.

6.6.Arginaz Ölçümü

Arginaz ölçümü TDMU(Thiosemikarbazid diasetil monoksim) yöntemiyle ölçüldü(17).

Reaktif 1: $MnCl_2$ den 5 mmol/lit hazırlandı.(100mikrolitre serum +900 mikrolitre $MnCl_2$) her serum için 1/10 oranında $MnCl_2$ solüsyonu ile dilüe edildi.

Reaktif 2: 25mmol/L L-Arginin 0,4ml hazırlandı.

Reaktif 3: Karbonat tamponu: Na_2HCO_3 'ten 40mM 500 mlhazırlandı. $NaHCO_3$ 'ten 40mM 500ml hazırlandı. İki solüsyon PH:9,6'ya ayarlandı.

Reaktif 4: 1 N $HClO_4$ 0,5 ml hazırlandı.

Reaktif 5: Asit karışımı:

a) 0,12 molar $FeCl_3$ bir miktar distile suda çözülmüş 667 μ lt %85'lik H_3PO_4 ilave edilerek 100 mlt'ye tamamlandı.

b)Asit karışımından 1 ml,999 ml %20'lik(v/v) H_2SO_4 içerisine ilave edildi.

Reaktif 6: 1 mlt reaktif ayracı; 0,0617 Molar DAM(Diasetil monoxim) +0,0036Molar Thiosemi Carbazit karıştırıldı.

Yöntemin Uygulanışı: $MnCl_2$ 'den 5mmol/Lt hazırlandı, sonra her serum örneği için 1/10 oranında $MnCl_2$ solüsyonu ile dilüe edildi. (100mikrolitre serum + 900 mikrolitre $MnCl_2$) hazırlanan karışım 55 °c de 8 dakika inkübe edildi 25 mM L-Argininden 0,4 mlt, 40mM (PH=9,6) karbonat tamponundan 0,4 mlt(carbonat tamponu: Na_2HCO_3 'ten 40mM 500 ml hazırlandı. $NaHCO_3$ 'ten 40 mM hazırlandı. İki solüsyon pHmetre altında karıştırılarak PH : 9,6'ya ayarlandı.) ve ön inkübasyona bırakılmış

serumdan 0,2 mlt alındı hazırlanan yeni karışım 37°c de 60 dakika inkübe edildi karışıma 0,5 mlt 1N HClO₄ ilave edildi karışım 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen karışımın supernatant'ından 0,5 mlt, asit karışımından 1,5 ml (asit karışımı: 0,12 Molar FeCL₃ bir miktar distile suda çözüldü 667 µlt %85 lik H₃PO₄ ilave edilerek 100 mlt ye tamamlandı. Hazırlanan salüsyondan 1 mlt, 999 mlt %20'lik (v/v) H₂SO₄ içerisine ilave edilerek hazırlandı ve 1mlt renk ayracı 0,0617Molar DAM[Diasetil Monoxim] ve 0,0036 Molar Thiosemi carbazit karıştırılarak hazırlandı. Tüplerin ağzı kapatılarak vortekslendi. Hazırlanan yeni karışım 10 dakika 80°c de inkübe edildi. Sonra 5 dakika buzlu su banyosunda bekletildi. 520 nm'de köre karşı okundu.

Numune körü her örnek için; 0,2 mlt serum örneğine 0,5 mlt HClO₄ ilave edildi. 5 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant'dan 0,5 mlt, asit karışımından 1,5 mlt, renk ayracından 1 mlt karıştırıldı. Tüplerin ağzı kapatılarak vortekslendi. 10 dakika kaynar su banyosunda (-80°c) inkübe edildi 5 dakika buzlu su banyosunda bekletildi ve 520 nm'de okutuldu.

Standart hazırlanması; 3mg üre, 100mlt 0,016M benzoik asit solüsyonu içerisinde çözüldü. Çalışma sırasında 1/5 oranında sulandırılarak kullanıldı. 0,5 mlt 1N HClO₄ ilave edildi. 5000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant'dan 0,5 mlt, asit karışımından 1,5 mlt, renk ayracından 1,5 mlt karıştırıldı. Hazırlanan karışım vortekslendi 10 dakika kaynar su banyosunda (-80°c) inkübe edildi 5 dakika buzlu su banyosunda bekletildi ve 520 nm'de spektrofotometrede okutuldu.

6.7. NO Ölçümü ve Griess Reaksiyonu

Bugün için NO'ı organizmadan izole etmek ya da dokular ve biyolojik sıvılardaki miktarını doğrudan tayin etmek mümkün değildir. Buna en büyük engel NO'in 5-10 saniye olan yarılanma ömrüdür. Bu yüzden NO ölçümleri indirekt yollardan yapılabilmektedir. Bu yöntemlerden en çok kullanılan NO'in son ürünlerinden olan nitriti ölçen Griess reaksiyonudur. Bu yöntemle NO' in yıkımı sonucunda oluşan nitrit (NO₂) kolorimetrik olarak ölçülmekte ve NO düzeyi indirekt olarak belirlenebilmektedir(6).

Kemilüminesans adı verilen bir yöntemle de NO düzeyi biyolojik sıvılarda ölçülebilmektedir. Ancak bu yöntemin uygulaması pahalı ve güçtür. Griess reaksiyonu yerine fluorospektrofotometre ile ölçüm yapılmasını öneren çalışma sonuçları da yayınlanmıştır(7,29).

Nitrit ölçümü için en yaygın olarak kullanılan Griess yönteminin temeli spektrofotometrik ölçüme dayanır. İki adımda diazolama reaksiyonu temel olan bu yöntemde öncelikle nitrit sülfanilamid ile reaksiyona girerek diazonyum iyonlarına dönüşür. Oluşan bu iyonlar daha sonra N-1-Naftil-etilendiamin'e bağlanarak kromoforik azot türevlerine dönüşür. Son olarakta uygun absorbansta genellikle 540/550 nm'de nitritin spektrofotometrik ölçümü yapılır. Bu yöntemin avantajı çok kolay olup sadece örneklere reaktifin eklenmesi yeterlidir.

6.8. Griess reaktifi, standartların hazırlanması ve çalışma:

Reaktif çalışma günü hazırlanarak taze olarak kullanıldı. Bir miktar deiyonize su içerisine %2,3 v/v fosforik asit katıldı üzerine % 0,1 N-1-Naftil-etilendiamin ve %1 Sülfanilamid olacak şekilde ilave edilerek tamamen eriyene kadar içerisinde karıştırıcı ile karıştırıldı, üzerine deiyonize su ilave edilerek 100 ml'ye tamamlandı.

Standart olarak önce stok solüsyonu hazırlandı; 100 ml. deiyonize su içerisine 0,69 gr. NaNO_2 0.1 M olacak şekilde hazırlandı daha sonra 10 ml. kültür medyumunu içeren steril deney tüpü içerisine 0,1 M konsantrasyondaki NaNO_2 solüsyonundan 100 μl . konularak 10^{-3} M konsantrasyon hazırlandı, bu şekilde diğer kültür medyumunu ile diğer dilüsyonlar da yapılarak 10^{-5} - 10^{-7} M konsantrasyonlarda NaNO_2 standartları hazırlandı.

