

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

FASCIOLA HEPATICA İLE ENFEKTE KOYUNLARIN KAN VE
KARACİĞER DOKULARINDA ARGİNAZ, NİTRİK OKSİT, BAZI
ANTIOKSİDANT ENZİMLER VE LİPİD PEROKSİDASYON
DÜZEYLERİ İLE KARACİĞER ARGİNAZ ENZİMİNİN
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

DOKTORA TEZİ

Fulya BENZER

108178

F.Ü.VETERİNER FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**T.C. YÖKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

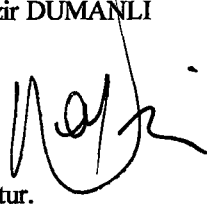
DANIŞMAN
Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN

ELAZIĞ

26.12.2001

ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V. Prof.Dr. Nazir DUMANLI



Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç.Dr. Necmi ÖZDEMİR Anabilim Dalı Başkanı



Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN



Doç.Dr. Necmi ÖZDEMİR



Doç. Dr. Tevhide SEL



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kısaltmalar	V
Tablo ve Şekil Listesi	VI-VIII
1. ÖNSÖZ	IX-X
2. GİRİŞ	1
2.1. Fasciola hepatica	1
2.1.1. Etiyoloji	1
2.1.2. Morfoloji.....	1
2.1.3. Sonkonakları	1
2.1.4. Arakonakları	1
2.1.5. Yerleştiği Yer	1
2.1.6. Gelişmesi.....	1-2
2.1.7. Patogenesis.....	2-3
2.1.8. Perakut Fasciolasis.....	4
2.1.9. Akut Fasciolasis.....	4
2.1.10. Kronik Fasciolasis.....	4
2.1.11. Fasciolasis ve Bakteriyel Enfeksiyonlar.....	4-5
2.2. Sirozun Tanımı ve Oluşumu	5
2.2.1. Sirozun Sebepleri.....	5
2.2.2. Sebeplerine Göre Sirozun Sınıflandırılması.....	5-6
2.3. Arginaz Enzimi ve Özellikleri	6-9
2.4. Arginaz ile Nitrik Oksit İlişkisi	9
2.5. Nitrik Oksit	9-10
2.5.1. Nitrik Oksit Sentezi.....	11-12
2.5.2. Nitrik Oksit Sentazın İzoenzimleri.....	13-14
2.5.3. Nitrik Oksit Sentazın İnhibitörleri.....	15
2.5.4. Nitrik Oksit'in Moleküler Hedefleri.....	15-16
2.5.5. Nitrik Oksit'in Fizyolojik Rollerini.....	16-19
2.6. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri	19-20
2.6.1. Süperoksid Radikali.....	20-22
2.6.2. Hidrojen Peroksid.....	22-23

2.6.3. Hidroksil Radikali.....	23-24
2.6.4. Singlet Oksijen.....	24
2.7. Serbest Radikallerin Etkileri.....	26
2.7.1. Membran Lipidlerine Etkileri.....	26-27
2.7.2. Proteinlere Etkileri.....	28
2.7.3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri.....	28
2.7.4. Karbonhidratlara Etkileri.....	28
2.8. Antioksidant Savunma Sistemleri (Doğal, Eksojen, Gıda).....	29-30
2.9. Antioksidant Etki Tipleri.....	30
2.9.1. Enzimatik Antioksidantlar.....	30
2.9.1.1. Glutasyon Peroksidaz.....	30-32
2.9.1.2. Katalaz.....	32-33
3. MATERYAL ve METOT.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Hayvan Materyalleri.....	34
3.1.1.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması.....	34-35
3.1.1.2. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması.....	35-36
3.2. Metotlar.....	37
3.2.1. Arginaz Aktivitesinin ölçülmesi.....	37-42
3.2.2. Total Nitrit Ölçüm Yöntemi.....	42-46
3.2.3. Plazmada Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Tayini.....	46-48
3.2.4. Dokuda Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Tayini.....	49-50
3.2.5. GSH-Px Aktivitesinin Tayini.....	51-53
3.2.6. Katalaz Aktivitesinin Tayini.....	53-54
3.2.7. Biyolojik Sıvılarda Protein Tayini.....	55-56
3.2.8. Hemoglobin Tayini.....	57
3.3. İstatistiksel Değerlendirme.....	58
4. BULGULAR.....	59
4.1. Preinkübasyon Isısının Belirlenmesi.....	59-60
4.2. Preinkübasyon Zamanının Belirlenmesi.....	60-61
4.3. İnkübasyon Zamanının Belirlenmesi.....	62
4.4. PH'nın Belirlenmesi.....	62-63

4.5. $MnCl_2$ Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	64
4.6. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	65-66
5. TARTIŞMA.....	74-89
6. ÖZET.....	90-91
7. SUMMARY.....	92-93
8. KAYNAKLAR.....	94-108
9. ÖZGEÇMİŞ.....	109
10. TEŞEKKÜR.....	110



KISALTMALAR

NO[•]	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
eNOS	Konstitutiv Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
L-Arg	L-Arginin
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	Flavin Mono Nükleotid
BH₄	Tetrahidrobiopterin
eGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
CaM	Kalmodulin
ATP	Adenozin Trifosfat
R[•]	Lipid Radikali
RO[•]	Alkoksil Radikali
ROO[•]	Peroksil Radikali
t-BOOH	t-Bütil Hidroperoksit
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
NO₃⁻	Nitrat
NO₂⁻	Nitrit
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
e⁻	Elektron
ONOO⁻	Peroksinitrit
OH⁻	Hidroksil İyonu
•OH	Hidroksil Radikali
GSH	Redükte Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
¹O₂	Singlet Oksijen

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: Fasciola hepaticanın Yaşam Siklusu.....	3
Şekil 2: Makrofajlarda, Arginaz ve Nitrik Oksit Sentaz Tarafından Argininin Ortaklaşa Yıkımı.....	9
Şekil 3: L-arginin- Nitrik Oksit Yolu.....	11
Şekil 4: NOS ve NO'in İndüksiyonunu Etkileyen Faktörler.....	14
Şekil 5: NOS'ın Aktive Edilmesi ve NO Sentezi.....	17
Şekil 6: Beyin Dokusunda Arginin-NO Yolu.....	18
Şekil 7: Makrofaj Kaynaklı NO'in Parazit ve Tümör Hücre Üzerine Etkisi.....	19
Şekil 8: Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidant Enzimler.....	25
Şekil 9: Çok Doymamış Yağ Asitlerinin Peroksidasyonu.....	27
Şekil 10: Üre Kalibrasyon Eğrisi.....	37
Şekil 11: Nitrit Kalibrasyon Eğrisi.....	46
Şekil 12: Plazma Lipid Peroksidasyonu Standart Eğrisi.....	48
Şekil 13: Doku Lipid Peroksidasyonu Standart Eğrisi.....	50
Şekil 14: Protein Standart Eğrisi.....	56
Şekil 15: Sağlıklı Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi.....	59
Şekil 16: Fasciola hepaticalı Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi.....	60
Şekil 17: Farklı Isılarda Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Sağlıklı Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesindeki Değişimler.....	61
Şekil 18: Farklı Isılarda Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Fasciola hepaticalı Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesindeki Değişimler.....	61
Şekil 19: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.....	62
Şekil 20: Sağlıklı Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya Göre Gösterdiği Değişiklikler.....	63
Şekil 21: Fasciolasisli Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya Göre Gösterdiği Değişiklikler.....	63

Şekil 22: Sağlıklı ve Fasciola hepaticalı Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.....	64
Şekil 23: Sağlıklı ve Fasciola hepaticalı Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin L-arginin Derişimine Bağlı Olarak Değişimi.....	65
Şekil 24: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyun Karaciğer Arginazının L-arginine Olan Km'inin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Saptanması.....	66
Şekil 25: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Plazma Total Nitrit Düzeylerindeki Değişimler.....	69
Şekil 26: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Karaciğer Total Nitrit Düzeylerindeki Değişimler.....	69
Şekil 27: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Plazma Malondialdehid Düzeylerindeki Değişimler.....	70
Şekil 28: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Karaciğer Malondialdehid Düzeylerindeki Değişimler.....	70
Şekil 29: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Eritrosit GSH-Px Aktivite Düzeylerindeki Değişimler.....	71
Şekil 30: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Karaciğer GSH-Px Aktivite Düzeylerindeki Değişimler.....	71
Şekil 31: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Eritrosit Arginaz Aktivite Düzeylerindeki Değişimler.....	72
Şekil 32: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Karaciğer Arginaz Aktivite Düzeylerindeki Değişimler.....	72
Şekil 33: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Eritrosit Katalaz Aktivite Düzeylerindeki Değişimler.....	73
Şekil 34: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Karaciğer Katalaz Aktivite Düzeylerindeki Değişimler.....	73
Tablo 1: NO ile İlişkili Nitrojenin Okside Metabolitleri.....	10
Tablo 2: cNOS ve iNOS Arasındaki Farklılık ve Benzerlikler.....	14
Tablo 3: Sağlıklı ve Fasciola hepatica ile Enfekte Koyunların Plazmalarında; Total Nitrit ve Malondialdehit, Eritrositlerinde; Katalaz, Glutatyon Peroksidaz ve Arginaz Aktivite Düzeyleri.....	67

Tablo 4: Sağlıklı ve <i>Fasciola hepatica</i> ile Enfekte Koyunların Karaciğer Dokusunda Total Nitrit, Malondialdehit, Katalaz, Glutasyon Peroksidaz ve Arginaz Aktivite Düzeyleri.....	68
--	----



1. ÖNSÖZ

Yaşam fonksiyonlarının yerine getirilmesinde karaciğerin fevkalade önemli bir yeri vardır. Karaciğer fonksiyonlarından herhangi birinin veya birkaçının aksaması hayvanın yaşamını imkansız hale getirir. En azından verimin azalmasına neden olur. Bütün hastalıklarda karaciğer doğrudan veya dolaylı olarak etkilenir ve zarar görür. Ancak karaciğerin rejenerasyon yeteneği çok yüksek olduğu için, hasar çok ileri boyutlara varmadığı sürece karaciğer ile ilgili fonksiyonel bozukluklar ortaya çıkmaz.

Fasciolasis paraziter bir karaciğer hastalığıdır. Fasciola hepatica ve Fasciola gigantica'nın sebep olduğu fasciolasiste, parazitin genç formları perihepatitis ve karaciğer doku harabiyetlerine, erişkin formları ise kronik cholangitis'e sebep olmaktadır.

Arginaz (E.C. 3.5.3.1.) Krebs-Henseleit üre döngüsünün son basamağını katalize eden bir enzim olup, arginini üre ve ornitine parçalamaktadır. Enzim en aktif şekilde karaciğerde bulunurken, karaciğer dışındaki dokularda daha düşük aktivite göstermektedir.

Nitrik oksit, nitrik oksit sentetaz enzimi tarafından L-argininden sentezlenen, diffuz ve serbest şekilde membranları geçebilen son derece kararsız bir molekül olup, in vivo ve in vitro olarak süratle nitrit ve nitrata dönüşür. Toxoplasma gondii, Leishmania major, Schistosoma mansoni, Cryptococcus neoformas, Trypanosoma cruzi ve Mycobacterium spp. gibi değişik mikroorganizmalara ve parazitlere karşı makrofajların antimikrobial etkisinde nitrik oksit'in rol oynadığı bilinmektedir.

Serbest radikaller, ortaklanmamış bir elektrona sahip son derece reaktif moleküllerdir. Bunlar ya mitokondrial solunum sisteminden sızarlar veya metabolizmanın yan ürünleri olarak hücrelerde sürekli olarak üretilirler. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar '**Antioksidant Savunma Sistemleri**' olarak bilinirler.

Oksijenden kaynaklanan serbest radikaller, hücre hasarı ve ölümünde son derece önemli mediatörlerdir. Bunlar sadece yaşlanma proseslerinde önemli olmayıp, aynı zamanda direkt veya indirekt olarak ateroskleroz, reperfüzyon

hasarı, kanser, Parkinson hastalığı, Down sendromu, Alzheimer hastalığı gibi pekçok hastalıkla yakından ilişkili bulunmuştur.

Lipid peroksidasyonu, membranlarda bulunan poliansature yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipid peroksidasyonu yapısal hasara yol açmakta, yapısal hasarlar da lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır.

Fasciolasis, özellikle koyunlarda ekonomik kayıplara neden olan paraziter bir hastalık olup en önemli hasarı karaciğer dokusunda vermektedir. Arginaz enzimi karaciğerde yüksek bir aktiviteye sahip olduğundan, karaciğerdeki böyle bir harabiyetin eritrosit ve karaciğer arginazı üzerine etkisini araştırmak amacı ile eritrosit ve karaciğer arginaz aktivite düzeyleri ve karaciğer arginaz enziminin bazı biyokimyasal (kinetik) özelliklerinin incelenmesine karar verilmiştir.

Fasciolasiste; genç parazitlerin karaciğerdeki göçleri sırasında mekanik bir hasar meydana gelmektedir. Böyle bir hasarın nitrik oksit, serbest radikal oluşumu ve antioksidan sistem üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını anlayabilmek için sağlıklı ve fasciolasisli koyunların kan ve karaciğer dokularında nitrik oksit, lipid peroksidasyonu ve antioksidant savunma sistemlerinden glutatyon peroksidaz ile katalaz enzim aktivite düzeylerinin ölçülmesi çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

2. GİRİŞ

2.1. *Fasciola hepatica*

2.1.1. Etiyoloji: Fasciolasis, sığır, koyun, keçi ve diğer evcil ve yabani ruminantların büyük ekonomik kayıplara neden olan bir trematod invazyonudur. Etkenleri halk arasında 'yaprak kelebeği' adı ile bilinen *Fasciola hepatica* (F.hepatica) ve 'yılan kelebeği' adı ile bilinen *Fasciola gigantica*'dır.

2.1.2. Morfoloji: Düz ve yaprak şeklinde olup, esmer yeşilimtrak sarı renktedir. Uzunluğu 20-30 mm olup eni 8-13 mm'dir. Ön kısmı geniş olup, konik bir çıkıntısı vardır. Arkaya doğru ikizkenar üçgen şeklinde daralarak son bulur. Baş tarafta bulunan ağız çekmeninin hemen altında daha büyük karın çekmeni vardır. Kutikularında arkaya doğru eğik, sivri ve küçük dikenleri bulunur. Yumurtaları oval, kapaklı ve sarı renkte, 130-145 mikron uzunlukta ve 70-90 mikron genişliktedir.

2.1.3. Sonkonakları: Sığır, koyun başta olmak üzere evcil ve yabani diğer ruminantlar, domuz, tavşan, kunduz, fil, at, eşek, köpek, kedi, kanguru ve insanlardır.

2.1.4. Arakonakları: *Lymnea* soyuna bağlı salyangozlar da, ülkemizde bilinen arakonağı *Lymnea truncatula*'dır. Bu salyangoz pH yönünden hafif asit olan bataklık arazilerde amfibik bir yaşam gösterir.

2.1.5. Yerleştiği Yer: Sonkonakta parazitlerin genç formları karaciğer parankimasında görülürken, olgunları ise safra kanallarında yerleşmiştir. Bu parazitlere nadiren sapık parazit olarak derialtı ve akciğerde de rastlanabilmektedir.

2.1.6. Gelişmesi: Erişkin parazitler yumurtalarını safra kanallarına bırakmaktadır. Yumurtalar safra ile duodenuma gelerek dışkı ile konakçıyı terk etmektedir. Dışarıya atılan yumurtalarda miracidiumun gelişmesi ve yumurtayı

terketmesi çevrenin ısı ve rutubetiyle ilişkilidir. Yumurtada miracidiumun gelişmesi 26-27 °C de yaklaşık 9 günde olurken, bundan daha düşük ısılarda gelişme uzamakta, ısı 10 °C'nin altına düştüğünde ise gelişme tamamen durmaktadır. Yumurta içerisinde miracidium geliştikten sonra sulu bir ortamda ışığın uyarıcı etkisi ve salgılamış olduğu proteolitik enzimin yardımıyla yumurtanın kapağını açar ve serbest olarak suda yüzmeye başlar. Miracidiumun suda yaşama süresi 24 saatle sınırlıysa da, çoğunluğunun salyangozu enfekte edebilme kabiliyeti 3 saat gibi bir süreyle sınırlıdır.

Miracidium salyangoza girdikten sonra burada sırasıyla sporokist, redi ve serker dönemleri gelişir. Arakonağı terk eden serkerler suda yüzmeye başlarlar. Bir süre sonra bu serkerler suda bulunan bitki, bitki yaprakları veya diğer cisimlere yapışarak kuyrukları kopmakta, kist bezlerinin yapmış olduğu salgı ile etrafları çevrilmekte ve yuvarlak bir şekil almaktadırlar. Metaserker adı verilen bu formun sonkonak için enfektif özellik gösterebilmesi için 2-3 günlük bir olgunlaşma sürecini tamamlaması gerekmektedir. Miracidiumun yumurtayı terk edişinden metaserkerlerin oluşmasına kadar geçen süre en uygun şartlarda en az 5-6 haftadır.