Dondurulmuş olan numuneler oda ısısında eritilerek çalışma için hazırlandı, yine griess reaktifi ve standartlar çalışma günü taze olarak hazırlandı. 96'lık Elisa plate içine 50 μl . numune ve standartlardan konuldu üzerine 50 μl . Griess reaktifi konularak 10 dk. oda ısısında inkübe edildi. Elisa plate okuyucuda 540 nm. absorbansda okutularak çıkan sonuçlar standartların absorbansına orantısı yapılarak nmol/ml biriminden elde edilmiş oldu.

6.9. Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Reaktifler

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur(92).

Reaktif 1: 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde 10 mM o-Dianisidine ve 45 AM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözülerek hazırlandı.

Reaktif 2: 7,5 mM hirojen peroksit 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde karıştırılarak hazırlanır.

Prensip

Fe^{2+} -o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenerek düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir (97).

6.10. Total Oksidant Seviye (TOS)

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir.

Reaktifler

Reaktif 1: 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisine 25 mM H_2SO_4 çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında gliserol çözülüp daha sonra total volümde 250 μM Xlenol orange çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Ana solüsyon içeriside önce 10 mM o-Dianisidine dihydrochloride çözülüp sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlanır.

Prensip

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyon oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xylenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (93).

6.11. Plazma Protein Ölçümü

Reaktif: Sodyum potasyum tartrate (23,4 mM), Sodyum hydroxide (613 mM) Potassium iodide (6,6 mM), Copper sulfat (13,2 mM)

Prensip

Polipeptidler biüret reaktifi ile reaksiyona girebilen en az iki peptid bağı içerirler. Alkali ortamda iki değerlikli bakır iyonunun protein nitrojen ile kordineli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır.

6.12. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Total Oksidatif Stres (TOS) / Total Anatioksidan Kapasite (TAK) şeklinde bölünerek Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplandı (94).

7. Bulgular

Yapılan çalışmada şark çıbanı olduğu kesinleşen hastaların tedavi öncesi ve 1.doz, 2. doz, 3. doz, 4. doz ve 5. doz antimon tedavileri sonrasındaki TOS, TAK, Nitrit, Nitrat, OSİ(Oksidatif stres indeksi) ve arjinaz parametrelerinin nasıl korelasyon gösterdiğine bakıldı.

Tablo10: Hastalara uygulanan Antimon dozlarının zamana bağlı istatistiksel değişim grafiği

	Tedavi öncesi (Ort±ss) n=20	1.doz antimon tedavisi Ort±ss n=20	2.doz antimon tedavisi Ort±ss n=20	3.doz antimon tedavisi Ort±ss n=20	4.doz antimon tedavisi Ort±ss n=20	5.doz antimon tedavisi Ort±ss n=20	P
Totaloksidan seviye $\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ Eqv/L	10,85*±1,34	10,22±1,47	11,14±2,32	11,02±1,85	11,39*±1,8 ^a	10,13±1,59 ^a	p<0,05
Arjinaz U/grprotein	10,19± 8,94	7,24± 2,94	8,13 ±2,78	9,23± 4,24	11,26 ±3,09	8,15± 3,73	p<0,05
Nitrat $\mu\text{mol/L}$	25,35± 4,34	26,58 ±7,26	24,48 ±3,66	25,71± 7,60	23,03±4,70 ^Δ	27,09± 6,32 ^Δ	p>0,05
Nitrit $\mu\text{mol/L}$	8,63± 1,8	8,82± 2,36	8,84± 2,23	8,61± 2,64	8,31± 1,53	9,16± 2,41	p>0,05
Total antioksidan kapasite $\mu\text{mol/H}_2\text{O}_2$	1,56± 0,18	1,53 ± 0,22	1,60 ±0,20	1,56± 0,19	1,56± 0,18	1,60± 0,19	p>0,05
Oksidatif stres indeksi AU	7,07± 1,58	6,88± 1,78	7,16± 2,25	7,25± 2,04	7,43 ±1,92	6,46±1,63	p>0,05

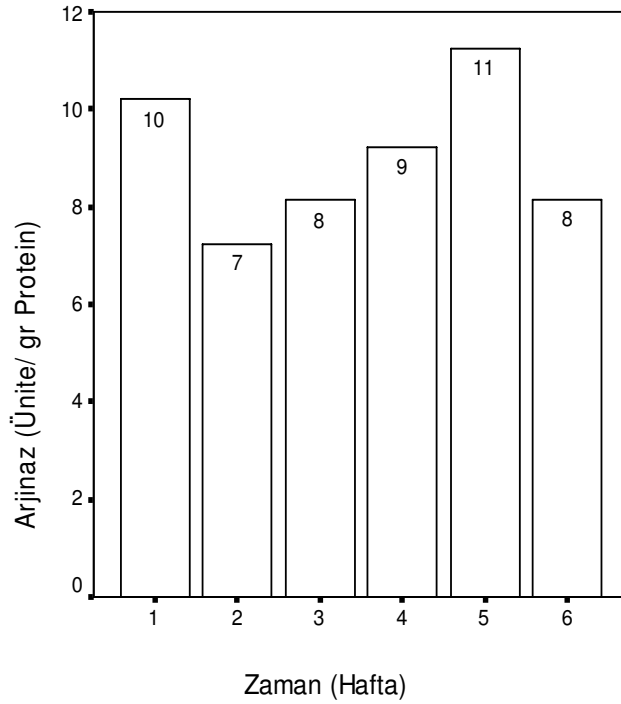
* Total oksidan seviye; 1. doz ve 4. doz tedavi arasındaki fark

^a Oksidan miktarı 4. doz ve 5. doz tedavi arasındaki fark

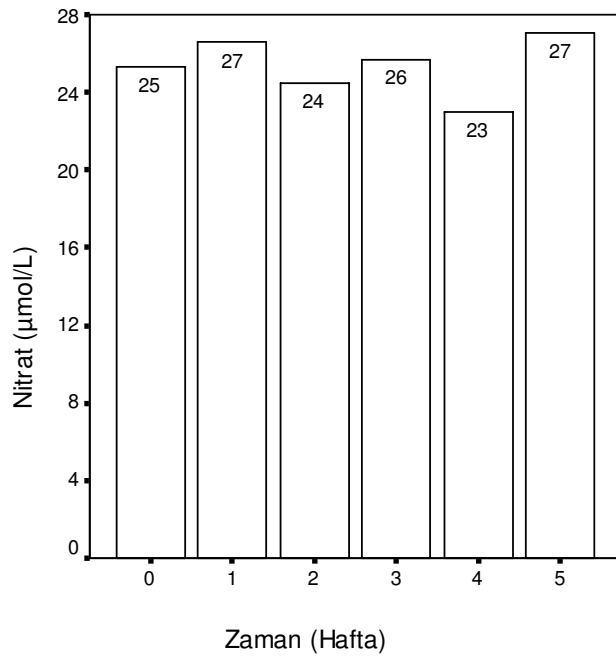
^Δ Nitrat seviyesinde hastaların 4. doz ve 5. doz tedavi arasındaki fark 3. doz ile 5.doz tedavi arasındaki fark

Yapılan çalışmada; şark çibani olduğu kesinleşen hastaların tedavi olmadan önceki kanı alınıp sırasıyla 1. doz tedavi, 2. doz tedavi, 3. doz tedavi, 4. doz tedavi ve 5. doz tedavileri gördükten sonraki kanları alındı. Tedavi süresince hastalara Antimon tedavisi yapıldı. Bu gruplar arasındaki TOS, TAK, Arjinaz, Nitrit, Nitrat ve oksidatif stres indeksi parametrelerine bakılarak korelasyonu karşılaştırıldı. Total oksidan seviyenin hastalarda tedavi süresince gittikçe arttığı görülmüştür (P<0,05). 5.doz tedaviden sonra ise total oksidan seviyenin azaldığı görülmektedir. Arjinaz enziminin ise; Antimon tedavisinden sonra 4.doz tedaviye kadar enzim seviyesinin arttığı görülmekte ve daha sonra azalış izlenmektedir. P<0,05 olup anlamlıdır. Nitrat

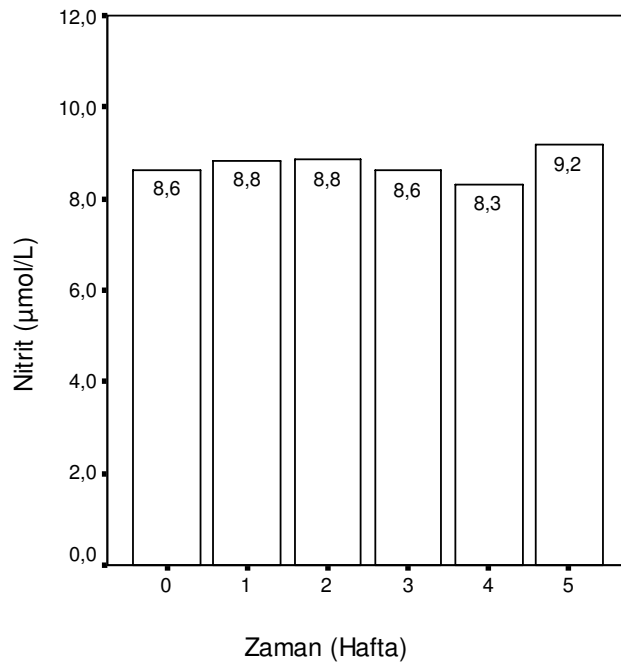
seviyesine bakıldığında hasta gruplarında istatistiksel olarak $P>0,05$ olup anlamsızdır. Nitrit seviyesinde ise; istatistiksel olarak $P>0,05$ olup anlamsızdır. Total anti oksidan kapasite ise; hastalarda anlamlı olmadığı ($P>0,05$) 1. doz tedavi gören hastalarda artış sonrasında azalma olmaktadır. Oksidatif stres indeksinde; hasta gruplarında anlamlı olmadığı saptanmıştır ($P>0,05$). Tedaviden sonra kandaki değeri azalmaktadır.



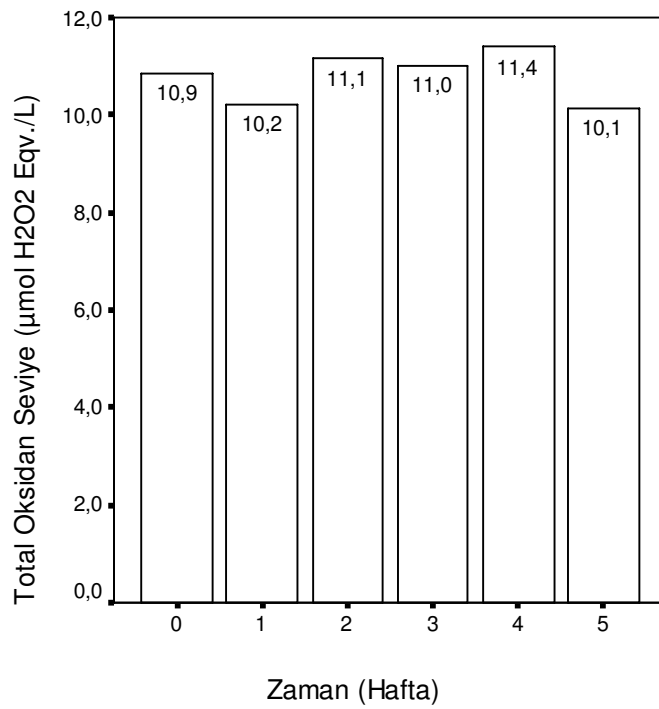
Şekil 13:Şark çıbanı hastalarında tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki arjinaz enziminin zamana bağlı değişim grafiği



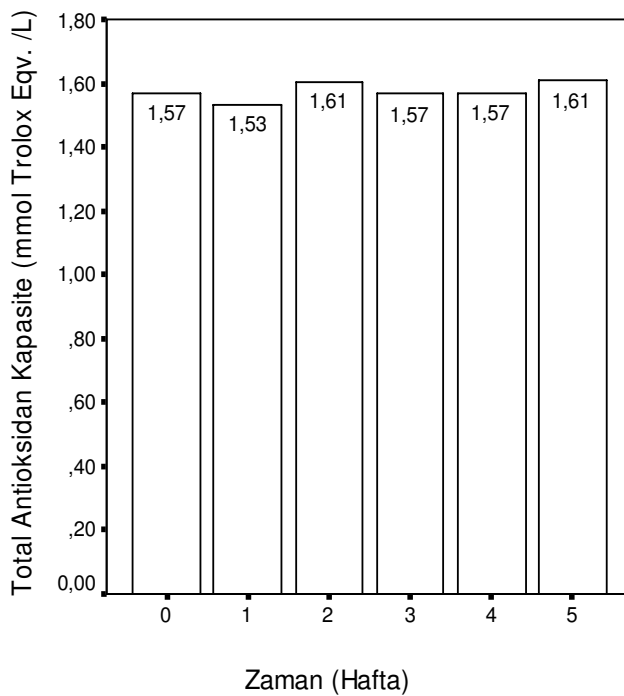
Şekil 14.Şark çibani hastalarında tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki Nitrat seviyesi değişim grafiği