Sonkonakçılar metaserker taşıyan otları yemek suretiyle enfekte olmaktadır. Bağırsaklara gelen metaserkerlerin kist duvarı parçalanmakta ve genç parazitler kistten çıkmaktadırlar. Kistten çıkan genç parazitler, bağırsağı delerek karın boşluğuna geçmektedirler. Karın boşluğuna geçen parazitler yaklaşık bir hafta sonra karaciğere ulaşmaktadırlar. Karaciğer kapsulasını delerek içeriye giren genç parazitler karaciğer dokusunda göç etmeye başlarlar. Karaciğer dokusunda yaklaşık 6-7 hafta kalan parazitler büyüyüp gelişmekte ve oradan da önce küçük safra kanallarına daha sonra da büyük safra kanallarına geçip olgunlaşmakta ve yumurta üretmeye başlamaktadırlar. *F. hepatica* sonkonakta uzun süre yaşayan parazitlerdendir. Koyunlarda 11 yıl kadar yaşarken, bu süre sığırlarda en fazla 1 yıldır.

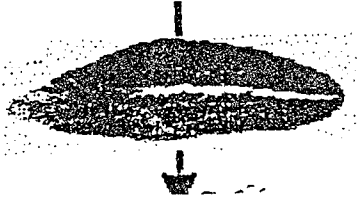
2.1.7. Patogenesis: Fasciolasiste bir karaciğer tahribatı söz konusu olup, bu da karaciğere gelen ve safra kanallarında olgunlaşan parazitlerin sayısına bağlıdır.

Karaciğer tahribatını genç formlar parankimada, olgunları ise safra kanallarında oluştururlar. Konakçının direncine ve belirli bir süre içerisinde alınan metaserker sayısına bağlı olarak hastalık perakut, akut, kronik ve subkronik olarak seyreder.

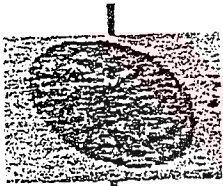
Parazitler safra kanallarında seksüel olgunluğa erişirler



Peritoneal kavite boyunca göç eden parazitler, karaciğerde göç ederek safra kanallarına ulaşırlar



Yumurtalar konakçının feçesi ile dışarı atılır



Yumurtalar açılır ve miracidium arakonakçı salyangozu enfekte eder

İnce bağırsaklarda metaserkerler kist duvarını parçalarlar ve bağırsağı delerek karın boşluğuna geçerler



Metaserkerli otları yiyen sonkonakçılar böylelikle enfekte olurlar



Parazitlerin salyangoz içinde asexual olarak çoğalması sonucu serkerler meydana gelir

Bitkilere yapışan serkerlerin etrafının kist salgısı ile kaplanması sonucu metaserker oluşur

Şekil 1: Fasciola hepaticanın Yaşam Siklusu

2.1.8. Perakut Fasciolasis: Çok fazla sayıda metaserker alınmasıyla oluşur ve hayvanlar 1-2 gün içinde klinik belirti göstermeden ölürlür. Otopside karaciğer kapsülünün yırtıldığı ve karın boşluğunda kanlı bir sıvının toplandığı gözlenir.

2.1.9. Akut Fasciolasis: Daha çok koyunlarda ve bir yaşından küçük sığırlarda görülür. Bu hayvanlarda parazite karşı direnç gelişmediği için kısa sürede fazla sayıda metaserker alınması karaciğer parankimasında şiddetli tahribata yol açar. Bu olay akut travmatik hepatitiden ibarettir. Göç sırasında parazitler damarları da parçalamakta, bunun sonucu olarak karaciğerde kanamalara neden olmakta ve arkalarında kan dolu tünelcikler bırakmaktadırlar. Daha sonra bu alanlar yangı hücreleri ile dolmaktadır. Bazen aşırı kanamadan dolayı hayvan aniden ölebilmektedir. Otopside karın boşluğunda kanlı ve fibrinli bir sıvı vardır. Karaciğer büyümüş ve kanamalıdır. Yüzey fibrinli bir zarla örtülü ve kapsula altında hematomlar görülebilir. Karaciğerin yüzeyi parazitlerin göç izleriyle doludur.

2.1.10. Kronik Fasciolasis: Bu durum akut olayları atlatanlarda ve az sayıda metaserkerin alınması sonucunda şekillenmektedir. Parazitlerin üzerindeki dikenler safra kanallarını sürekli irrite eder. Safra kanalları yangılaşır ve fibröz doku artışı sonucu kalınlaşır. Safranın kıvamı koyulaşır ve akışı yavaşlar. Safra kanallarının yapısının bozulması, plazma proteinlerinin bu kanallar içine geçmesine ve bağırsaklar yoluyla dışarı atılmasına neden olur. Buna bağlı olarak da kanda albumin düzeyi düşer. Otopside, hayvan zayıflamış olup karın boşluğunda sıvı toplandığı görülür. Safra kanalları kalınlaşmış olup, bu kanalların etrafında ve parazitlerin göç yollarında fibrosis görülür.

2.1.11. Fasciolasis ve Bakteriyel Enfeksiyonlar: F.hepatica'nın biyolojisinde anlatıldığı gibi, bu trematod pasif olarak son konakçı tarafından alındıktan sonra vücutta bir göç devresi geçirmektedir. Bu esnada genç kelebeklerin bağırsaklardaki bakterileri son konağın dokularına taşıdığı dikkati çekmiştir. Bunlar arasında fasciolasisli sığırlarda görülen Paratifo, Salmonella enteritidis ve koyunlarda Bacterium coli enfeksiyonları gösterilmektedir. F.hepatica'nın genç

formları karaciğere geldikten sonra parankim dokudan göç ederek safra kanallarına doğru giderler. Bu esnada genç kelekler karaciğer parankim hücrelerini tahrip ederler. Bu tahribat sonucu anaerobik bir ortam şekillenir. Bu ise bu organda mevcut olan veya genç keleklerle bağırsaktan gelen Clostridium novyi sporlarının çoğalmasıyla ve toksin oluşturmasıyla sonuçlanmaktadır. Bunun sonucu olarak da hayvanlarda toksemiye bağı olarak ölümler meydana gelmektedir (6,70).

2.2. Sirozun Tanımı ve Oluşumu

Karaciğer vücuttaki en büyük organdır, çok sayıda ve değişik işlevleri vardır. Karaciğerin safra tuzlarının oluşumu, plazma proteinlerinin, heparinin, protrombinin, fibrinojenin üretilmesi, yağ metabolizması ve yağ depolanması, üre ve amino asit oluşumu, glikojen depolanması gibi çeşitli biyokimyasal işlemlerde önemli rolü vardır. Siroz, karaciğer interstitiumunun (destek dokusunun) süregen ve proliferatif yangısı olup, karaciğerde ilerleyici bir fibrozis veya nedbeleşme söz konusudur. Karaciğer parankimi gözden kaybolur ve bunun yerini giderek yaygın bir biçimde üreyen interstitiel doku alır. Karaciğer kan akımı siroz ve diğer karaciğer hastalıklarında belirgin derecede azalır (5).

2.2.1. Sirozun Sebepleri

- 1- Toksik maddeler: Alkol, fosfor, kloroform, manganez, arsenik, karbontetraklorür (CCl₄), kömür katranı, bazı zehirli bitkiler...vb.
- 2- Enfeksiyöz-toksik etkenler,
- 3- Parazitler veya larvaları,
- 4- Safra yollarında oluşan ve giderek bu kanalların çevresine aşılana ve buradan da bütün karaciğer çevresine yayılan yangı olayları,
- 5- Eritrositlerin kitle halinde yıkımıyla ilgili olarak karaciğerde biriken hemosiderinin oluşturduğu hemosiderosis hepatitis hali,
- 6- Kalp hataları sonucu oluşan pasif hiperemi hali (2).

2.2.2. Sebeplerine Göre Sirozun Sınıflandırılması

- 1-Toksik sirozlar
- 2-Enfeksiyöz-toksik sirozlar

3-Paraziter sirozlar

4-Bilier veya portal sirozlar

5-Pigmentlerle ilgili sirozlar

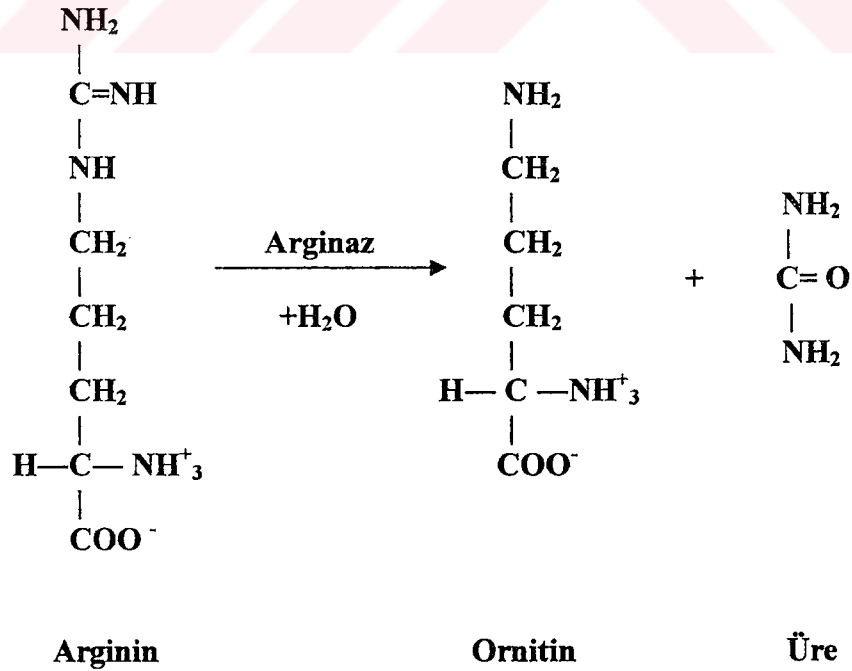
6-Kardiak veya sentral sirozlar

Genel olarak nedeni ne olursa olsun sirozlar birbirini izleyen ayrı nitelikteki iki olay sonucu oluşurlar. Bu olaylar da;

- 1- Karaciğer parankim hücrelerinin değişik biçimlerde dejenere, nekroze veya atrofiye olması ve gözden kaybolması olayı ile,
- 2- Gözden kaybolan karaciğer hücrelerinin yerini doldurmak ve onarımını sağlamak üzere interstiteel bağ dokunun yaygın olarak üremesi olayıdır (2).

2.3. Arginaz Enzimi ve Özellikleri

Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz; E.C. 3.5.3.1) üre döngüsünün son basamağında L-argininin ornitin ve üreye hidrolizini katalize eden bir enzimdir. Varlığı ilk defa 1904 yılında Kossel ve Dakin tarafından gösterilmiştir. Arginin, protein sentezinin arttığı gebelik dönemlerinde ve çocuklarda esansiyel bir amino asittir (104,134).



Üre döngüsünün tüm enzimlerini içeren karaciğer hem üre sentezinin hem de arginazın ana kaynağıdır. Ancak arginaz enzimine karaciğer dışındaki birçok dokularda da rastlanılmaktadır. Bu dokuların başlıcaları; eritrosit, lökosit, trombosit, beyin, bağırsak, böbrek, tükürük bezleri, iskelet ve kalp kasları, tiroid, plasenta, meme bezi, deri ve testislerdir. Serumda arginaz aktivitesi tespit edilmiş ise de aktivite düzeyi çok düşüktür. Eritrosit arginaz aktivitesi serumun yaklaşık 200 katı kadardır (67,146).

Eritrositler; üre döngüsü ile üre sentez edememelerine rağmen, insan, sığır ve koyun eritrositlerinde aktif bir arginazın varlığı tespit edilmiş, buna karşılık tavuk ve keçi eritrositlerinde bu enzime rastlanılmamıştır (46,112). Ozan ve ark. (112)'ları, tavuk eritrositlerinde argininin varlığını göstermelerine rağmen ölçülebilir bir düzeyde arginaz aktivitesi saptayamamış ve bunu da tavuk eritrositlerinde arginaz aktivitesi olmadığı şeklinde yorumlamışlardır.

Plazma üre düzeylerinin eritrosit arginaz aktivitelerinden etkilenip etkilenmediğini ortaya çıkarmak amacıyla yapılan bir çalışmada, çeşitli türlerin kan plazmalarında üre düzeyleri ile eritrosit arginaz aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçta, L-argininin eritrosit membranlarından geçerek arginaz ile hidrolize olduğu ve oluşan ürenin de süpernatant ürelerini artırdığı deneysel olarak ispatlanmıştır (38).

Arginaz sadece üreotelik canlılarda değil, bazı üreotelik olmayan canlılarda ve bitkilerde de bulunmuştur. Üreotelik olmayan canlılardaki arginazın varlığı, evrimsel gelişimden artakalan bir oluşum olarak açıklanmaya çalışılmıştır; Evrimin ilk dönemlerinde tüm canlılarda üre döngüsünün olduğu, fakat canlıların çevre koşulları ile uyum sürecinde oluşan biyokimyasal değişimler sonucu üreotelik olmayan canlılarda, üre döngüsünün bazı enzimleri kaybolduğu halde arginazın kaybolmadığı şeklinde ifade edilmektedir (37,51).

Arginaz enziminin katalize ettiği reaksiyonun iki ürünü vardır. Bunlar üre ve ornitindir. Üre böbrek yolu ile atılırken ornitin prolin ve poliaminlerin sentezinde rol oynamaktadır. İnsanlarda arginazın karaciğer dışındaki dokularda biyokimyasal ve biyolojik rolü tam olarak bilinmemekle birlikte üre döngüsü ile ilişkisinin olmadığı, protein veya poliamin sentezi için öncül molekül olan ornitini sentezlediği ileri sürülmüştür (51,68).

Fare ve insan dokularında yapılan çalışmalarda, arginaz enziminin beş izoenzimi olduğu saptanmıştır (66,124,171). İzoenzimlerin dokulara göre dağılımı şöyledir. Karaciğerde A_1 , A_2 , A_3 , A_5 , böbrek, barsak ve beyinde A_1 , A_4 , submaksillar tükürük bezinde A_3 , fibroblastlarda A_1 , A_2 , A_3 , eritrositlerde A_2 , A_4 , parotis bezinde A_1 , meme bezinde A_1 , A_2 bulunur (57,124,171). Bu izoenzimlerin hücre içi yerleşimleri de farklılık göstermektedir. Karaciğer için ana form kabul edilen A_1 sitoplazmada yerleşirken, böbrek için ana form kabul edilen ve üre sentezinden ziyade prolin biyosentezinde görevli olan A_4 formu mitokondrial yerleşim göstermektedir. Böbrek A_1 arginazı sitoplazmada sınırlanmıştır (144).

Arginaz enziminin kinetik özellikleri çeşitli dokularda birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur. Enzimin substrat olarak argininden başka kimyasal maddeleri de kullandığı gösterilmiştir. Bir çalışmada, kan üre tayini esnasında, üreaz prepatındaki arginin ve L-kanavaninin eritrosit arginazına substrat görevi yaptığı belirtilmiş, başka bir çalışmada ise argininin analogu olan L-homoargininin insan karaciğer ve eritrosit arginazı için substrat olmadığı gösterilmiştir (19,60).

Arginazın Mn^{+2} iyonları eşliğinde belirli derecelerdeki ısı ile preinkübasyonu enzimin aktivitesini artırmaktadır (73). Preinkübasyonun maksimum aktivite için gerekli olduğu ilk olarak Schimke (141) tarafından karaciğer arginazında ortaya konmuştur. Preinkübasyon ortamına ilave edilen Mn^{+2} iyonlarının enzim-substrat arasında bir metal köprü kurduğu ve Enzim-Mn-Arginin kompleksinin oluşmasının enzimi aktive ettiği bildirilmektedir (129).

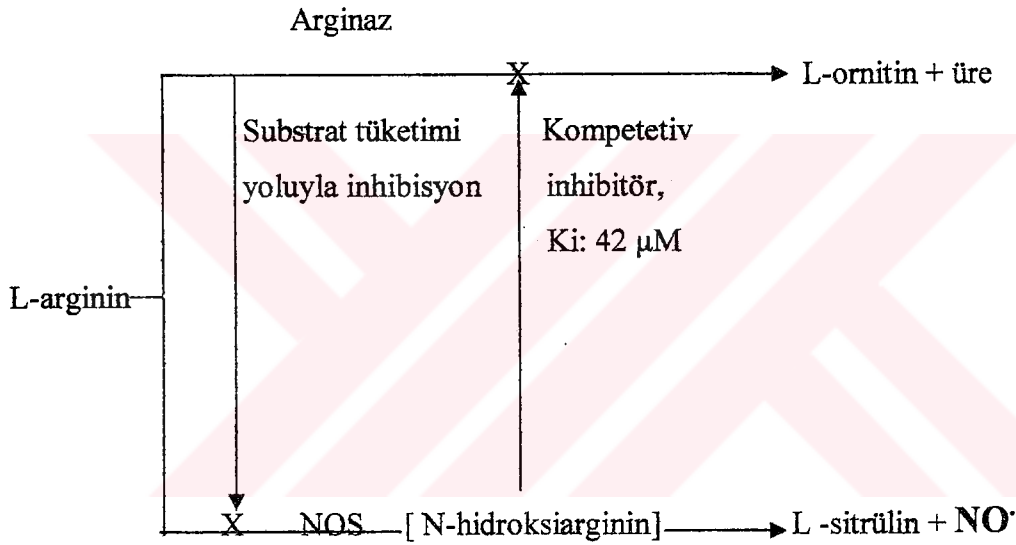
Arginazın, arginini hidrolize edebilmesi için optimal pH'nın 9,4-9,8 arasında olması gerekir (104,146). Enzim aktivitesi pH 7,4'te % 10-30 oranında azalmakta, pH 7'nin altında ise enzimin aktivitesi kaybolmaktadır (141). Ozan ve Gülen (109,110) yaptıkları çalışmalarda F. hepatica'nın arginaz enzim aktivitesinin optimal pH'sını 10,5 olarak bulurken, sığır tükürük arginazının optimal pH'sını 9,2-9,3 arasında saptamışlardır.