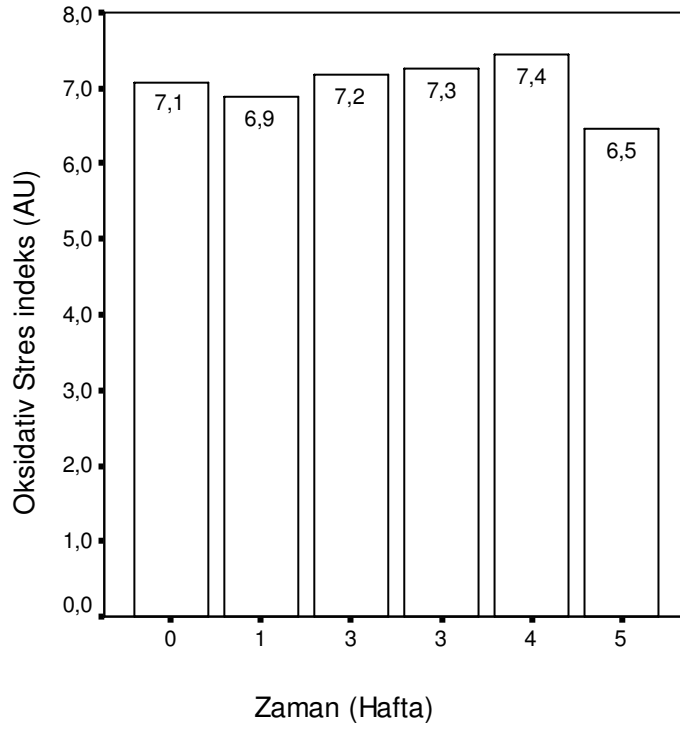
Şekil 15.Şark çibani hastalarında tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki Nitrit seviyesinin zamana bağlı değişim grafiği



Şekil 16: Şark çıbanı hastalarında tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki Total oksidan seviyesinin zamana bağlı değişim grafiği



Şekil.17. Şark çıbanı hastalarında tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki Total antioksidan seviyesi değişim grafiği



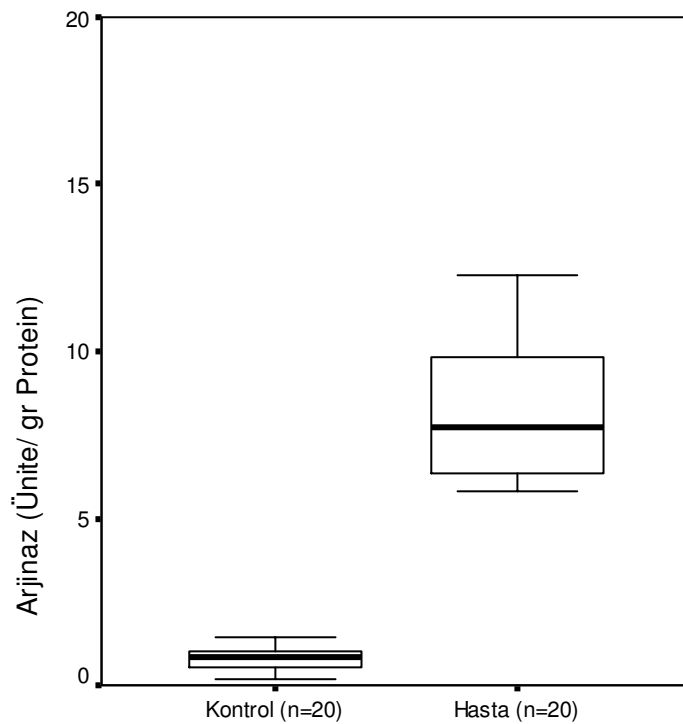
Şekil 18 Şark çıbanı hastalarında tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki Oksidatif stres indeksi seviyesi değişim grafiği

Tablo 11: Tedavi öncesi hasta grupları ile kontrol grupları arasındaki(o doz ve kontrol grubu) tos, tak, osi, arjinaz, nitrit, nitrat değişimi

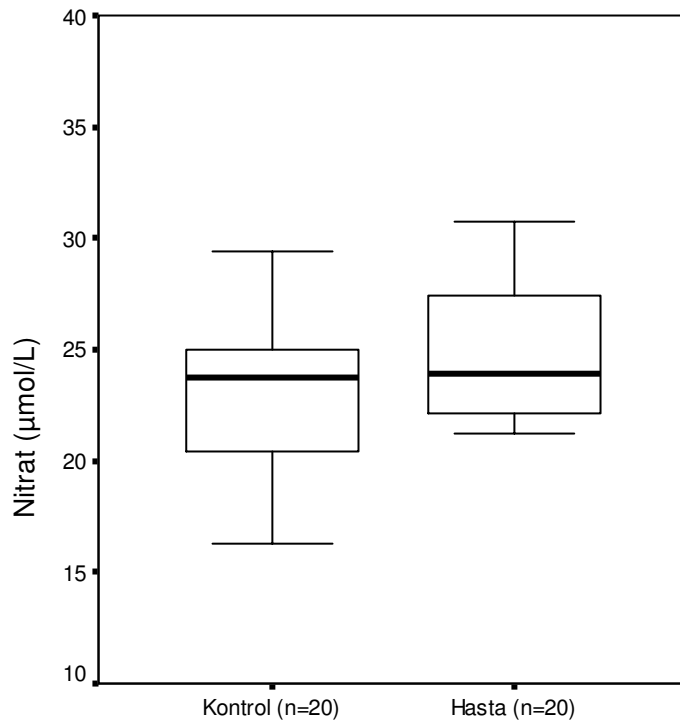
	Kontrol (n=20) ort±ss	Hasta (n=20) ort±ss	p
Total oksidan seviye($\mu\text{molH}_2\text{O}_2$ Eqv/L)	9,36±1,24	10,85±1,34	p<0,001
Arginaz(U/grprotein)	0,85±0,52	9,77±8,52	p<0,001
Nitrat($\mu\text{mol/L}$)	23,15±3,64	25,29±4,23	p>0,05
Nitrit($\mu\text{mol/L}$)	6,11±0,49	8,78±1,87	p<0,001
Total anti oksidan kapasite $\mu\text{mol/H}_2\text{O}_2$	1,52±0,16	1,56±0,18	p>0,05
Oksidatif stres indeksi(AU)	6,24±1,29	7,07±1,58	p>0,05

Tablo 11’de kontrol grupları ile şark çıbanlı hastaların antimon tedavisi almadan önceki grupları ile karşılaştırılması görülmektedir.

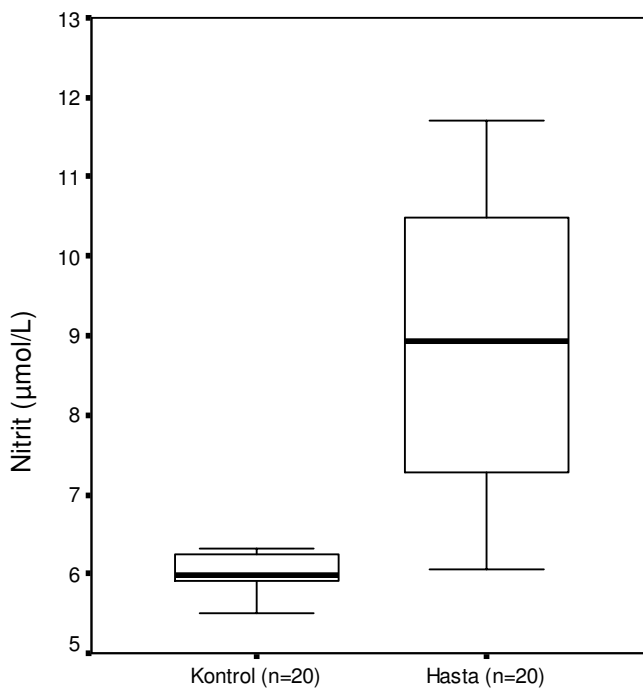
Yapılan istatistiksel analizde; total oksidan seviyenin hasta gruplarında arttığı ve $P < 0,001$ olup anlamlıdır. Arginaz enziminin ise şark çıbanı hastası olduğu deneysel yöntemlerle kesinleştiği; fakat tedavi görmeyen hastalarda bu enzim seviyesinin anlamlı olup $P < 0,001$ kontrol grubuna göre arttığı görülmektedir. Nitrat ve Nitrat seviyesi ise; hasta gruplarında anlamlı olmayıp $P > 0,05$ dir. Total anti oksidan kapasitenin, çok anlamlı olmadığı $P > 0,05$ ve az miktarda arttığı görülmektedir. Oksidatif stres indeksi anlamlı olmayıp $P > 0,05$ arttığı görülmektedir.



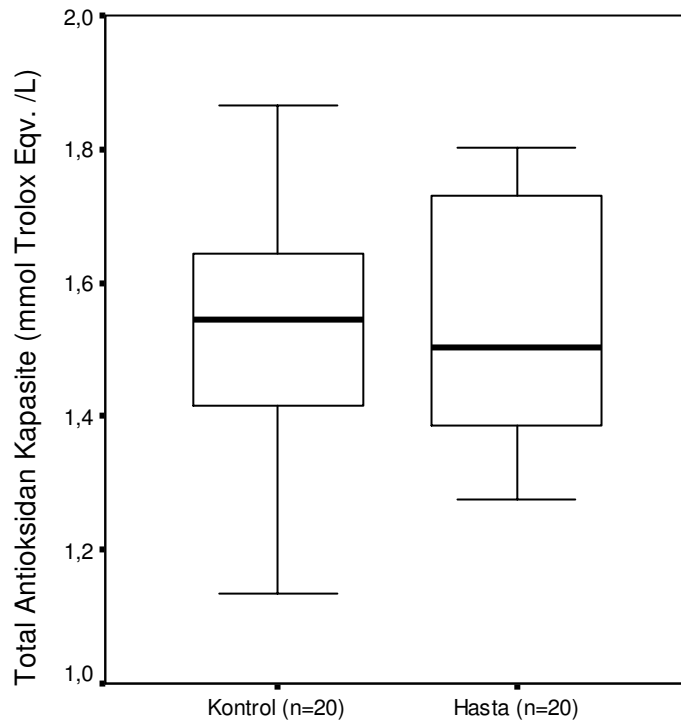
Şekil 19 : Tedavi öncesi hasta grupları ile kontrol grubu arasındaki arjinaz enzimi seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



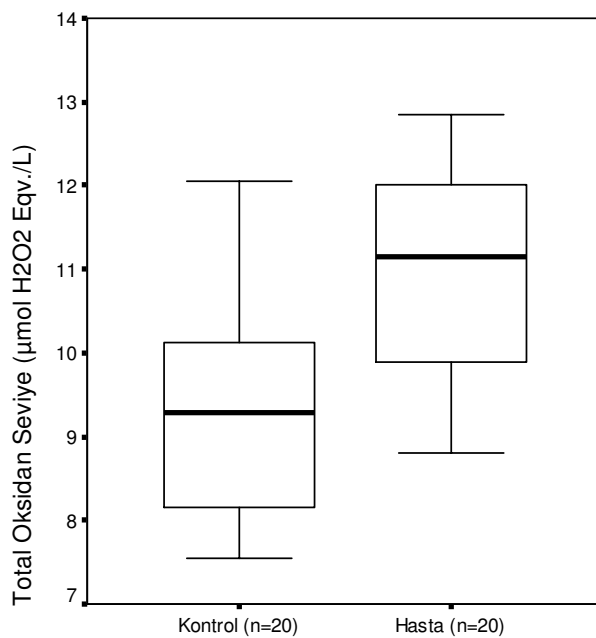
Şekil 20 : Tedavi öncesi hasta grupları ile kontrol grubu arasındaki Nitrat seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



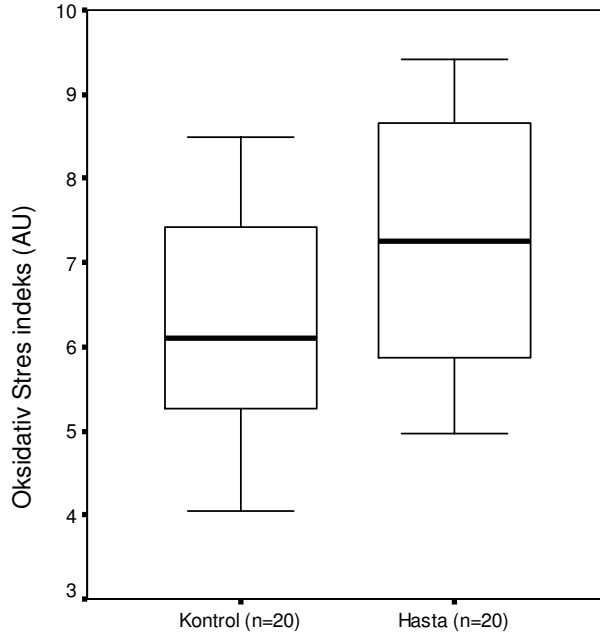
Şekil 21: Tedavi öncesi hasta grupları ile kontrol grubu arasındaki Nitrit seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



Şekil 22: *Tedavi öncesi hasta grupları ile kontrol grubu arasındaki Total antioksidan seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları*



Şekil 23: *Tedavi öncesi hasta grupları ile kontrol grubu arasındaki Total oksidan seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları*



Şekil 24: *Tedavi öncesi hasta grupları ile kontrol grubu arasındaki Oksidatif stres seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları*

Yapılan çalışmada; hastalığın seyri hakkında ve kaç doz tedavi alacaksa arginaz enzimine bakılarak tedavi uygulanabilir. Bazı hastalarda ilk 5 doz tedavi aldıktan sonra lezyon iyileşmeyebilir. Burada hastanın direkt serum arginazına bakılarak 2.kür1.doza tedaviyi tekrar almasına karar verilir. Arginaz enzimi karaciğerde bulunduğu için tedavi süresince enzimin karaciğer dokusunda artmasıyla birlikte doku harabiyeti artacaktır. Demek oluyor ki şark çıbanı paraziti dikkate alınması gereken önemli infeksiyonlardan biridir. Özellikle Güneydoğu Anadolu bölgesinde zaman kaybetmeden önlemi alınması gerekmektedir

8. TARTIŞMA

Dünyada 88 ülkede endemik olarak görülen ve yaklaşık 12 milyon kişiyi etkileyen deri layşmanyazisi (şark çıbanı), bölgemizde Güneydoğu Anadolu Projesi ile sulama alanlarının artması, bilinçsiz hayvancılığın ilerlemesi, antimon ilacının (*Glucantime*[®]) ithalinde yaşanan sıkıntılar ve hastaların tedavi edilememesi nedeniyle son zamanlarda çok hızlı bir artış göstermiştir. Sadece ilimiz Şanlıurfa bölgesinde tespit edilen yeni Şark çıbanı vaka sayısı son 5 yılda toplam 4000'i geçmiş, sadece 2004 yılının ilk dört ayında 943 vaka tespit edilmiştir. Yeni vakalarla birlikte eski vakalarında sayısı göz önüne alındığında, yöremizde on binlerce insanın özellikle yüzlerinde Şark çıbanının izini taşıyacağı anlaşılmaktadır(10,11,15).