Arginazın tetramerik bir yapıya sahip olduğu ve tetramerik yapının oluşması için Mn^{+2} katyonlarının gerekli olduğu Muszynska (101) tarafından bildirilmiştir. Mn^{+2} iyonlarının enzime bağlanması, ısıya dayanıklılığı artırmakta ve enzimin inaktivasyonlara karşı daha dayanıklı hale gelmesini sağlamaktadır (50,110). Ozan ve Gülen (110) tarafından yapılan bir çalışmada, sığır tükürük

arginazına Mn^{+2} iyonları ile preinkübasyonun etkisi incelendiğinde tükürük arginaz aktivitesinin % 130 dolayında arttığı bulunmuştur. Aynı çalışmada tükürük bezleri ve karaciğer arginazının Mn^{+2} iyonları ile aktivasyona uğradıkları, ancak eritrosit arginazında bu aktivasyonun gözlenmediği ortaya konulmuştur.

Colombo ve Konarska (19) Mn^{+2} iyonları ile aktivasyonun karaciğer arginaz aktivitesinde 4-5 kat, eritrosit arginaz aktivitesinde 2-6 kat artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

2.4. Arginaz ile Nitrik Oksit İlişkisi



Şekil 2: Makrofajlarda, Arginaz ve Nitrik Oksit Sentaz Tarafından Argininin Ortaklaşa Yıkımı (22)

2.5. Nitrik Oksit

Nitrik oksit ($NO\cdot$), atmosferde yaygın olarak bulunan azot (N) ve oksijen (O) gazlarının kombinasyonu ile oluşmuş azotmonoksit gazı halindedir. Moleküler orbitalinde eşlenmemiş elektron (e^-) çifti içerdiği için serbest radikal olarak yarı ömrü çok kısa (10-60 sn) ve kimyasal etkinliği oldukça yüksektir. $NO\cdot$ gaz fazında renksiz, standart ısı ve basınçta suda çözünebilen bir moleküldür. Memeli hücrelerin bioaktif salgı ürünleri içinde en düşük moleküler ağırlığa sahip

olan ve hücre membranından kolaylıkla diffuze olabilen, lipidte çözünür bir moleküldür (44,85,167).

NO'nin elektronik yapısı iki farklı formda olabilir, ancak çoğunlukla radikal yapıda olan ve dimerizasyona daha yatkın olan I. yapı görülür. NO'nin hücrelerdeki sitotoksik ve koruyucu etkisinden de sorumlu olan I. yapıdır. II. yapı stabil özellik taşımaktadır (103).



I. Yapı

II. Yapı

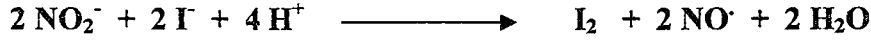
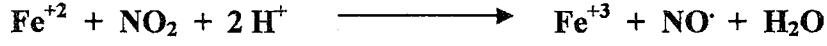
Havadaki NO kısa sürede moleküler oksijen (dioksijen, O₂) ile oksitlenerek nitrojen dioksit (NO₂)'e dönüşür. NO₂ dokular için oldukça zararlı bir bileşiktir. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken, NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır, ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. Düşük konsantrasyonlardaki NO, O₂'e göre hemoglobine 3000 kat daha fazla bir affiniteyle bağlanır. Hemoglobin oksijen formunda ise NO'yu kısa sürede nitrat (NO₃⁻)'a oksitleyerek etkisizleştirir. Özellikle dolaşımdaki oksihemoglobin NO için kuvvetli bir inhibitördür. NO, nitrit (NO₂⁻)'e de okside olabilir ancak NO₂⁻ tekrar oksitlenerek kısa sürede NO₃⁻'a dönüşür (85,99,150).

Tablo 1: NO ile İlişkili Nitrojenin Okside Metabolitleri

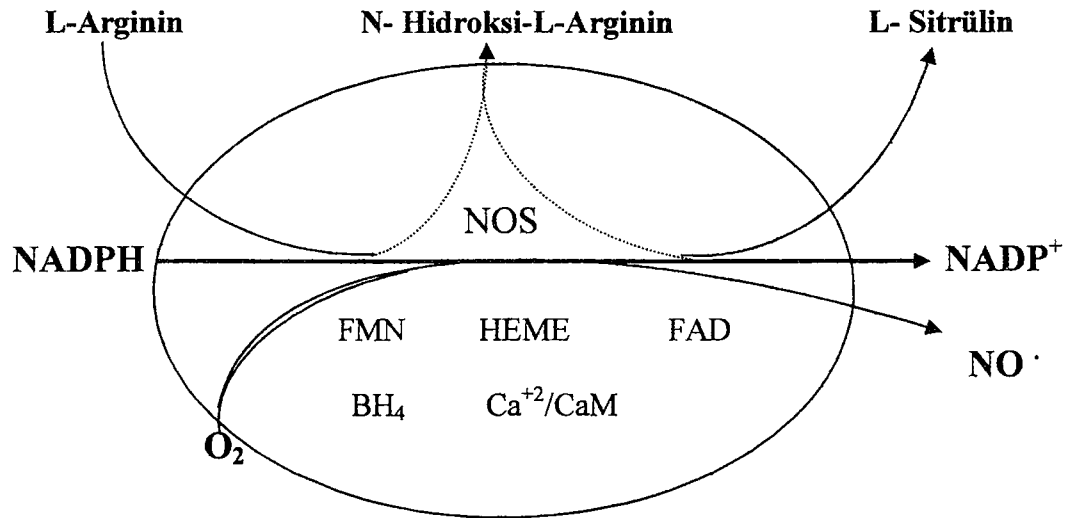
<u>Sembol</u>	<u>İsim</u>	<u>Etki</u>
NO·	Nitrik Oksit	Serbest Radikal (S-R)
NO ₂ ·	Nitrojen Dioksit	S-R, Nitroze Edici Etken Ajan
N ₂ O	Nitröz Oksit	Anestezik
N ₂ O ₃	Dinitrojen Trioksit	Nitroze Edici Etken Ajan
N ₂ O ₄	Dinitrojen Tetraoksit	Nitroze Edici Etken Ajan
NO ₂ ⁻	Nitrit	Asidik Ortamda NO· Oluşturur
NO ₃ ⁻	Nitrat	Stabil Anyon

2.5.1. Nitrik Oksit Sentezi

NO· enzimli veya enzimsiz kimyasal reaksiyonlar ile oluşabilmektedir. NO·, çeşitli laboratuvar reaksiyonları ile enzimsiz olarak oluşturulabilir, ancak bu biyolojik dokulardaki oluşuma çok fazla benzemez (44).



NO·, azid anyonu (N_3^-), hidroksil amin (NH_2OH), hidrazin (NH_2NH_2) ve L-argininden enzimler katalizörlüğünde sentezlenebilmektedir. N_3^- ve NH_2OH , katalaz enzimi ile azot oksidasyonu yaparak NO· oluşturmaktadır. NH_2NH_2 ise, peroksidin ilavesiyle aynı reaksiyonu gerçekleştirir. L-argininden NO· oluşumu memeli hücrelerinde yaygındır ve NADPH'ya bağımlı Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimini gerektirir. Bu reaksiyon hücrenin sitoplazmasında gerçekleşmektedir (96,98,99).



Şekil 3: L-Arginin – NO· Yolu (63)

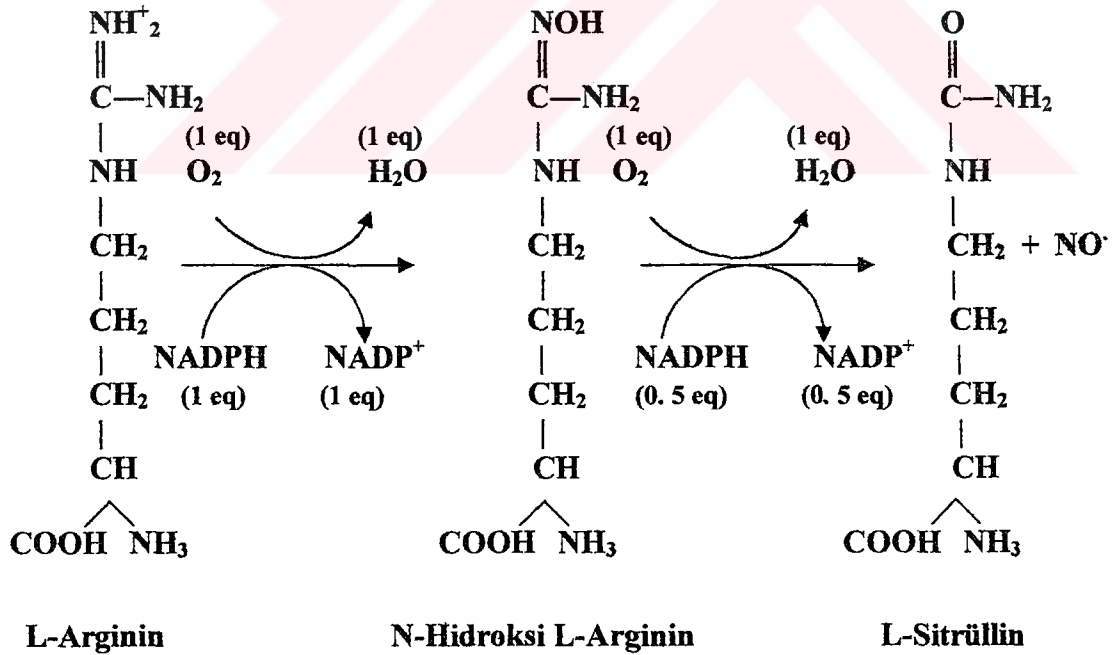
BH₄: Tetrahidro-L-Biopterin

FAD: Flavin Adenin Dinükleotid

CaM: Kalmodulin

FMN: Flavin Mono Nükleotid

NO[•], L-argininin guanido nitrojeninin beş elektron oksidasyonu ile sitrülline dönüşmesi sonucu oluşur. NOS tarafından katalizlenen bu reaksiyon iki basamaklıdır. İlk basamak argininin iki elektron oksidasyonu ile bir ara ürün olan N-hidroksiarginin (NHA) oluşmasıdır. Bu hidrosilasyon basamağında 1 eşvalent (eq) NADPH ve 1 eq O₂ kullanılır. İkinci basamak ise NHA'den NO[•] ve sitrüllin oluşmasıdır. Bu reaksiyon da 0.5 eq NADPH ve 1 eq O₂ kullanılır. Her iki basamak aktivatör olarak Ca⁺² / kalmodulin ve Tetrahidro-L-Biopterin (BH₄) gerektirir (9,85,119).



2.5.2. Nitrik Oksit Sentazın İzoenzimleri

NOS (E.C 1.14.13.39); L-argininden NO[•] ve sitrülün oluşturan NADPH bağımlı bir dioksijenazdır. İlk olarak 1989'da tanımlanmıştır. NOS'ın hem merkezi sitokrom P450'nin spektral özelliklerini taşır ve sitokrom P450/450 redüktazın katalizlediği reaksiyonların bazılarını da gerçekleştirebilir (59,96,98,103).

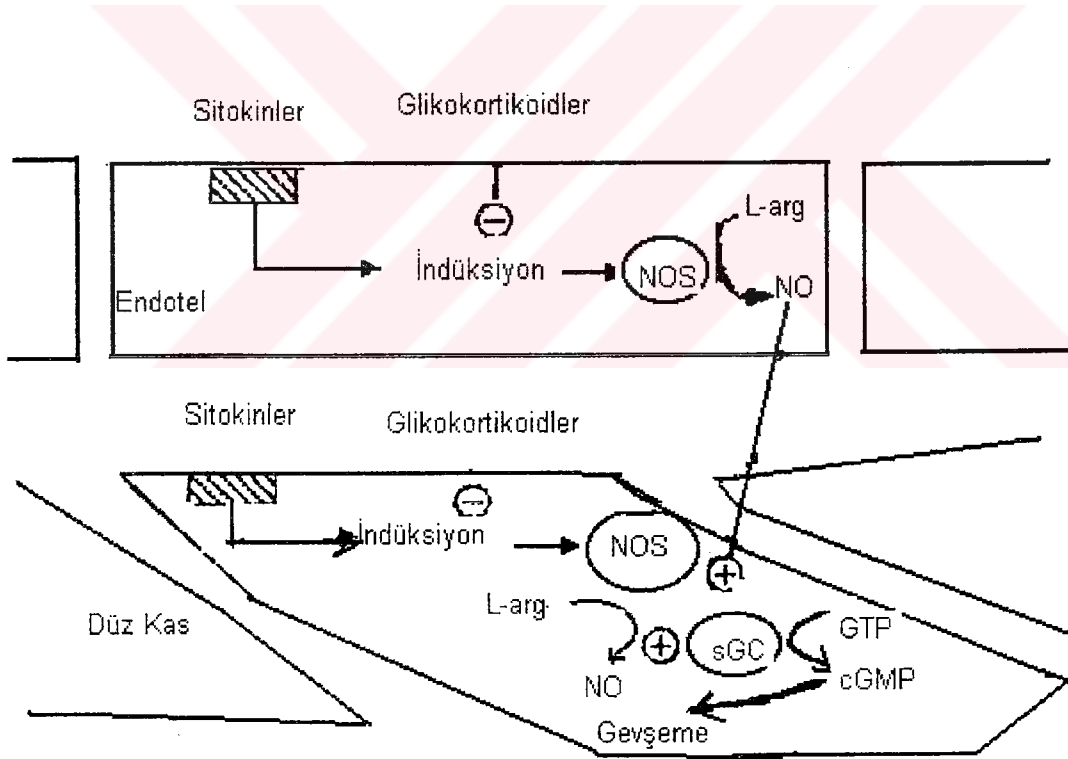
NOS aktivitesi; endotelium, serebellum, nonadrenerjik-nonkolinerjik (NANC) sinirler, makrofajlar, nötrofiller, böbrek, pulmoner epitel hücreleri, gastrik mukoza, düz kas hücreleri, hepatosit gibi bir çok doku ve hücrede gösterilmiştir. NOS'ın, yapısal NOS (cNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır (30,85,119).

Konstitütiv (Yapısal) Nitrik Oksit Sentaz (cNOS): Bu izoenzim özellikle damar endoteli, idrar yolu dokuları, periferik ve santral sinir sistemi gibi dokularda lokalize olmuştur. NOS bu dokularda hemen her zaman mevcuttur, ancak aktif değildir. Hücre içi iyonize Ca⁺² konsantrasyonunun arttığı durumlarda Ca⁺² kalmodulinle birleşerek NOS enzimini aktive eder ve L-argininden NO[•] sentezi gerçekleşir. Ancak sentez süresinin çok kısa olması, sentezlenen NO[•] miktarının çok düşük olmasına neden olmaktadır. Çünkü hücre içi iyonize kalsiyum konsantrasyonu azalmaya başladığı zaman enzim inaktif forma geçerek NO[•] sentezi durmaktadır. Enzim, kalsiyum-kalmodulinle aktive olması nedeni ile kalsiyuma bağımlı-NOS veya konstitütiv-NOS olarak sınıflandırılmıştır (97-99).

İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS): Bu tip NOS, konstitütiv tipin aksine hücre içinde hazır (sentezlenmiş) halde bulunmaz. Özellikle makrofaj ve damar endotel hücrelerinin spesifik sitokinlerle aktivasyonu, NOS'ın indüksiyonu ve NO[•] sentezine yol açmaktadır. Özellikle bakteri lipopolisakkaritleri ve interferon γ veya yüksek konsantrasyonda lipopolisakkaritle uyarılan makrofajlar çok miktarda NO[•] üreterek yabancı hücrelerde sitostatik veya sitotoksik etki meydana getirirler (15).

Tablo 2: cNOS ve iNOS Arasındaki Farklılık ve Benzerlikler

<u>cNOS</u>	<u>iNOS</u>
	L-arginin analogları ile inhibisyon
	NADPH bağımlı
	Sitozolik
	Dioksijenaz
Ca ⁺² / CaM bağımlı	Ca ⁺² / CaM bağımsız
Pikomol NO [•] salınımı	Nanomol NO [•] salınımı
Kısa süreli salınım	Uzun süreli salınım
Glukokortikoidlerden etkilenmez	Glukokortikoidlerden etkilenir

**Şekil 4 :** NOS ve NO[•]'in İndüksiyonunu Etkileyen Faktörler (85)

2.5.3. Nitrik Oksit Sentazın İnhibitörleri

L-Arginin Analogları: L-argininin metillenmiş türevleridir. L-arginin analogları ile yarışmalı substrat inhibisyonu ve substratın redüksiyonu ile sekonder olarak NOS aktivitesi azaltılabilmektedir. Bu şekilde hücreler içine L-arginin transportu da engellenmektedir. [Örnek; N-monometil L-arginin (L-NMMA), asimetrik dimetil arginin (ADMA), vb.]

Flavoprotein Bağlayıcıları: Bu ajanlar NOS'a bağlanmak için, flavoenzimler ile yarışarak NOS'ın aktivitesini azaltmaktadırlar. Bunların inhibitör konsantrasyonları L-arginin analoglarının inhibitör konsantrasyonlarından daha düşüktür.

Hem Bağlayıcıları: Bunlar NOS'daki hem gurubuna bağlanarak enzim aktivitesini inhibe etmektedir.