Layşmanyazis'in oluşmasını sağlayan nedenler içerisinde enfekte kaynağın Phlebotomus'lar tarafından ısırılmaları, insanın rezervuar konak yakınında bulunması yanında, çevrenin iklim yapısının yani nem, hava hareketi, ısı ve ışık faktörlerinin de önemli olduğu bilinmektedir. Bütün bu faktörlerin her biri hastalığın oluşması için son derece gerekli olup, eşit öneme sahiptirler. Halen tedavide en etkili ajan olarak kullanılan antimon bileşiklerinin etki mekanizması ise henüz tam olarak bilinmemektedir.

İnsanlar tatarcıklar tarafından ısırıldıklarında promastigotlar savunma hücreleri olan makrofajlar tarafından fagosite edilir. Enfeksiyonun yayılımı ya da enfeksiyonun kontrolü bundan sonra makrofajların durumuna bağlı olarak gelişir. İyileşme; enfekte makrofajların yeterli miktarda uyarılması ve parazitin replikasyonunun inhibisyonu ya da öldürülmesi ile mümkün olur.

İn-vivo ve in-vitro yapılan çalışmalarda da *Leishmania* parazitinin makrofajlar içerisinde yaşayabilmek için konakçı savunma sistemini çeşitli şekillerde inhibe ettiği hatta kendi yaşamına uygun hale getirdiği, örneğin: Makrofajlardaki Arjinaz – Ornitin – iNOS – NO yolunun parazit ile enfekte edildikten sonra NO sentezi yönünde inhibe edilerek parazitin büyümesi için esnsiyel Ornitin ve metabolitleri lehine aktive olduğu gösterilmiştir(9,15,16).

Şark çıbanı hastalarında tedavi öncesi yapılan bir çalışmada antioksidan enzimlerden katalaz ve Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinde azalma ve

süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde artma tespit edilmiş, enzim aktivitelerin H_2O_2 'in artışı yönündeki bu değişiklikleri konakçı defans mekanizmasının bir gereği olarak yorumlanmıştır. Çünkü, SOD süperoksit radikalini H_2O_2 'e dönüştürürken katalaz ve GSH-Px oluşan H_2O_2 'i serbest oksijen ve suya dönüştüren enzimlerdir. SOD enzim aktivitelerinin yüksek GSH-Px ve katalaz aktivitelerinin düşük olması üretilen H_2O_2 'in yıkılamaması dolayısı ile artması anlamına gelmektedir. H_2O_2 'in etkili bir sitotoksik molekül olduğu, özellikle intrasellüler mikroorganizmaları öldürmede etkili bir ajan olduğu bilinmektedir. Antimon tedavisi verilen Leishmania enfeksiyonunda pro-enflamatuar sitokinler ile birlikte H_2O_2 'in seviyelerindeki artış, antimonun enfekte makrofajlarda proenflamatuar sitokinleri aktive ettiği, pro-enflamatuar sitokinlerinde antioksidan enzim aktivitelerinde H_2O_2 'i artırıcı yönde bir regülasyona ve böylece mikroorganizmaların ölümüne neden olduğu düşünülmektedir(13)

Yapılan çalışmalar ışığında layşmanyazis hastalarında oksidan seviyenin artış gösterdiği ve antioksidan seviyenin ise düşüş gösterdiği bilinmekte ve dolayısıyla oksidan/antioksidan dengenin bozulduğu bilinmektedir(65,92).

Oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar lehine artması “oksidatif stres” olarak tanımlanır. ROS(reaktif oksijen radikalleri), oldukça güçlü prooksidanlardır. Layşmanyazis enfeksiyonunda ROS iki ayrı mekanizma ile oluşmaktadır. Bunlardan birincisi intrasellüler parazit ile hemoglobinin yıkımı sonucu ROS oluşumudur. Burada demir globinden ayrıldıktan sonra Fe^{+3} formuna okside olarak elektron açığa çıkarılırlar, açığa çıkan bu elektronlar oksijen molekülleri reaksiyona girerek ROS oluştururlar. İkinci mekanizma ise konakçı defans mekanizması gereği immun cevabın aktivasyonu sonucunda fagositler üzerinde respiratory(büyük patlama) ve ROS'u artıran TNF- α ve INF- γ sitokinleri oluşturmasıdır.(32,65)

Çalışmalar, layşmanyazis hastalarında ROS, bir taraftan sitotoksik etki ile parazitleri öldürürken diğer taraftanda hastaların vücut hücreleri, protein, lipid ve DNA'larında hasara neden olabilmektedir. Bununla birlikte RNI, hastalarda nitrit ve nitrat seviyesinin sağlıklı insanlara oranla daha yüksek çıktığı yapılan çalışmalar arasındadır. Reaktif nitrojen radikalleri vücuttan parazitin atılmasında rol oynadığı bilinmektedir; fakat bizim çalışmamızda layşmanyazis hastalarında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını saptadık.

Serbest radikallerin uyardığı oksidatif strese karşı antioksidan defans sistemi bir bütün olarak mücadele eder. Tüm vücuttaki antioksidan durumu değerlendirmek için total antioksidan kapasite ölçümleri yapılmaktadır. Total antioksidan kapasiteye majör katkıyı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Albumin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan durumun %85'inden fazlasını oluşturmaktadır.(35,42). Bizim çalışmamızda daha önceki çalışılmış litaretürleri desteklemekte ve layşmanyazis hastalarında antioksidan seviyesini düşük bulmaktayız.

Arginaz, üreolitik organizmalardan memeli karaciğer hücrelerinde arginaz enziminin yüksek aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar insan serumundaki Arginaz aktivitesi, eritrosittekinden 200 kat daha düşük bulunmuştur(20). Karaciğer hücrelerinde yüksek arginaz aktivitesi aritmetik olarak etkili olabilmektedir. Bu nedenle fitohemoglobinin (PHA) ile uyruşmuş lenfositlerde, protein, DNA ve RNA sentezleri arginaz tarafından inhibe edilebilir(15,16,17). Çalışmamızda hasta insanlarda tedaviden önce arjinaz enzim seviyesinin arttığı görülmektedir. Bu enzimin fazlalığı durumunda en fazla karaciğerde bulunduğu için karaciğerde doku hasarına neden olacağını ve hücre büyümesini inhibe etme yeteneğine kavuşacağını düşünmekteyiz. Hücre kültüründe yüksek arjinaz aktivitesi antimitotik olarak etkili olabilmektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarda NO'in paraziter hastalıklarda arginaz ile ters orantılı olduğu görülmüştür; fakat bizim çalışmamızda şark çıbanı parazitini taşıyan hastalarda böyle bir durum görülmediğini bulduk. Tedaviden sonraki arginaz enzim seviyesinin azaldığı, istatistiksel olarak nitrit ve nitrat seviyelerinin anlamlı olmadığını gördük. Bizim çalışmamızda layşmanyalı hastaların tedavi öncesindeki kanları alındı ve TAK, TOS, parametrelerine bakıldı. Hastaların Antimon tedavisinden önce oksidan miktarının arttığı, antioksidan miktarının azaldığını tespit ettik. Bu durum savunma sisteminin azaldığını göstermektedir. Bu nedenle şark çıbanı hastalarında ağrı, yoğunluk, GIS hastalıklar görülen rahatsızlıklar arasındadır. Hastalar Antimon tedavisini aldıktan sonra TOS, TAK, seviyelerine bakıldı. Hastalarda oksidan seviyenin azaldığı, anti oksidan seviyenin arttığı görüldü. Hastalarda Nitrit ve Nitrat seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gördük.