BH₄ İnhibitörleri: Bu ajanlar ile BH₄'e guanozin tri fosfat (GTP) transforme edilerek BH₄'nin etkisi inhibe edilmektedir. NOS, BH₄ olmadan aktivite gösteremediği için inhibe olmaktadır.

Kalmodulin (CaM) Bağlayıcıları: Bunlar sadece cNOS için etkili olup, CaM'nin NOS'a bağlanmasını engellemektedirler.

Nitrovazodilatatörler: Bunlar vazodilatör tonusu gerçekleştiren 'vazodilatatör sistemi' taklit etmektedirler. Etkilerini oluşturmaları için önce NO'ya dönüşmeleri gerekmektedir (Örnek; nitrogliserin, sodyum nitroprussid, nitrozotiol gibi) (11,97,98,103).

2.5.4. Nitrik Oksit'in Moleküler Hedefleri

NO'nin aktiflediği enzimler arasında solubl guanilat siklaz (sGC) ve ADP-ribozil transferaz yer alır.

Makrofajlardaki NO₂, tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrolayarak antimikrobiyal ve antitümoral sitotoksik etki gösterir.

NO₂, ferritinle reaksiyona girerek serbest demir salınımına yol açar, bu serbest demir de lipid peroksidasyonuna neden olabilir.

Makrofaj kökenli NO₂, tümör hücresinin DNA sentezini engeller. Bunu ribonükleotid redüktazı inhibe ederek yapar.

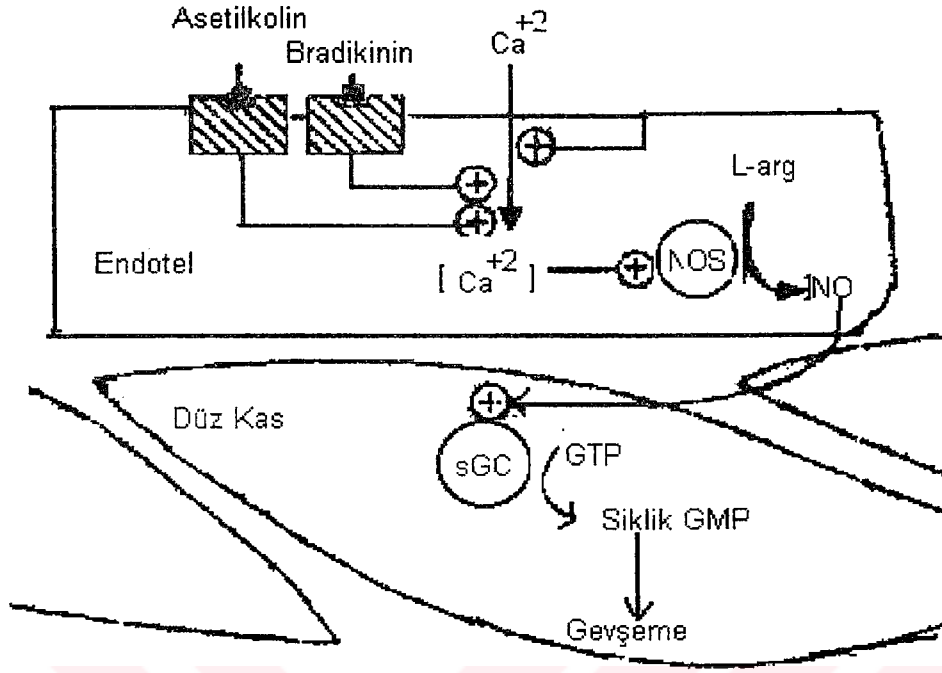
NO₂'in diğer bir hedefi de süperoksid anyon radikalidir. NO₂'in sülfidril ile reaksiyonu ve S-nitrozilasyon, plazminojen aktivatör gibi bazı enzimlerin katalitik fonksiyonlarını artırabilir.

NO₂ ve NO₃ oluşturan bileşikler güçlü nitroze edici ajanlardır (NO₂, N₂O₃, N₂O₄). Bunlar primer ve sekonder aminlerin nitrolizasyonuna öncülük ederek karsinojenik etki gösterirler (139).

2.5.5. Nitrik Oksit'in Fizyolojik Rollerini

Kardiovasküler ve Pulmoner Sistemlerde Nitrik Oksit

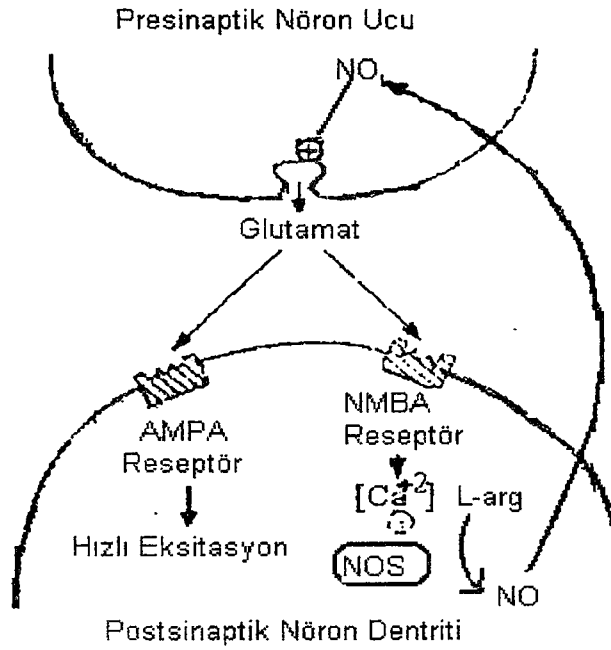
Damar endotelinden salınan NO₂'in etkisi, damar düz kas hücrelerinde guanilat siklazın aktivasyonu ile başlar, hücre içi siklik guanozin mono fosfat (cGMP) konsantrasyonunun artışı ve düz kasların gevşemesi ile sonlanır (85). NO₂, prostasiklinle sinerjistik bir etkileşimle trombosit agregasyonunu ve adezyonunu engellemektedir (27,72,127,163). Trombositler de NO₂ sentez ederek trombosit aktivasyonunun kontrolüne katkıda bulunmaktadır (128). NO₂, sadece sistemik dolaşımın regülasyonunu sağlamakla kalmaz ayrıca kalp, karaciğer, beyin, gibi organlarda lokal dolaşımı da regüle etmektedir (84). Nonkolinerjik ve nonadrenerjik terminallerden salınan NO₂, vazodilatatör etkiyle kan basıncını ve kan akışını düzenlemektedir (45). Nitrogliserin ve Na-nitroprussid gibi bileşikler uzun yıllar kliniklerde hipertansiyonun tedavisinde kullanılmıştır. Vücuda verilen bu maddeler sonuçta NO₂'e dönüşerek etkilerini göstermektedirler (84).



Şekil 5 : NOS'ın Aktive Edilmesi ve NO Sentezi (119)

Nitrik Oksit'in Sinir Sistemindeki Rolü

Yapılan çalışmalar beyin dokusunda aktif çalışan arginin-NO yolunun varlığını ispatlamıştır (118). NO beyindeki glutamat resptörünü etkilemekte ve hücre içindeki cGMP konsantrasyonunu artırarak fizyolojik etki göstermektedir. Glutamat tarafından indüklenen sinirsel ileti işleminde NO'in bir nörotransmitter olarak rol oynadığı tam olarak ispat edilmiştir (23). Hafıza oluşumu ile ilgili çalışmalar, öğrenme fonksiyonunun bozulduğu durumlarda NOS'ın inhibe olduğunu ve NO düzeyinin azaldığını ortaya koymuştur. Ayrıca NO koku alma, ağrı duyusu, görme işlevinde de fizyolojik olarak rol almaktadır (108).



Şekil 6 : Beyin Dokusunda Arginin-NO Yolu (118)

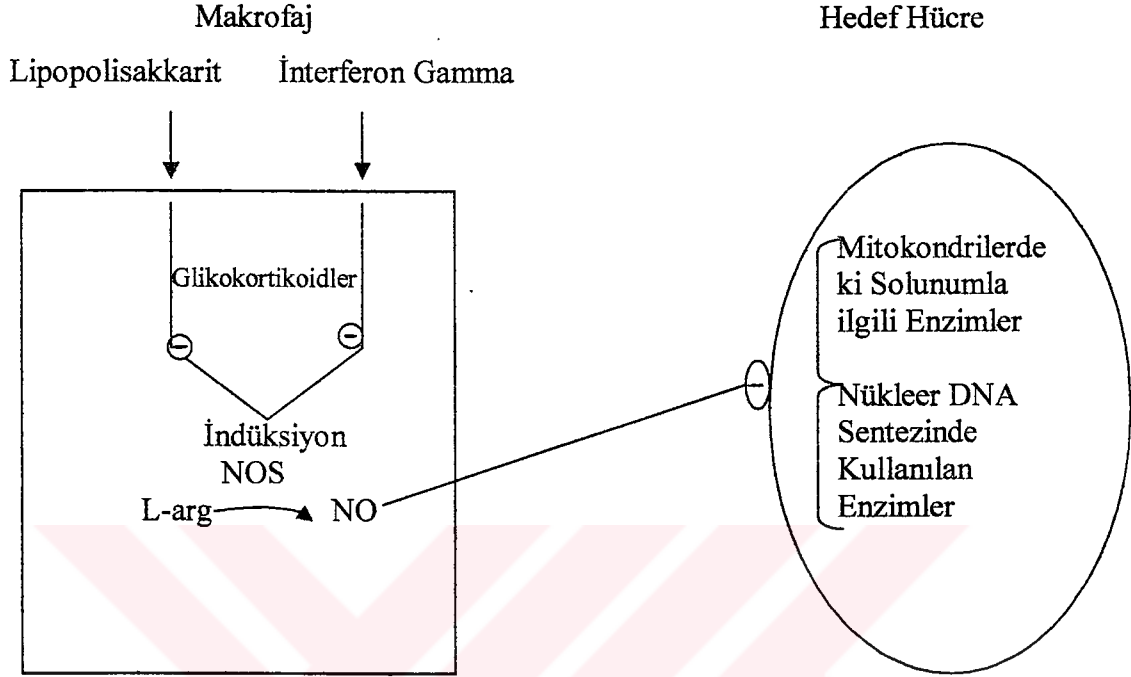
Sitotoksik ve Sitostatik Ajan Olarak Nitrik Oksit

İnterferon veya bakteri lipopolisakkaritleri tarafından aktive edilen makrofajlar büyük miktarda NO sentez ederler. Aktivasyonun olmadığı durumlarda makrofajlarda NOS bulunmaz. L-arginin-NO yolunun indüklenmesi, saatlerce hatta günlerce devam eden NO sentezine neden olmaktadır (85).

Makrofaj kaynaklı NO bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki yapmaktadır (81,100). NO bakteri, parazit gibi birçok patojenin ve tümör hücrelerinin ATP üreten oksidatif fosforilasyonunun (ubikinon redüktaz), glikolizin (gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz), Trikarboksilik Asit (TCA) siklusunun Fe içeren bazı enzimlerini (cis-akonitaz) inhibe etmekte ve sonuçta bakteri, parazit, tümör hücrelerini öldürmektedir (25,151,172).

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 (64,79).

Makrofajlardan özellikle monositlerde L-arginin-NO yolu; tümör hücreleri, intra ve ekstrasellüler mikroorganizmalara karşı çok önemli bir savunma mekanizmasıdır (99).



Şekil 7 : Makrofaj Kaynaklı NO'nun Parazit ve Tümör Hücre Üzerine Etkisi

(98)

2.6. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Atomlarda elektronlar, 'orbital' adı verilen uzaysal bölgede ve çift olarak bulunurlar. Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki moleküller ise tek yani eksik elektronludur. Eksik elektronlu bu moleküller, bulabilecekleri herhangi bir molekül ile iletişime girerek bu molekülden ya bir elektron alır ya da ona bir elektron verirler. İşte başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere 'Serbest Radikaller' 'Oksidant Moleküller' veya en doğru adlandırma ile 'Reaktif Oksijen Partikülleri' denmektedir. Ortaklanmamış elektron, genel olarak üst kısma yazılan bir nokta ile gösterilir.

O_2 bütün aerobik organizmaların hayatlarını devam ettirebilmeleri için şarttır. Aerobik enerji metabolizması, mitokondriyal elektron transportundaki oksidoredüksiyon enerjisinin ATP'nin yüksek enerjili fosfat bağına dönüştürdüğü oksidatif fosforilasyon üzerine kurulmuştur. O_2 , mitokondriyal enzimatik kompleksinin terminal enzimatik komponenti olan sitokrom c oksidaz için en son elektron akseptörü olarak görev yapar. Mitokondriyal enzimatik kompleks O_2 'i 4 elektron redüksiyonu ile suya indirger. Oksijenin kısmen indirgenmiş ve son derece reaktif metabolitleri bu elektron transfer reaksiyonları sırasında meydana gelebilir. Bu oksijen metabolitleri, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 ve geçiş metal iyonları varlığında meydana gelen hidroksil radikali (OH^{\cdot})'dir (17,31,126,175). Oksidantlar (reaktif oksijen partikülleri) tek elektron eksiklikleri nedeni ile başka moleküller ile kolayca elektron alışverişi yapabilenler (radikaller) ve elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküller ile radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşebilenler (non-radikaller) olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Reaktif Oksijen Partikülleri

1-Radikaller

- Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)
- Hidroksil Radikali (OH^{\cdot})
- Alkoksil Radikali (RO^{\cdot})
- Peroksil Radikali (ROO^{\cdot})

2-Non-Radikaller

- Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
- Lipid Hidroperoksit (ROOH)
- Hipokloröz Asit (HOCl)

2.6.1. Süperoksit Radikali

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir (40-42).



Canlılarda süperoksit üreten başlıca tepkimeler şunlardır (58):

1- Mitokondriyal Elektron Transport Zinciri; Bu sistemde $O_2^{\cdot-}$ üreten iki bölgenin varlığı bildirilmiştir. Bunlardan birincisi bir flavoprotein olan NADH

dehidrogenazdır ve mitokondri zarında üretilen süperoksid radikallerinin üçte biri bu bölgeden kaynaklanır. İkinci bölge ise koenzim Q-sitokrom b bölgesi olup, ubikinonun otooksidasyonu elektron transport sisteminde üretilen $O_2^{\cdot-}$ 'in üçte ikisini oluşturur. Elektron transport sisteminde kullanılan oksijenin %1-5'i $O_2^{\cdot-}$ oluşumu ile sonuçlanır (7,42,93,94).

2- $O_2^{\cdot-}$ fagositoz sırasında fagositoz yapan hücreler tarafından (nötrofil, eozinofil ve makrofaj) üretilirler. Bu hücreler bakteriyi fagosite edince NADPH oksidaz enziminin etkisiyle moleküler oksijenden $O_2^{\cdot-}$ üretirler ve bunu da bakterilerin parçalanmasında kullanırlar (7,157).

3- Çeşitli enzimatik tepkimelerde $O_2^{\cdot-}$ oluşur. Bu enzimlere ksantin oksidaz örnek verilebilir (7).

4- Hücre membranlarının hasarıyla açığa çıkan araşidonik asit, moleküler oksijen ile siklooksijenaz enziminin katalizörlüğünde endoperoksitleri ve $O_2^{\cdot-}$ radikallerini oluşturur (7).

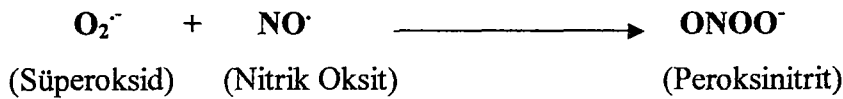
5- İndirgenmiş geçiş metallere otooksidasyonu da $O_2^{\cdot-}$ meydana getirebilir.



Bu reaksiyonlar geriye dönüşümlüdürler. Bu yüzden geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonu geriye dönüşümlü redoks reaksiyonu olarak düşünülebilir.

$O_2^{\cdot-}$, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direk olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (17,61).

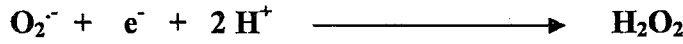
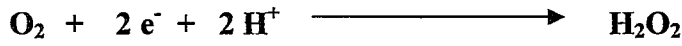
$O_2^{\cdot-}$, fizyolojik bir serbest radikal olan NO^{\cdot} ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir.



Böylece NO[•]'in normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO₂), [•]OH ve nitronyum iyonu (NO₂⁺) gibi daha başka toksik ürünlere dönüştürler (12).

2.6.2. Hidrojen Peroksid

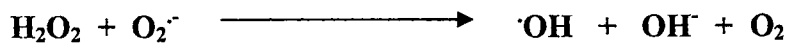
O₂'in çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya O₂^{•-}'in bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek H₂O₂'i meydana getirir. H₂O₂ membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidanttır (17,61,88).



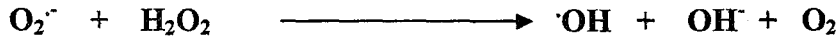
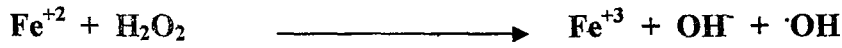
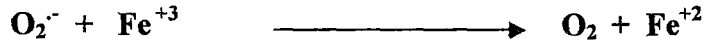
Biyolojik sistemlerde H₂O₂'in asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksid molekülü iki proton alarak H₂O₂ ve O₂'i oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.



Bu dismutasyon ya spontandır ya da süperoksid dismutaz tarafından katalizlenir. H₂O₂ bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü H₂O₂ süperoksid ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ([•]OH) oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



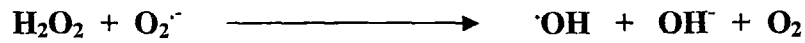
Bu reaksiyona 'Haber-Weiss' reaksiyonu adı verilir. Haber-Weiss reaksiyonu ya katalizör varlığında ya da katalizörsüz cereyan edebilir. Fakat, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{+3}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak 'Fenton reaksiyonu' ile H_2O_2 'ten $\cdot\text{OH}$ ve OH^- üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekildedir (17,61).



Görüldüğü gibi O_2^- , hem H_2O_2 kaynağı hem de geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisidir. İndirgenmiş geçiş metalleri (demir ve bakır gibi) okside şekillerine göre H_2O_2 ile daha reaktiftirler.

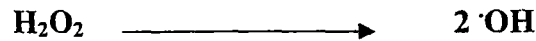
2.6.3. Hidroksil Radikali

1934 yılında Haber ve Weiss, H_2O_2 'in O_2^- ile indirgenmesiyle $\cdot\text{OH}$ oluşabileceğini göstermişlerdir (58).



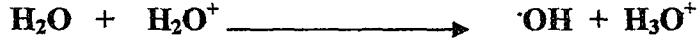
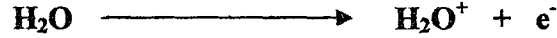
İn vivo olarak hidroksil radikali yapımına neden olabilen önemli tepkimeler şunlardır (42,58);

1- H_2O_2 'in fotolizisi ile;

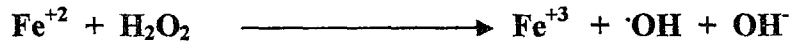
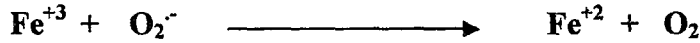


2- Ozona elektron transferi ile $\cdot\text{OH}$ oluşabilir. Bu nedenle ozon toksisitesinde $\cdot\text{OH}$ 'nin rolü vardır.

3- İyonlaştırıcı radyasyonun suya etkisi ile;



4- İn vivo olarak $\cdot\text{OH}$ üretimi bakımından en önemli tepkime Fenton tepkimesidir.



5- Radikal tepkimeleri ile oluşabilen bir organik radikal, H_2O_2 ile tepkimeye girerek $\cdot\text{OH}$ radikali üretebilir.

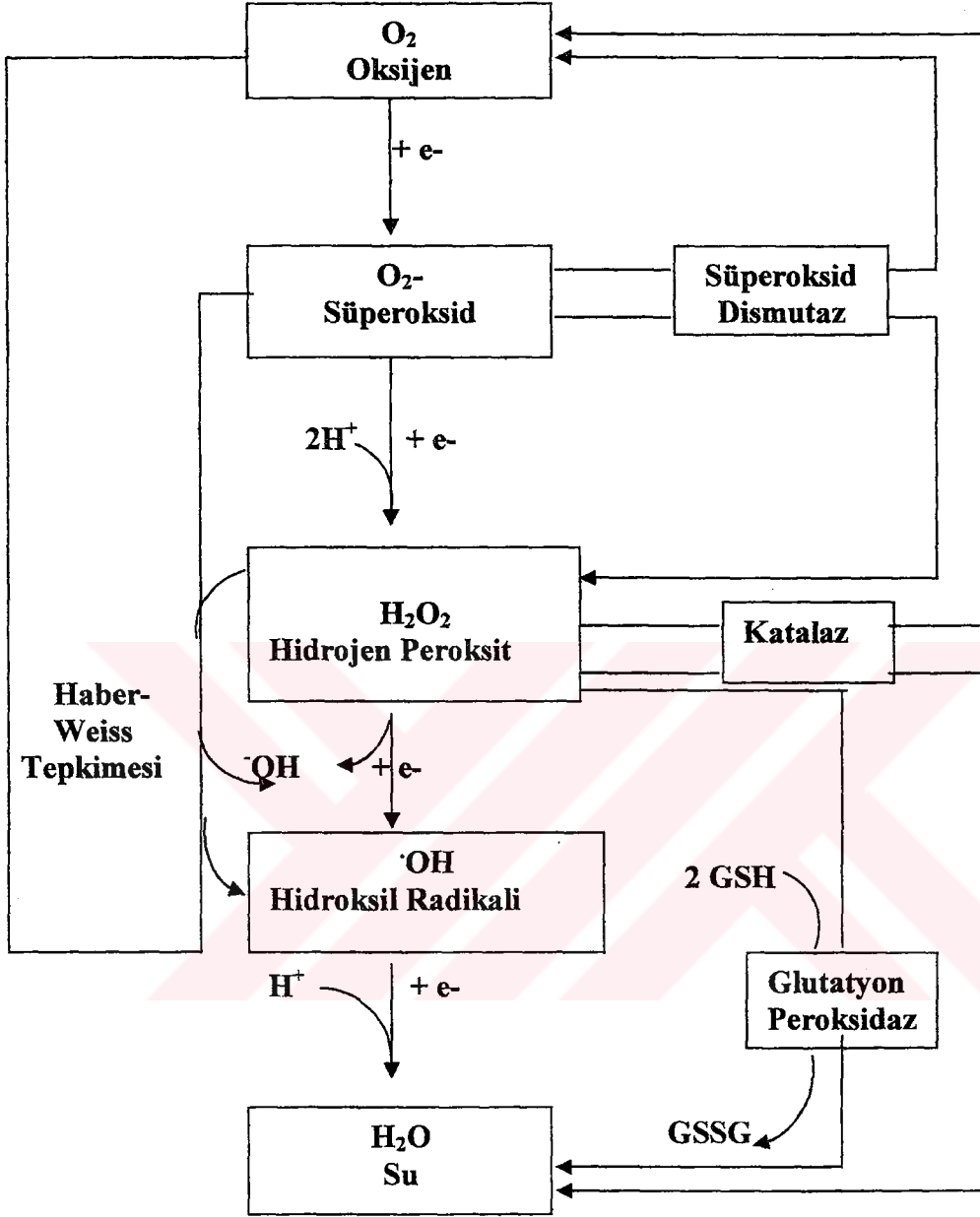


Son derece reaktif bir oksidant radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısadır, oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur.

2.6.4. Singlet Oksijen

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesi ile oluşur.

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller (R^\cdot), peroksil radikalleri (ROO^\cdot), alkoksil radikalleri (RO^\cdot), tiyl radikalleri (RS^\cdot) gibi önemli serbest radikaller de meydana gelirler. Bunlardan özellikle PUFA'lerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan bir radikaldir (17,61,88,143).



Şekil 8 : Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidant Enzimler (114)

2.7. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar, hücrenin potasyum kaybını ve trombosit agregasyonunu artırır. Proteaz, fosfolipaz, elastaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz, lipooksijenaz, triptofan dioksijenaz ve galaktoz oksidaz gibi savunma sistemlerini inaktive ederler (31,88).

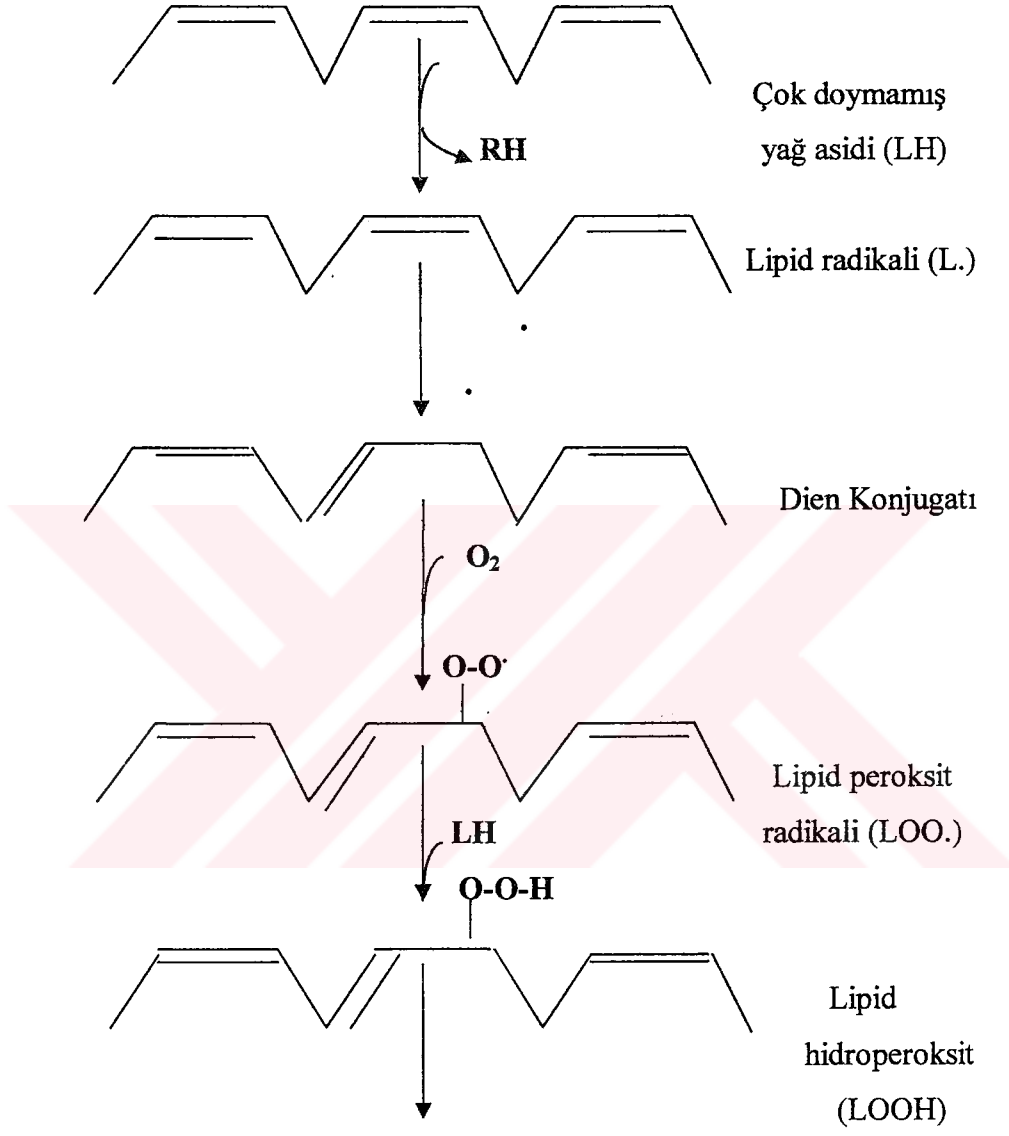
2.7.1. Membran Lipidlerine Etkileri

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipidler en hassas olanlarıdır (40,41). PUFA'lerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler (149).

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan PUFA'ı zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer PUFA'lerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder (71).

Lipid peroksidasyonu ya toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşurlar. Bu bileşikler, ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffuze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı

yayarlar. Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur (31,40).



Parçalanma ürünleri

(aldehitler ve diğer karbonil bileşikler, etan, pentan v.s.)

Şekil 9 : Çok Doymamış Yağ Asitlerinin Peroksidasyonu (42)

2.7.2. Proteinlere Etkileri

Proteinler serbest radikal etkisine karşı PUFA'lerinden daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme derecesi amino asit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asidlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir.

Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin O_2^- veya H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (17,31,88).

2.7.3. Nükleik asitler ve DNA' ya Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA, serbest radikallerden kolay zarar görebilir önemli bir hedeftir (17,40).

2.7.4. Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksidler ve okzoaldehidler meydana gelirler. Bunlar diabetes ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik olgularda önemli rol oynarlar.

Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (62,88).

2.8. Antioksidant Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bir çok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar 'Antioksidant Savunma Sistemleri' veya kısaca 'Antioksidantlar' olarak bilinirler. Antioksidantlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidantlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidantlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilir gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunabilirler (17,31).

A-Doğal (endojen) Antioksidantlar

Enzimler

- Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
- Süperoksid dismutaz
- Katalaz
- Glutasyon peroksidaz
- Glutasyon-S-transferaz
- Hidroperoksidaz

Enzim olmayanlar

a-Lipid fazda bulunanlar

α -tokoferol (E-vitamini)

β -karoten

b-Sıvı fazda (hücre sitozolünde veya kan plazmasında) bulunanlar

Askorbik asid	Myoglobin	Laktoferrin
Hemoglobin	Melatonin	Albumin
Transferrin	Metionin	Bilirubin
Ferritin	Glutasyon	Ürat
Sistein	Seruloplazmin	

B-Eksojen Antioksidantlar

- Ksantin oksidaz inhibitörleri
- Soya fasulyesi inhibitörleri
- NADPH oksidaz inhibitörleri
- Rekombinant süperoksid dismutaz
- Trolox-C: E vitamini analogu
- Endojen antioksidant aktiviteyi artıran maddeler
- Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları
- Demir redoks döngüsünün inhibitörleri
- Sitokinler
- Barbitüratlar
- Demir şelatörleri

C-Gıda Antioksidantları

- Butylated hydroxytoluene (BHT)
- Butylated hydroxyanisole (BHA)
- Sodium benzoate
- Ethoxyquin
- Propylgalate
- Fe-süperoksid dismutaz

2.9. Antioksidant Etki Tipleri

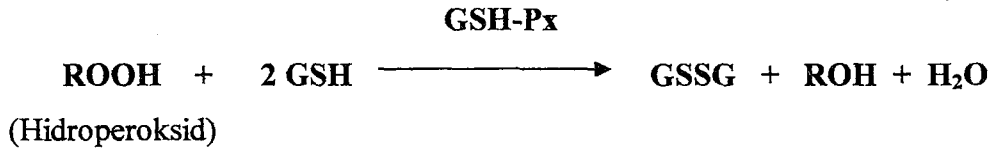
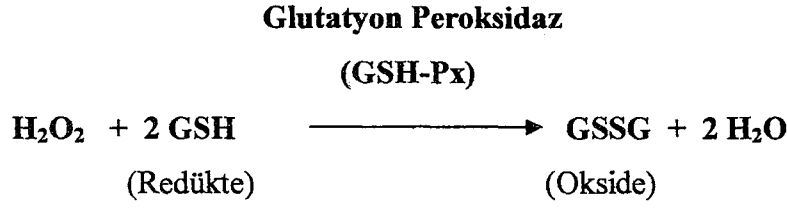
- 1- Toplayıcı (Scavenging) etki
- 2- Bastırıcı (Quencher) etki
- 3- Onarıcı (Repair) etki
- 4- Zincir kırıcı (Chain Breaking) etki

2.9.1. Enzimatik Antioksidantlar

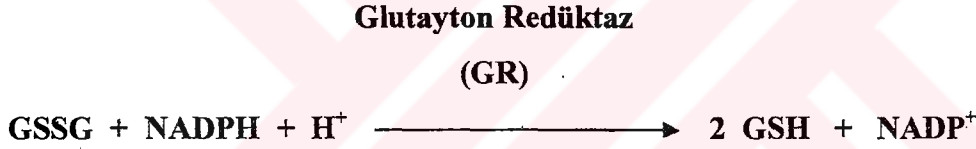
2.9.1.1. Glutasyon Peroksidaz

GSH-Px, hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. GSH-Px (glutasyon: H₂O₂ Oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9)' ın molekül ağırlığı yaklaşık

olarak 85.000 Dalton'dur. Tetramerik, 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler (88).



H₂O₂ redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür.



Hücrelerde GSH-Px enzimlerinin 4 tipi tanımlanmıştır.

- 1- Klasik selenyuma bağımlı GSH-Px
- 2- Fosfolipid hidroperoksid GSH-Px (GSH-Px II)
- 3- Selenyumdan bağımsız tip GSH-Px
- 4- Plazma GSH-Px'i

Klasik selenyuma bağımlı GSH-Px, molekül ağırlığı 23 Kilo Dalton olan 4 özdeş subünit içeren, tetramerik bir proteindir. Bu enzim, hidrojen vericisi olarak glutatyona yüksek oranda spesifiktir. Substrat olarak, hem H₂O₂'i hem de lipid hidroperoksidleri (LOOH) metabolize etmektedir. Sitozolda ve mitokondri matriksinde bulunmaktadır. Karaciğer, akciğer, kalp, böbrek, eritrosit ve beyinde az miktarda da iskelet kasında bulunmaktadır (102,78).

Fosfolipid hidroperoksit GSH-Px, selenyuma bağımlı ikinci bir GSH-Px formu şeklinde tanımlanmaktadır. Klasik GSH-Px'in substratı olmayan fosfatidilkolin hidroperoksit gibi fosfolipid hidroperoksitleri yıkmaktadır (102). Bu izoenzim böbrek epitelial hücreleri ve testislerde yüksek derecede salgılanır (24,47).

Selenyumdan bağımsız GSH-Px sitozolde, küçük miktarlarda mitokondri membranında ve endoplazmik retikulumda bulunmaktadır. Sitozolik selenyumdan bağımsız GSH-Px, 48-58 Kilo Dalton molekül ağırlığına sahip 2 subünitten oluşmakta, buna rağmen mitokondrial tipi 15 Kilo Dalton molekül ağırlığına sahiptir. Selenyumdan bağımsız GSH-Px substrat olarak organik hidroperoksitleri kullanmaktadır (102,148).

Plazma GSH-Px'inin fizyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ancak çeşitli dokularda bulunması plazmadaki oksidantları toplayıcı görevine ek olarak, lokal ekstrasellüler koruma sağlamada rolü olabileceğini düşündürmektedir (75).