Kutanöz Leishmaniasis; Leishmania genusundan *Leishmania Majörün* neden olduğu deri ve mukozayı tutan, kronik granulomatöz intrasellüler parazitik bir enfeksiyondur. Tedavide yaygın olarak kullanılan antimonial bileşiklerin etki

mekanizması ise tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızın, toksik, pahalı ve ithal bir ilaç olan antimonun etki mekanizmasının kısmen gösterilmesi ile benzer etki mekanizmasına sahip, yan etkisi daha az olan, daha ucuz ve temin edilmesi daha kolay olan yeni tedavi yöntemlerinin araştırılabilmesi için referans olabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- 1-Berman JD, Human leishmaniosis: clinical diagnosis and chemotherapeutic developments in the last 10 years, *Clin Infec Dis*, 1997; 24, 684-703.
- 2-Berman JD, Waddell D, Hanson BD, Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1985; 27, 916
- 3-Bryceson ADM: Leishmaniosis. *Manson's tropical Diseases* (Eds Cook GC) ed 20 Saunders, 1996, 1213-1245.
- 4- Greena SJ, Nacy CA, Meltzer MS, Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages, a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens, *J Leuck Bio*, 1991; 50, 93-103.
- 5-Heart D, Langridge A, Barlow D, Sutton B: Molecular strategies for antileishmanial drug design. *Nato ASI on Layşmanyazis: the first centenary (1885-1985) the current status and new strategies for control. Greece-Zakinthos*, 1987; 693-697
- 6- Kikuth W, Schmith H: Contribution to the progress of antimony therapy of kala azar, *Chinese Med J* 1937; 52, 425
- 7-Lewis DJ, Ward RD: Transmission and vektors. *The Layşmanyazis in Biology and Medicine* (Eds, Peters W, Killick-Kendrick R). Academic Pres, 1987; 235-262
- 8- Memişoğlu HR, Kotoğyan A, Acar MA, Özpoyraz M: Layşmanyazis. *Dermatoloji*. (Eds Tüzün Y, Kotoğyan A, Aydemir EH, Baransü O). İstanbul, 1994
- 9- Seaman J, Mercer J, Phill M, Sondorp HE, Herwalt BL, Epidemic visceral leishmaniosis in Southern Sudan: Treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources, *Ann Intern Med*, 1996; 124, 664-672
- 10- Sağlık Bakanlığı Şanlıurfa İl Sağlık Hizmetleri İl İcmali 2000-2004.92
- 11- Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü çalışma yılığı 2002, Ankara, 2003; 115-116
- 12- Silva TMC, Barral A, Pompeu MML, et. al., In situ inflammatory-immune response in human tegumentary layşmanyazis: morphologic evidence for a pathogenic role of TNF- α , *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1998; 93:2, 49-50.

- 13-Turgay N, T lenfositlerinin Leishmania antijenleri ile invitro eğitimi üzerine çalışmalar, Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 1998
- 14- Unat EK, Yücel A, Altas K, Samastı M. “Unat’ın Tıp Parazitolojisi” İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. 5. Baskı İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. 1995, 564-590
- 15- Lehninger AL, Nelson AL, Cox MM. Principles of Biochemistry. New York. Worth Publ, 1993. 517-519
- 16-Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum. Comparative properties of arginases. Comp. Biochem Physiol 1996; 114:107-132
- 17-Geyer, J.W., Dabich, D.: Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. Anal. Biochem. 1971; 39: 412-417
- 18-Xu Q, Baker BS, Tata JR. Developmental and hormonal regulation of the xenopus liver type arginase gene. Eur J Biochem 1993; 211:891-898
- 19-Straus B, Cepebk I, Festa G. Arginase a new marker of mammary carcinoma. Clin Chim Acta 1992; 210:5-12
- 20-Borman, A., Wood, T. R., Black, H.C., Anderson, E.G., Osterling, M.J., Womack, M and Rose, W.C. (1946) J. Biol. Chem. 166, 585-594
- 21-Kossel, A. and Gross, R.E. (1924) Z. Physiol. Chem. 135, 167-174
- 22-Scull, C.W. and Rose, W.C. (1930) J. Biol. Chem. 89, 109-123
- 23-Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. J. Mayo Clin. Proc. 1988; 63 (3): 381 – 8.
- 24-Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. J. The Lancet June 1984; 23(3): 1396–7.
- 25-Hochstein P, Atallah AS. The nature of oxidant and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. J. Mut. Res. 1988; 202(5): 363–75.
- 26-Tappel Al. Lipid Peroxidation damage to cell components. J. Fed. Proc. 1973; 32(4): 1870 – 4.
- 27-Cros CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. J. Annals. int. Med. 1987; 107(6): 526 – 45.
- 28-Brent JA, Rumack HH. Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury I. Free Radical Chemistry. J. Clinical Toxicology. 1993; 49(4): 481– 93.

- 29-Dizdaroğlu M. Mechanisms of Oxidative DNA Damage; Lesion and Their Measurement. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 1999; 302: 67–87.
- 30-Dizdaroğlu M. Chemical Determination of Free Radical-Induced Damage to DNA. *J Free Radical Biology & Medicine*. 1993; 61(3): 225–242.
- 31-Wetberg AB, Weitzman SA, Clark EP. Effects on antioxidants on antioxidant induce: sister chromatid Exchange formation. *J. Clin. Invest.* 1985; 75(3):35 – 7.
- 32-Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *J. Biochem.* 1984; 222: 1–15.
- 33-Tappel AL, Dillard JC. In vivo lipid peroxidation measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *J. Federation proceedings* 1981; 40(3):174– 8.
- 34-Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *J. Clin Chem.* 1995; 42(6):18–19.
- 35-Moncada S, Palmer RMJ, Higs EA. Nitric oxide. Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *J. Pharmacol Review* 1991; 43(29): 109–37.
- 36-Lancaster J. Nitric oxide, principles and actions. Copyright by Academic Press. Inc. California/USA. 1990.
- 37-Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *J. Biochem.* 1994; 298(12):249–58.
- 38-Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(7):123–5.
- 39-Myatt L, Rosenfield RB, Eis ALW. Nitrotyrosine residues in placenta: Evidence of peroxynitrite formation and action. *J. Hypertension* 1996; 28(21): 488-93.
- 40-Halliwell B. Oxygen is poisonous: The nature and medical importance of oxygen radicals. *J. Med Lab Sci.* 1984; 41(3):157-62.
- 41-Canbaş A. Gıda Bilimi ve Teknolojisi. Ziraat Fakültesi Yayını No: 78, Ç. Ü. Adana. 1983.
- 42-Sies H, De Groot H. Role of Reactive Oxygen Species in Toxicity. *J. Toxicology.* 1992; 64 (65): 547–51.
- 43-Halliwell B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *J. The American Journal of Medicine.* 1991; 91(3C): 14–22.
- 44-Mead J. Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. Free radical in molecular biology. *J. Aging and disease.* 1984; 65(24): 53–66.