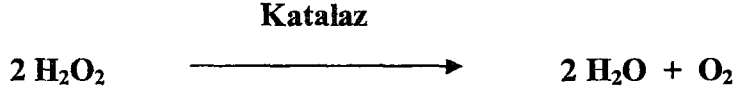
GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidantlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. GSH-Px aktivitesi düşük olan makrofajlarda zimosanla başlatılan solunum patlamasını takiben, H_2O_2 salınımının arttığı gösterilmiştir. Eritrositlerde de GSH-Px oksidant strese karşı en etkili antioksidantdır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, H_2O_2 'in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (102,148).

GSH-Px, katalaz ile substrat olarak H_2O_2 'i paylaşmasına rağmen, tek başına lipid ve diğer organik hidroperoksitler ile etkili bir şekilde reaksiyona girebilir, oksidant stresin düşük seviyelerine karşı korunmanın önemli bir kaynağı olabilir (24,47).

2.9.1.2. Katalaz

Katalaz; (H_2O_2 : H_2O_2 oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi, H_2O_2 'i oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksidaz aktivitesine sahip oluşuna ek olarak bu enzim bir molekül H_2O_2 'i elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidant veya elektron alıcısı olarak

kullanabilir. Peroksizomlarda lokalizedir. Katalazın peroksizomlarda bulunması ve H_2O_2 için yüksek K_m 'e sahip olması GSH-Px'e oranla sınırlı antioksidant fonksiyonuna sahip olması sonucunu doğurur. Buna rağmen katalazın NADPH'ın sınırlı olduğu veya H_2O_2 seviyelerinin kısmen yüksek olduğu durumlarda büyük önemi vardır (102).



Dokulardaki katalaz aktivitesi çok büyük değişiklikler göstermektedir. Karaciğer, böbrek ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye, beyin, kalp, akciğer ve bağ dokusunda ise daha düşük aktiviteye sahiptir (1). Dokularda başlıca mitokondri ve peroksizomlarda olmak üzere partiküllere bağlı şekilde bulunmaktadır, oysa eritrositlerde çözünebilir durumda mevcuttur. Asetaldehit, etanol gibi hidrojen veren substratların oksidasyonunda da rol almaktadır (peroksidatif etki) (75,76).

Katalazın indirgeyici aktivitesi H_2O_2 ve metil, etil hidroperoksidleri gibi küçük moleküllere karşıdır, büyük moleküllü lipid hidroperoksidlerine ise etki etmez. Birçok hastalıkta örneğin kanser, Down sendromu ve anemide serumda katalaz aktivitesinin değiştiği bildirilmiştir (75,76).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

3.1.1. Hayvan Materyalleri

Araştırma materyallerini, Elazığ Elet Tesislerine getirilerek klinik ve postmortem muayene sonrası sağlıklı ve fasciolasis teşhisi konulan koyunlardan (erkek- dişi) alınan ortalama 120 adet kan ve karaciğer doku örnekleri oluşturmaktadır.

3.1.1.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

Kan örnekleri kesim sırasında, EDTA'lı, heparinli, oksalatlı ve antikoagülansız olmak üzere dört farklı deney tüpünde toplanmış, en kısa zamanda laboratuvara getirilip analizler için hazırlanmışlardır. EDTA'lı, heparinli ve oksalatlı kanlar santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrılarak hemen analizlere tabii tutulmuştur.

Kanın Arginaz Tayini İçin Hazırlanması

Arginaz enziminin tayini için 0.05 ml oksalat / ml hesabı yapılarak deney tüplerine kan örnekleri alınmıştır. Kan örneklerinin orijinal hacmini belirlemek amacıyla cam tüplerin etrafı çizilmiştir. Daha sonra kanlar santrifüj edilerek plazmaları uzaklaştırılmış ve kalan peletler 3 defa serum fizyolojik ile yıkanmıştır. Yıkanmış eritrositler 4 mM $MnCl_2$ ile orijinal hacimlerine tamamlanarak, bir gece +4 °C'de bekletilmiş ve eritrositlerin hemoliz olmaları sağlanmıştır. Hemolizatlarda arginaz aktivitesi ve hemoglobin tayinleri yapılmıştır.

Kan Örneklerinin Lipid Peroksidasyonu ve Nitrit Tayini için Hazırlanması

Lipid peroksidasyonu için alınan heparinli kan örnekleri santrifüj edilerek plazmaları alınmış ve plazmada malondialdehid (MDA) düzeylerine bakılmıştır.

Antikoagülansız olarak alınan kan örnekleri santrifüj edilerek serumları ayrılmış ve bu serumlar deproteinize edilerek nitrit tayini yapılmak üzere derin dondurucuda bekletilmiştir.

Kanın Glutasyon Peroksidaz Tayini İçin Hazırlanması

GSH-Px tayininde 1,5-2 mg EDTA / ml kan hesabıyla tüplere örnekler alınmıştır. Hemolizat tam kanın saf su ile 1:20 oranında sulandırılması ile elde edilmiş ve bu hemolizatta hemoglobin tayini ve GSH-Px tayini yapılmıştır.

Kanın Katalaz Tayini İçin Hazırlanması

Plazması ayrılan heparinli kan örnekleri, serum fizyolojik ile üç kez yıkandıktan sonra, eritrositler 1:5 oranında distile su ile sulandırılarak hemoglobin tayini yapılmıştır. Daha sonra dilüe edilmiş bu kan örnekleri 1:100 oranında fosfat tamponuyla tekrar dilüe edilmiş ve hazırlanmış bu hemolizatlarda katalaz tayini yapılmıştır.

3.1.1.2. Doku Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

Kesimden hemen sonra alınan karaciğer örnekleri serum fizyolojik içerisine koyularak en kısa sürede laboratuvara getirilmiş ve katalaz, GSH-Px, Arginaz, Nitrit, MDA tayinleri için gerekli hazırlıklara tabii tutulmuştur.

Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Arginaz Aktivite Tayini İçin

Karaciğer doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulup 1 g olarak tartılmış ve 4 mM'lık $MnCl_2$ ile 1/10 oranında (w/v) sulandırılmıştır. Sulandırılan bu materyaller, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 50 ml'lik polipropilen tüplerde, soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 15 000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak protein ve enzim tayinleri yapılmıştır.

Total Nitrit Tayini İçin

Karaciğer doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında süzildükten sonra 1 g olarak tartılıp 1:3 oranında fosfat tamponu (70 mM, pH 7.5) ile sulandırılarak Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar $ZnSO_4$ (82 mM) ve NaOH (55 mM) ile deproteinize edilerek, 15 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant kısmı alınarak total nitrit tayini yapılmıştır.

Lipid Peroksidasyon Tayini İçin

Karaciğer örnekleri 1'er g tartılarak iki süzgeç kağıdı arasında suyu alındıktan sonra % 1.15'lik KCl içinde 1:10 oranında (ağırlık/hacim) sulandırılarak, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilmiş, daha sonra elde edilen homojenatlarda MDA ölçümü yapılmıştır.

Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini İçin

Karaciğer örnekleri 1'er g tartılarak, iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra Tris tamponu (50 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.6) içinde 1:10 oranında (ağırlık / hacim) sulandırılmıştır. Sulandırılan bu materyal, kırılmış buz içerisinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilerek, elde edilen homojenatlar 50 ml'lik propilen tüplerde, soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 20.000 rpm'de 58 dakika santrifügasyon işlemine tabii tutularak süpernatantlar alınmış ve alınan bu süpernatantlarda GSH-PX enzimi ve protein tayini yapılmıştır.

Katalaz Aktivite Tayini İçin

Labaratuvara getirilen doku örnekleri 0.5 g tartılarak iki süzgeç kağıdı arasında suyu alındıktan sonra 4.5 ml %1'lik Triton X -100 ile 2 dakika kadar Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörde homojenize edilmiş, elde edilen homojenatlar 50 ml'lik propilen tüplerde, soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) 3200 rpm'de +4 °C'de 10 dakika kadar santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatantlar alınarak katalaz ve protein tayini yapılmıştır.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

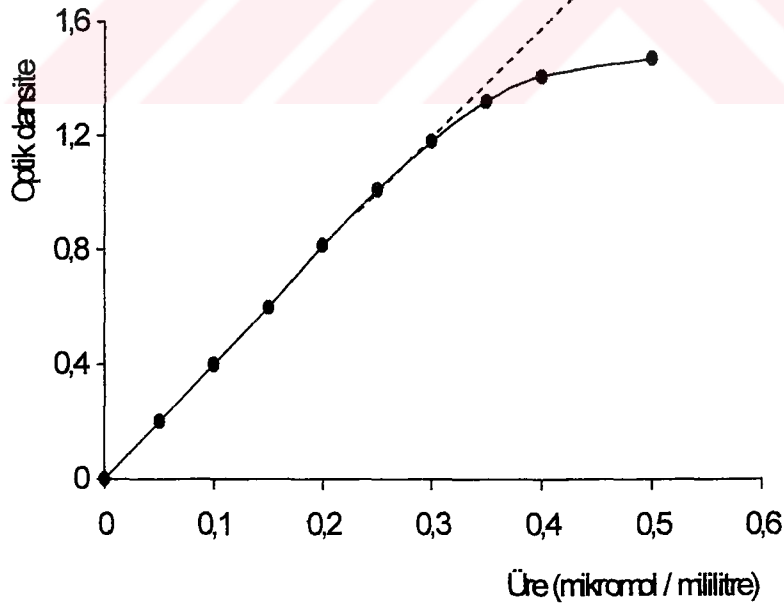
Araştırmamızda kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

3.2. METOTLAR

3.2.1. Arginaz Aktivitesinin Ölçülmesi

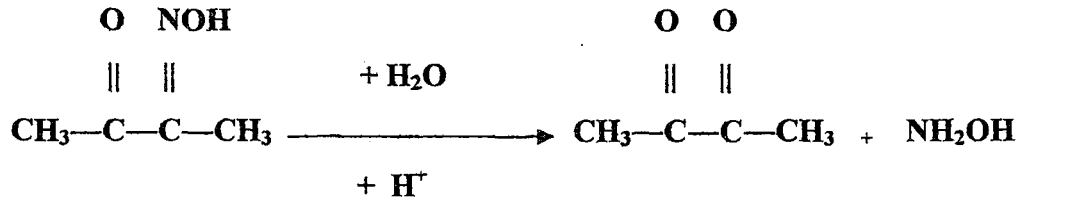
Arginaz enzim aktivitesini ölçmek için bir çok metot geliştirilmiştir. Bu metotlar, arginin-arginaz reaksiyonu sonucu; ya azalan arginin konsantrasyonunun (3) ya da artan ornitin (18), veya üre konsantrasyonlarının (33,141) ölçümüne dayanmaktadır.

Eritrosit ve doku arginaz aktivitesi ölçümü için Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim-Üre (TDMU) metodu kullanılmıştır (33). TDMU metodu; arginin-arginaz reaksiyonu sonucu oluşan ürenin, kolorimetrik olarak ölçümünü sağlayan bir metot olup, Schimke metodundan (141) daha basit ve daha hassastır. Bu metodun tek dezavantajı, üre miktarı $0.3 \mu\text{mol} / \text{ml}$ 'yi aştığı zaman Beer-Lambert (117) kanununa uymamasıdır (Şekil 10).



Şekil 10 : Üre Kalibrasyon Eğrisi

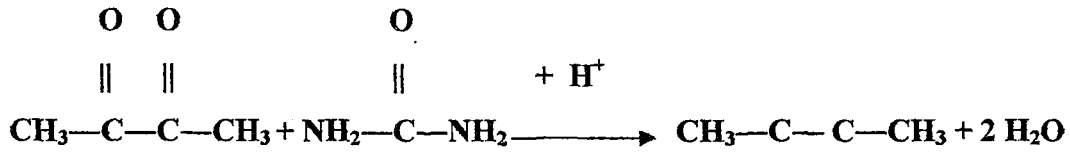
TDMU Metodunun Prensibi



Diasetil Monoksim

Diasetil

Hidroksilamin



Diasetil

Üre



Diasetilmonoksim, üre ile direkt olarak reaksiyona girmez. İlk önce asit ortamda ısıнын etkisi ile diasetil ve hidroksilamine hidrolize olur. Diasetil, asit solüsyonda üre ile kondanse olarak sarı renkli bileşik olan diazini meydana getirir. Oluşan sarı rengi stabilize etmek için thiosemikarbazid ve Fe^{+2} iyonları kullanılır (56).

Metodun Ayırıcıları

1- Renk Ayırıcı (Diasetilmonoksim Tiosemikarbazide DAM-TSC): Bu karışım 0.0036 M TSC (91.14 g/mol) ve 0.0617 M DAM (101.1 g/mol) içermektedir. 6.23 g DAM ve 0.328 g TSC bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile litreye tamamlanır. Renk ayırıcı, koyu renkli reaktif şişelerinde ve oda ısısında uzun süre dayanıklıdır.

2-Asit Ayıracı:

a- 0.12 M FeCl₃ / % 56.7 H₃PO₄: 3.24 g FeCl₃ (270.39 g/mol) bir miktar distile suda çözüldükten sonra üzerine 66.7 ml % 85'lik H₃PO₄ (Fosforik asit) ilave edilir ve daha sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu ayıraç oda ısısında saklanır.

b- Yukarıdaki a çözeltisinden 1.0 ml alınır ve 999 ml % 20 (v/v)'lik H₂SO₄ (sülfürik asit) ilave edilir. Deney aşamasında asit karışımı olarak bu çözelti kullanılır. Oda ısısında saklanır.

3- 4 mM MnCl₂ Çözeltisi: 0.39 g MnCl₂ · 4 H₂O (197.91 g/mol) bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 500 ml'ye tamamlanır ve buzdolabında +4 °C'de saklanır.

4-Substrat Çözeltisi (66.6 mM L-arginin): 1.39 g L-arginin monohidroklorit (210.6 g/mol) 80-90 ml distile suda çözülür ve pH'sı 10'a ayarlandıktan sonra distile su ile 100 ml'e tamamlanır. Buzdolabında +4 °C'de saklanır.

5-Tampon Çözeltisi (75 mM NaHCO₃ / Na₂CO₃):

a- 0.79 g Na₂CO₃ (105.99 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 100 ml'ye tamamlanır.

b- 0.63 g NaHCO₃ (84.01 g/mol) bir miktar distile suda çözülür ve 100 ml'ye tamamlanır.

Tampon Çözeltisi; 75 mM NaHCO₃ çözeltisi bir behere konur ve 75 mM Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek, pH 10'a getirilir. Bu tampon +4 °C'de saklanır.

6-Üre Standartı (0.1 µmol üre/ml): 3 mg üre (60.06 g/mol) 100 ml 0.016 M benzoik asit içinde çözülür. Stok olarak kullanılan bu çözelti, deney sırasında 1/5 oranında sulandırılarak 0.1 µmol üre / ml (0.6 mg/dl)'lik üre standartı elde edilir. Üre stok standart çözeltisi +4 °C'de buzdolabında saklanır.

Deneyin Yapılışı

Enzim aktivitesi tayini amacıyla iki deney düzeneği kurulmuştur. Birinci düzeneğe; numaralanmış deney tüpleri, ikinci düzeneğe; kör (blank), standart ve sıfır zaman (zero time blank) tüpleri konulmuştur. İlk düzenekteki deney tüpleri üçlü, ikinci düzenekteki deney tüpleri ikili hazırlanmıştır. Sıfır zaman tüplerini hazırlamaktaki amacımız, enzim kaynağındaki endojen ürenin arginaz aktivitesinin hesaplanması esnasında göz ardı edilebilmesidir.

Deney ve sıfır zaman tüplerine oda ısısına gelmiş 66.6 mM L-arginin monohidrokloritten (final konsantrasyon 20 mM) 0.3 ml ve 75 mM karbonat tamponundan 0.4 ml (final konsantrasyon 30 mM) konulur. Standart tüpüne, üre stok standart çözeltisi 1 / 5 oranında (0.2 ml üre stok standartı + 0.8 ml distile su) sulandırılarak 1.0 ml (0.1 µmol üre / ml), kör tüpüne ise 1.0 ml distile su ilave edilir.

Homojenizasyon ile elde edilen karaciğer doku homojenatlarından kontroller deney aşamasında $MnCl_2$ ile 1/ 700, fasciolasisliler 1/ 300 oranında sulandırıldı ($MnCl_2$ 'nin final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde) ve enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Eritrositler önceden anlatıldığı şekilde hazırlanarak, $MnCl_2$ ile dilüe edilerek enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Enzim kaynakları, 65 °C'deki sıcak su banyosunda 15 dakika preinkübasyona bırakılır. Daha önceden hazırlanmış deney düzeneğini oluşturacak olan tüplere preinkübe edilmiş enzim kaynağından 0.3'er ml ilave edilerek tüpler hemen inkübasyon için 37 °C'deki sallantılı metabolik su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakılır.

Oda ısısında bekletilen sıfır zaman tüplerine 0.3 ml enzim kaynağı ilave edilip hiç bekletilmeden bu tüplere reaksiyonu durdurmak için hemen 3 ml asit ayırıcı ilave edilir. Ayrıca standart ve kör tüplerine de 3 ml asit ayırıcı eklenir.

Metabolik su banyosunda 10 dakikalık inkübasyon işlemi sonunda, vida kapaklı tüplerin (enzimatik reaksiyonun geliştiği) üzerine de acilen reaksiyonu durdurmak amacı ile 3 ml asit ayırıcı konulur.

Her iki deney setindeki tüm tüplere, 2 ml renk ayırıcı ilave edilip, tüplerin kapakları kapatılarak vorteks mikserde iyice karıştırılır.

Örnek, sıfır zaman, standart ve kör tüplerinin hepsi kaynar su banyosunda 10 dakika tutularak reaksiyonun tamamlanması sağlanır. 10 dakika sonunda kaynar su banyosundan alınan tüpler musluk suyu altında tutularak soğutulur.

Bu süre sonunda standart, örnek ve sıfır zaman tüplerinin absorbansları 520 nm'de Shimadzu UV. Vis. spektrofotometrede köre karşı okunur.

Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Hesaplanması

Her örnek deney tüpünün absorbansından, kendisine ait sıfır zaman tüpünün absorbansının farkı alınarak net absorbans elde edilir.

Örneğe ait protein değerleri Lowry yöntemi ile ölçülüp, sonuçlar mg/ml olarak hesaplanır.

Enzim kaynağının preinkübasyon ve inkübasyon aşamasında sulandırılma oranları, standart absorbansı ve standart konsantrasyon değerlerinden faydalanılarak arginaz aktivitesi aşağıdaki şekilde hesaplanır.

Faktör Hesaplanması

$$\text{Faktör} = \frac{(0.1 \mu\text{mol üre} / \text{ml}) \times (\text{Sulandırma Oranı} \times 3.33 \times 6)}{0.4}$$

Sağlıklı Karaciğer Doku Arginazı için Faktör = 3496,5

Fasciolasisli Karaciğer Doku Arginazı için Faktör = 1498,5

Sağlıklı ve Fasciolasisli Eritrosit Hemolizatları için Faktör = 1498,5

Sulandırma Oranı: Sağlıklı koyun karaciğer süpernatantları 1/700 ve fasciolasisli koyun karaciğer süpernatantları 1/300 oranlarında sulandırılırken, sağlıklı ve fasciolasisli koyun hemolizatları ise 1/300 oranında MnCl_2 ile sulandırılmıştır.

3.33: 1 ml'lik inkubasyon ortamındaki enzim kaynağının sulandırılma oranıdır.

6 : 10 dakikalık inkubasyonun 1 saatteki değeridir (60 dakika / 10 dakika).

0.4: 0.1 µmol üre / ml içeren, standart tüpünün absorbansı ise 0.4'dür.

Örneğe ait absorbans farkı değeri, faktör ile çarpılarak, µmol üre / ml süpernatant / saat cinsinden enzim aktivitesi elde edildi.

Enzim aktivitesini spesifik aktivite cinsinden bulmak için; enzim aktivitesi, süpernatantın protein (mg / ml), hemolizatın hemoglobin (g / dl) değerine bölündü.

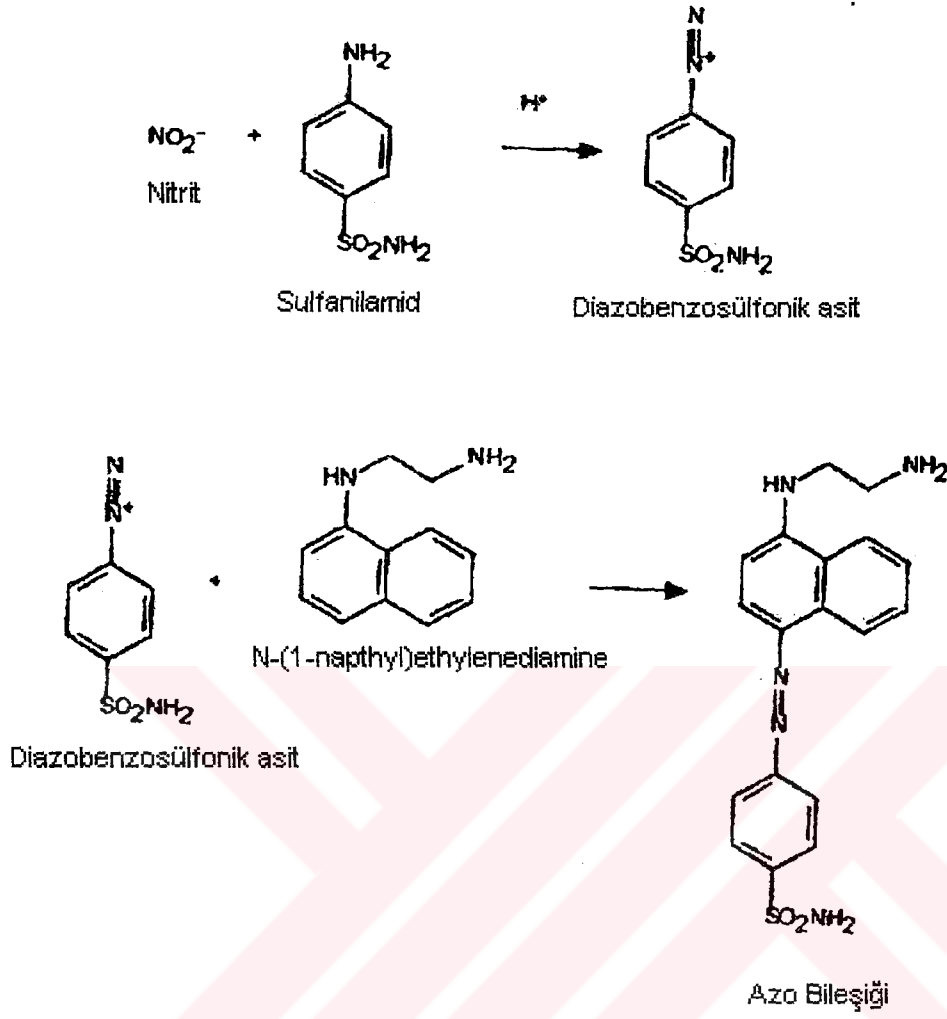
Bu çalışmada **spesifik aktivite** ; 1 saatte, 37 °C'de, L-argininden 1 µmol üre oluşturan enzim aktivitesinin doku için mg protein, eritrosit için g hemoglobin cinsinden ifadesi olarak tarif edildi.

3.2.2. Total Nitrit (Nitrit + Nitrat) Ölçüm Yöntemi

Nitrat + nitrit konsantrasyonunun belirlenmesinde, nitratlar nitrat redüktaz enzimi ile nitrite redüklenmekte ve toplam nitrit ölçümü yapılmaktadır. Nitrit ölçümü Griess (89) reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik bir ölçümdür. Griess reaktifinde bulunan H₃PO₄ ile nitrit reaksiyona girer ve nitroz asit meydana gelir. Nitroz asit sulfanilamid ile reaksiyona girerek diazobenzosülfonik asiti meydana getirir. Bu da ortamda bulunan naftiletilediaminle koyu pembe renkli bir bileşik (azo bileşiği) verir, bu bileşiğin renk şiddeti spektrofotometrede ölçülmektedir.

Nitrat Redüktaz





Metodun Ayıracıları

82 mM ZnSO₄ Çözeltisi: 2.35 g ZnSO₄ . 7 H₂O 100 ml distile suda çözülür.

55 mM NaOH Çözeltisi: 0.22 g NaOH 100 ml distile suda çözülür.

70 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH=7.5)

2000 µM FAD Çözeltisi : 1 mg FAD 600 µl'ye tamamlanır.

2000 μ M NADPH Çözeltisi : 1 mg NADPH 600 μ l'ye tamamlanır.

10 Ü/ ml Nitrat Redüktaz Çözeltisi: 10 ünitelik Nitrat Redüktaz 1 ml'ye tamamlanır.

Laktik Dehidrogenaz Çözeltisi: (10.000 Ü/10 mg)

1200 μ M Pirüvat Çözeltisi: 7 mg pirüvat 80 ml'ye tamamlanır.

10 mM Stok Nitrit çözeltisi: 69 mg Sodyum nitrit (NaNO_2) tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltinin final konsantrasyonu 10 mM'dır ve +4° C'de 1 yıldan fazla dayanır.

1 mM Çalışma Stok Nitrit Çözeltisi: 10 mM'lık stok nitrit çözeltisi 1/10 oranında dilüe edilir (0.5 ml stok nitrit çözeltisi + 4.5 ml distile su). Bu çözeltinin son konsantrasyonu 1 mM (1000 μ M)'dir. +4° C'de 1 yıldan fazla dayanır. Bu stoklardan uygun dilüsyonlarla 0, 5, 25, 50, 75, 100 μ M'lık standart seriler hazırlanarak deney prosedürü aynen uygulanır.

Griess Reaktifi: a ve b çözeltileri 1/1 oranında karıştırılır.

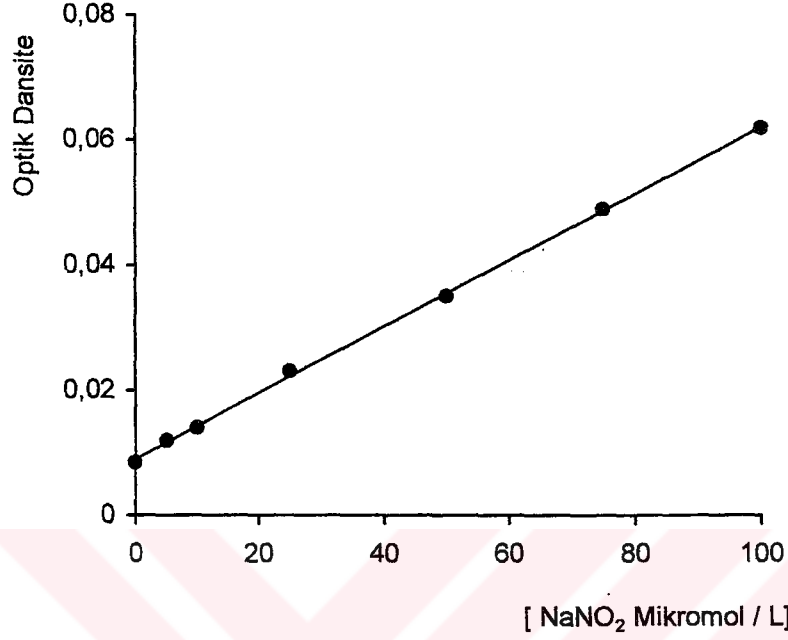
Griess A: (% 1'lik p-aminobenzene sulfamide (p-abs) çözeltisi): 1 g p-abs tartılarak %5'lik fosforik asit ile 100 ml'ye tamamlanır.

Griess B: (% 0.1'lik α -naphthylethylene diamine-HCl (α -ned) çözeltisi): 100 mg α -ned tartılır ve 100 ml'ye tamamlanır.

Örnekler: Serum ve doku örnekleri 82 mM ZnSO_4 çözeltisi ve 55 mM NaOH çözeltisi ile deproteinize edildikten sonra 15 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar alınır.

Metot:	Örnek (µl)	Standart (µl)	Kör(µl)
Süpernatant	200	—	—
Standart	—	200	—
Nitrat Redüktaz (10 U/ml)	8	—	—
Fosfat Tamponu (70 mM, pH:7.5)	765	—	—
NADPH Çözeltisi (2000 µM)	25	—	—
FAD Çözeltisi (2000 µM)	2	—	—
Distile Su	—	1000	1000
Tüpler karıştırılarak 37 °C'de 120 dakika inkübasyon yapılır.			
Pirüvat Çözeltisi (1200 µM)	199	—	—
LDH Çözeltisi (10.000 U/10 mg)	0.5	—	—
Tüpler karıştırılarak 37 °C'de 30 dakika inkübasyon yapılır.			
Griess Ayıracı	1200	1200	—

Tüpler karıştırılarak 30 dakika oda ısısında bekletilir. Spektrofotometrede distile suya karşı 545 nm dalga boyunda okunur. Bulunan sonuçlar nitrit standart eğrisinden hesaplanır.



Şekil 11 : Nitrit Kalibrasyon Eğrisi

3.2.3. Plazmada Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Tayini

Prensip: Plazmada lipid peroksit ölçümü Satoh (140) ve Yagi (168)'den modifiye edilen yonteme göre spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbitürik asit (TBA) ile ölçülebilen MDA meydana gelir. Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek pembe renkli bir kompleks oluşturur. Oluşan bu pembe renk 532 nm'de okunur.

MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir.

Metodun Ayıraçları

1-0,084 N (N/12) Sülfürik asit (H_2SO_4): 0.23 ml H_2SO_4 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

2- % 10 Fosfotungustik asit (PTA): 10 g PTA 100 ml distile suda çözülür.

3-Tiyobarbitürik asit (TBA) ayıracı: 0.67 g TBA 50 ml distile suda çözülür ve 50 ml glasiyel asetik asit eklenerek 100 ml'ye tamamlanır. Ayıraç günlük hazırlanır.

4-n-Bütanol

5-Standart: 1,1,3,3-Tetraetoksiopropan (TEP)

Metot:

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Plazma	—	—	0.3
N/12 H_2SO_4	—	—	2.4
% 10 PTA	—	—	0.3

iyice karıştırılır. Oda ısısında 5 dakika beklenir. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Presipitat kullanılır.

Standart	—	1.0	—
Distile su	4.0	3.0	4.0
TBA ayıracı	1.0	1.0	1.0

İyice karıştırılır. Üstüne cam top konulan tüpler, kaynar suda 60 dakika tutulur. Soğuduktan sonra,

n-Bütanol	3.0	3.0	3.0
-----------	-----	-----	-----

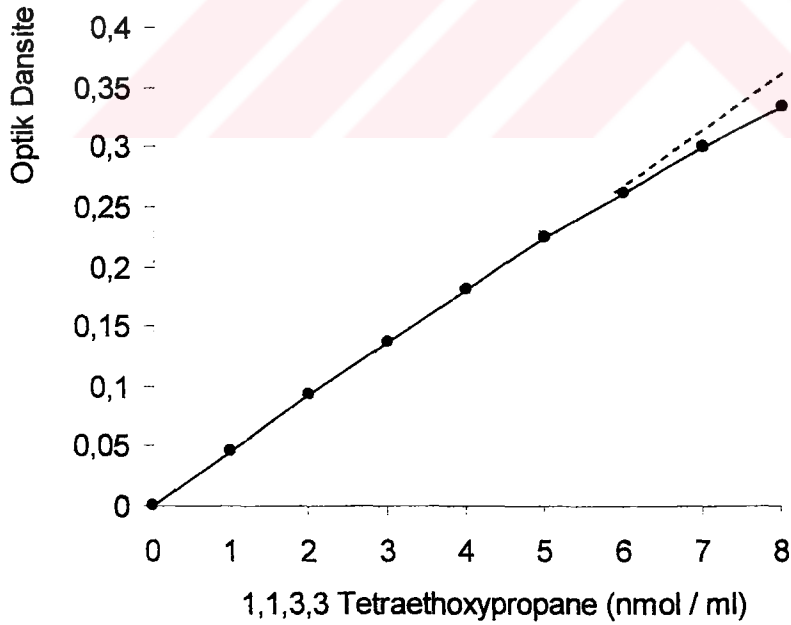
tekrar vorteksle karıştırılır. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üst faz absorbansı 532 nm'de okunur.

Plazmada Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Hesaplanması

$$\text{Plazma MDA (nmol / ml Plazma)} = 4.1 \times \frac{\text{Örneğin Optik Dansitesi}}{\text{Standartın Optik Dansitesi}} \times \frac{1}{0.3}$$

4.1: Standart katsayısı

0.3: Örneğin hacmi



Şekil 12 :Plazma Lipid Peroksidasyonu Standart Eğrisi

3.2.4. Dokuda Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Tayini

Dokuda MDA ölçümü, Okhawa ve ark. (107)'lerinin geliştirdikleri yöntemine göre yapılmıştır.

Metodun Ayıraçları

1-% 8.1 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 8.1 g SDS 100 ml distile suda çözülür.

2-%20 Glasiyel Asetik Asit (CH_3COOH); NaOH ile pH 3.5'e ayarlanır.

3-% 0.8 TBA: 0.8 g TBA 50 ml distile suda çözülür ve 50 ml glasiyel asetik asit eklenerek 100 ml'ye tamamlanır. Ayıraç günlük hazırlanır.

4- n-Bütanol / Piridin Karışımı; 15/1 oranında (hacim/hacim) hazırlanır.

Metot:

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Homojenat (% 10)	—	—	0.1
Standart	—	0.1	—
% 8.1 SDS	0.2	0.2	0.2
% 20 CH_3COOH	1.5	1.5	1.5
% 0.8 TBA	1.5	1.5	1.5
Distile Su	0.8	0.7	0.7

Karıştırılır. Üstüne cam top konulan tüpler, 95 °C' deki su banyosunda, 60 dakika bekletilir. 60 dakikanın sonunda soğutulduktan sonra,

Distile su	1.0	1.0	1.0
n-Bütanol / Piridin	5.0	5.0	5.0

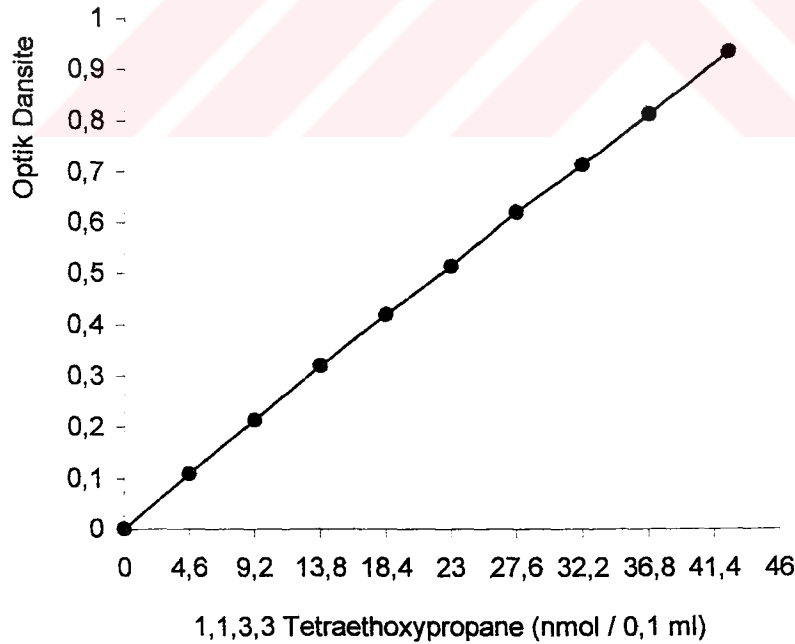
Vorteksle karıştırılır. 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek üst faz absorbansı 532 nm’de okunur.