- 45-Notarjan D. Oxidants and signal transduction in vasler endothelium. *J. Clin. Med.* 1994; 125(35): 26–37.
- 46-Logani MK, Davies RE. Lipid Oxidation: Biolojic effects and antioxidants *J. Lipids.* 1985; 15(5): 6-12.
- 47-Reubset FAG, Veerkamp JH, Tirjbels JMF, Monnens LA. Total and peroxisomal oxidation of various saturated and unsaturated fatty acids in rat liver, heart. *J. M. Quadri ceps. Lipids.* 1992; 24(7):11–16.
- 48-Aricioğlu A. Serbest oksijen radikalleri ve hücre hasarı. 1994; 2(3): 139–242.
- 49-Stevenson MA, Pollock SS, Coleman CN, Calderwood SK. *J. Cancer Res.* 1994; 54(6): 12–15.
- 50-Ball S, Weindruch R, Walford L. Antioxidants and immun response. *J. Free radicals, Aging and Dejenervative Diseases.* 1986; 427–456.
- 51-Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoids. *J. Nutr.* 1989;119(12): 109–111.
- 52-Niki E. Antioxidants in retation to lipid peroxidation chemistry and physics of lipids. 1987; 44(6): 227–53.
- 53-Braugher M, Chose L, Pregenter F. Oxidation of ferraus iron during peroxidation of lipid substrates. *J. Biochemica and Biohysica Acta.* 1987; 921(21): 457–64.
- 54-Ripine JE, Bast A, Lankharst. Lipids I, and The Oxidative Strees Study Graup: Oxidative strees in chronic obstructive pulmorary disease. *J. Respir Crit Care Med.* 1997; 156(26): 341–347.
- 55-Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *J. Biochem* 1992; 286(35): 607–11.
- 56-Mccord JM. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26(4): 351–7.
- 57-Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1995; 5:1–3.
- 58-Halliwell B, Dizdaroglu M. Free radicals and the oxidant/antioxidant balance *J. Free Radical Res.* 1992; 16: 75–87.
- 59-Dizdaroglu M. *DNA and Free Radicals.* Ellis Horwood, Chichester 1993; 19-39.
- 60-Halliwell B, Aruoma OI. *FEBS Lett.* 1991; 281: 9–19.
- 61-Horwood E. Epe B. *DNA and Free Radicals.* Chichester 1993; 41-65.

- 62-Van den Akker E, Lutgerink JT, Laqueur MVM, Joenje H. Retel J. *Mutat. Res.* 1994; 309: 45–52.
- 63-Steenken S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e^- and OH adducts. *J. Chem. Rev.* 1989; 89(24):503–520.
- 64-Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *J. Mutat. Res.* 1992; 275(35): 331–342.
- 65-Aruoma OI, Halliwell B. DNA and Free Radicals: Techniques Mechanisms and Applications. OICA International 1998; 3–26.
- 66-Totter JR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980; 77: 1763–7.
- 67-Seven A, İnci F, Civelek S, Burçak G, İnci E, Korkut N. Larenks Kanserli Olgularda Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Statü Göstergelerinin Dokuda İncelenmesi. *Türk ORL Arşivi* 1998; 36: 33–6.
- 68-Ceballos L, Triver JM, Nicole A. Age corralated modifications of cupper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activies in human erythrocytes. *J. Clin. Chem.* 1992; 36(1) : 66–70.
- 69-Smith EL, Hill RL, Lehmal R. *Principle of biochemistry.* 7th cd- McBraw Hill, inc. USA. 1983; 382 – 383.
- 70-Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harpers biochemistry.* 2nd edition. Typo. 1991.
- 71-Anderson ME, Meister A. Glutathione moesters. *J. Anal. Biochem.* 1989;183: 16-20.
- 72-Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoids. *J. Nutr.* 1989; 119(6):109-11.
- 73-Berger SJ, Gosky D, Zberowska E. Sensitive enzymatic cycling in diabetes. *J. Diabetes* 1991; 46(4): 405 – 12.
- 74-Burton G, Traber M. Vitamin E : antioxidant activity biokinetics and bioavailability. *J. Annu. Rev. Nutr.* 1990; J. 10: 357–82.
- Pabo'n A, Carmona J, Burgos LC, Blair S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *J. Clinical Biochemistry* 2003; 36(5): 71–78
- .75-Ignarro LJ. Buga GM.Wood KS.ByrnsRE. Chaudhuri G. Endotelhium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.*Proc Natl AcadSci USA*1987;84:9265-9

- 76-Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-6
- 77-Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol (USA)* 1993;52(2):171-8
- 78-Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994;120:227-37
- 79-Star RA. Nitric oxide. *Am J Med Sci (USA)*. 1993;306(5):348-58
- 80-Moncado S. The L-Arginine: Nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992;145(3):201-27
- 81-Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298:249-58
- 82-Bachman S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localization and function. *Am J Kid Dis* 1994;24(1):112-29
- 83-Snyder SH. Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. *Science* 1992;257:494-6
- 84-Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 1992;32:297-311
- 85-Calver A, Collier J, Moncada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J Hypertens* 1992;10:1025-31
- 86-Radomski MW, Palmer RMS, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987;2:1057-8
- 87-Yukimura T, Yamashita Y, Miura K, Okumura M, Yamanaka S, Yamamoto K. Renal effects of the nitric oxide synthase inhibitor; L-NG-nitroarginine, in dogs. *Am J Hypertens* 1992;5:484-7
- 88-Paakari I, Lindsberg P. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med (England)* 1995;27(3):369-77
- 89-Gartwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol (USA)* 1995;57:683-706
- 90-Green SJ, Meltezer MS, Hibbs JB Jr, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular leishmania major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 1990;144:278-83

- 91-Maguire PA, Sherman IW. Phospholipid composition, cholesterol content and cholesterol exchange in Plasmodium falciparum infected red cells. *J. Mol Biochem Parasitol* 1990; 38(8): 105-112.
- 92- Erel, O., 2003. A novel Automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry* 37(2004) 112-119.
- 93-Erel, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. clinical Biochemistry* 2005;47(5):119-29
- 94-Harma M, Koçyiğit A, Erel O. Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *J. Mutation Research*. 2005;583:49-54