Dokuda Lipid Peroksidasyon Düzeyinin Hesaplanması

$$\text{Doku MDA} = 4.1 \times \frac{\text{Örneğin Optik Dansitesi}}{\text{Standartın Optik Dansitesi}}$$

(nmol / g yaş doku)

4.1: Standart katsayısı

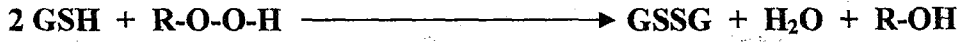


Şekil 13 : Doku Lipid Peroksidasyonu Standart Eğrisi

3.2.5. GSH-Px Aktivitesinin Tayini

Prensip: Eritrosit ve doku GSH-Px aktivitesi ölçümü için Beutler (13) metodu kullanılmıştır. GSH-Px, H₂O₂ vasıtasıyla redükte glutatyonun (GSH), okside glutatyon (GSSG) oksidasyonunu katalize eder.

Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)



Burada R-O-O-H bir hidroperoksit olup, t-bütil hidroperoksit (t-BOOH) enzim analizi için en uygun substrattır. GSSG'nin oluşum oranı, glutatyon redüktaz (GR) reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür.

Glutatyon Redüktaz (GR)



H₂O₂ olarak t-BOOH' in bulunduğu ortamda GSH-Px' in oluşturduğu GSSG, GR ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'in NADP⁺'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak okunmasıyla tayin edilir.

Metodun Ayıraçları

1-Tris Tamponu (pH:8) : 1 M Tris- HCl, 5 mM EDTA

2-0.1 M GSH : 0.3 g 10 ml distile suda çözülür. GSH solüsyonları taze hazırlanmış olmalıdır.

3-10 Ü/ml Glutatyon Redüktaz: ml'de 10 ünite olacak şekilde distile suyla hazırlanır.

4-NADPH (2 mM): 0,05 g 30 ml distile suda çözülür.

5- 7 mM t-BOOH; (% 70'lik t-BOOH'in yaklaşık 1:1000 sulandırılmasından elde edilmiştir). Reaksiyon oranı, güçlü bir şekilde t-BOOH konsantrasyonuna bağlıdır. 7 mM t-BOOH günlük olarak hazırlanmalıdır.

Metot:

	<u>Kör (µl)</u>	<u>Örnek (µl)</u>
Tris Tampon (pH: 8) (1 M Tris- HCl, 5 mM EDTA)	100	100
0.1 M GSH	20	20
10 Ü/ml Glutatyon Redüktaz	100	100
2 mM NADPH	100	100
Hemolizat (yada homojenat)	10	10
Distile su	670	660

37⁰ C' de 10 dakika preinkübe edilir.

7 mM t-BOOH	—	10
--------------------	---	----

Sistemin optik dansitesindeki azalma 340 nm'de 0. ve 2.5 . dk'da kaydedilir.

Eritrositte GSH-Px Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

$$U / g \text{ Hb} = \frac{\frac{OD_2 - OD_1}{t} \times \frac{1}{6.22 \times 0.01}}{\text{Hb (g / ml)}}$$

Dokuda GSH-Px Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

$$U / g \text{ protein} = \frac{\frac{OD_2 - OD_1}{t} \times \frac{1}{6.22 \times 0.01}}{\text{protein (g / ml)}}$$

OD₂ : 2.5 dakika sonundaki absorbans

OD₁ : 0. dakikadaki absorbans

t : 2.5 dakika

1 : Küvetteki toplam hacim

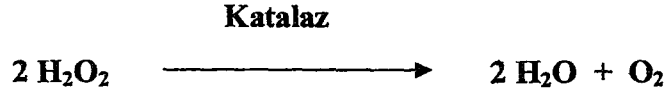
6,22 : 1 µmol NADPH'in verdiği OD değeri

0,01 : Hemolizatın hacmi

3.2.6. Katalaz Aktivitesinin Tayini

Enzim aktivite tayinlerinde ya azalan substrat miktarı ya da meydana gelen ürün miktarı ölçülerek, enzimlerin aktiviteleri saptanmaktadır. Eritrosit ve doku katalaz aktivitesini ölçmek için Aebi (1) metodu kullanılmıştır.

Prensip: Katalaz aşağıdaki tepkimeye göre H₂O₂'in yıkımını katalize eder.



H_2O_2 'in Katalaz tarafından yıkım hızı, H_2O_2 'in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülür.

Metodun Ayıraçları

50 mM Fosfat Tamponu (pH: 7.0)

30 mM Hidrojen Peroksit : 0.34 ml %30'luk H_2O_2 fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

Metot:

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Fosfat Tamponu	1	—
Hidrojen Peroksit	—	1
Hemolizat	2	2

240 nm'de kör ile sıfır ayarı yapıldıktan sonra 30 saniye içindeki absorbans farkı ölçülmek suretiyle katalaz aktivitesi hesaplanır.

Eritrosit ve Karaciğer Katalaz Aktivitesinin Hesaplanması:

$$k = (2.3 / 30) (\log A_1 / A_2) \times \text{dilüsyon}$$

$$\text{Eritrosit için Spesifik Aktivite} = k / \text{g Hb}$$

$$\text{Karaciğer için Spesifik Aktivite} = k / \text{g protein}$$

3.2.7. Biyolojik Sıvılarda Protein Tayini

Homojenatlardaki protein miktarları Lowry (86) yöntemine göre ölçüldü. Alkali bakır tartarat ayıracı peptid bağları ile kompleks yapar.

Prensip olarak; Bakır + protein \longleftrightarrow Bakır-protein basit ilişkisini içerir. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom bakır bağlar. Fenol ayıracı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi renk şekillenir. Bu renk 650 nm'de okunur. Protein konsantrasyonu ile oluşan renk arasında yüksek konsantrasyonlar için lineer bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılarak ölçümler yapıldı.

Metodun Ayıraçları

1-Alkali Bakır Ayıracı: 10 g Na_2CO_3 , 0.1 g Potasyum tartarat ve 0.05 g Bakır Sülfat, 0.5 N NaOH içinde çözülür ve 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.

2-Fenol Ayıracı : 2.0 N Folin-Ciocaltue-Fenol ayıracından 3.75 ml alınır, distile su ile 67.5 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti örnek sayısına göre çalışma anında günlük olarak hazırlanır.

3-Protein Standartı: 50 μg BSA (Sığır Serum Albumin) / ml

4- Okuma sınırlarına getirilmiş (sulandırılmış) örnek

Metot:

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Alkali Bakır Ayıracı	1.0	1.0	1.0
Protein Standart	—	1.0	—

Örnek	—	—	1.0
--------------	---	---	-----

Distile su	1.0	—	—
-------------------	-----	---	---

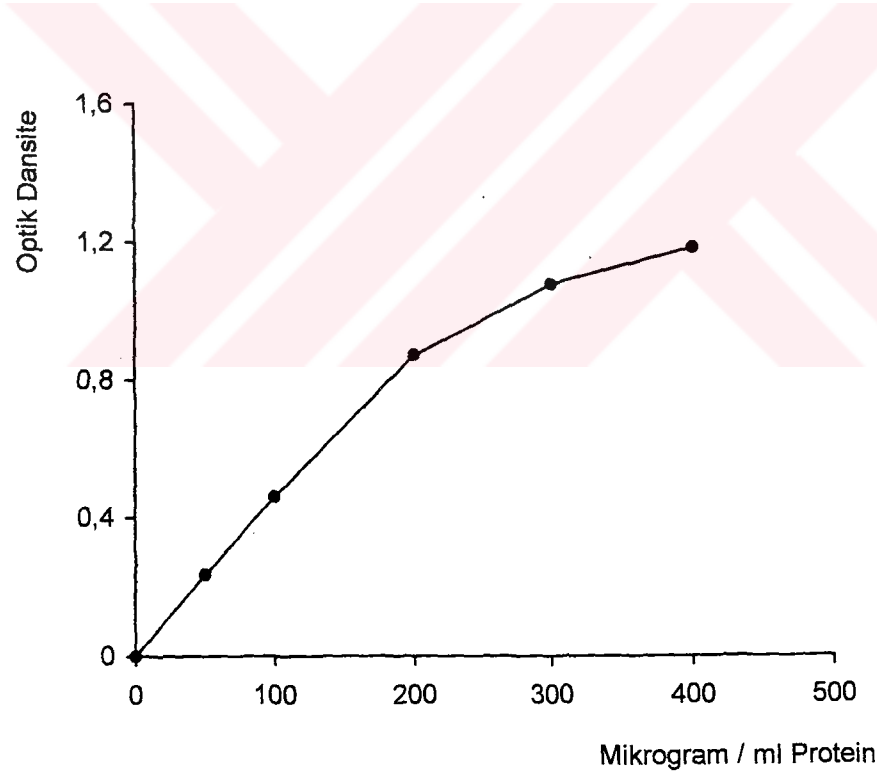
Tüpler iyice karıştırılır ve 10 dakika oda ısısında bekletilir.

Fenol Ayıracı	4.0	4.0	4.0
----------------------	-----	-----	-----

Tüpler hemen vorteks mikserde iyice karıştırılır ve 5 dakika 55 °C'de bekletilir. İnkubasyon sonrası musluk suyu altında hemen soğutulur. Daha sonra 650 nm'de standart ve örnek tüplerinin absorbansı kör tüpüne karşı okunur.

Hesaplama:

$$\mu\text{g protein / ml} = (\text{Örnek Abs. / Std. Abs.}) \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$



Şekil 14 : Protein Standart Eğrisi

3.2.8. Hemoglobin Tayini

Prensip: Siyanomethemoglobin (154) yöntemi ile yapılmıştır. Ferrisiyanür hemoglobindeki Fe^{+2} 'yi oksitleyerek Fe^{+3} 'e çevirir ve hemoglobinin methemoglobine dönüşmesini sağlar. Bunu takiben potasyum siyanid ile stabil bir pigment olan siyanomethemoglobin meydana gelir. Oluşan renk 546 nm'de okunur.

Metodun Ayraçları

1-Drabkin Çözeltisi: 50 mg KCN, 200 mg $K_3Fe(CN)_6$ ve 1 g $NaHCO_3$ tartılarak bir miktar distile suda çözülür ve litreye tamamlanır. Koyu renkli şişede 1 yıl dayanır.

2- Hb Standartı: 18 g liyofilize Hb standartı 100 ml distile suda çözülür. Bu standart 18g/dl Hb içerir.

Metot:

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Drabkin Çözeltisi	5.0	5.0	5.0
Hemoglobin Standartı	—	0.02	—
Hemolizat	—	—	0.02

Tüpler iyice karıştırılır. Oda ısısında 20 dakika bekletilir. 546 nm'de köre karşı diğer tüplerin absorbansları okunur.

Hesaplama: $gr / dl Hb = (örnek\ absorbans / standart\ absorbans) \times 18$

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmadaki istatistiksel analizler, SPSS istatistik proğramı ile yapılmıştır. Deneysel alışmalar sonucu elde edilen veriler, ortalama \pm standart hata olarak gösterilmiştir. Söz konusu parametreler için, kontrol ve fasciolasisli grupların karşılaştırılmalarında Student-t testi kullanılmıştır (26).

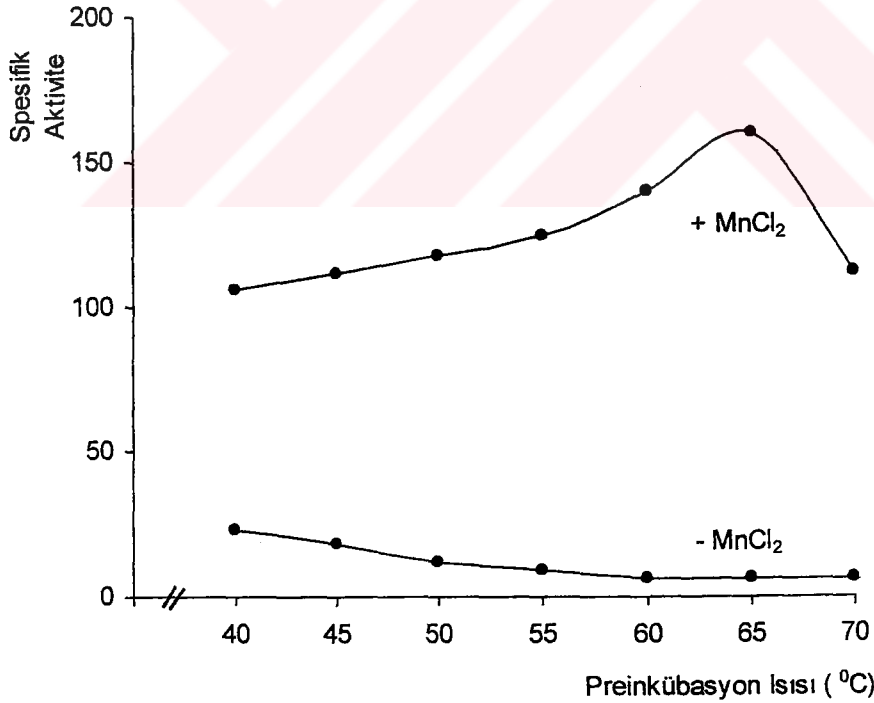


4. BULGULAR

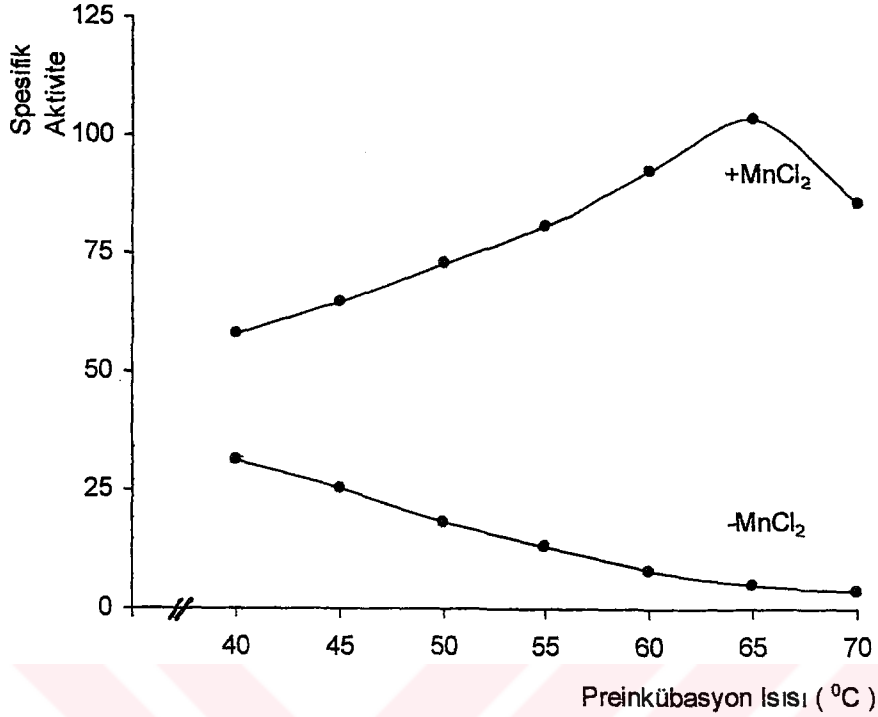
Sağlıklı ve *Fasciola hepatica* Koyun Karaciğer Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri

4.1. Preinkübasyon Isısının Belirlenmesi

Koyun karaciğer doku arginazının preinkübasyon ısısının tespiti ve preinkübasyonun Mn^{+2} katyonlarının varlığına bağlı olup olmadığını saptamak için Mn^{+2} iyonlarının varlığında ve yokluğunda, preinkübasyon ısıları değiştirilerek arginaz enzimi preinkübe edilmiştir. Sonuçta; $MnCl_2$ varlığında preinkübasyon uygulanmasının enzim aktivitesini $MnCl_2$ 'süz preinkübasyona oranla kontrol grubunda (Şekil 15) yaklaşık 27 misli, *F.hepatica* ile enfekte grupta (Şekil 16) ise yaklaşık 21 misli artırdığı saptanmıştır. $MnCl_2$ varlığında enzim aktivasyonu gözlemlendiğinde; 65 °C'ye kadar aktivitenin arttığı, 65 °C'de maximuma ulaştığı, 65 °C'den sonra ise düştüğü saptanmıştır. Bu nedenle sağlıklı ve fasciolasisli koyun karaciğer doku arginazı için en uygun preinkübasyon ısısı 65 °C olarak kabul edilmiştir.



Şekil 15: Sağlıklı Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi

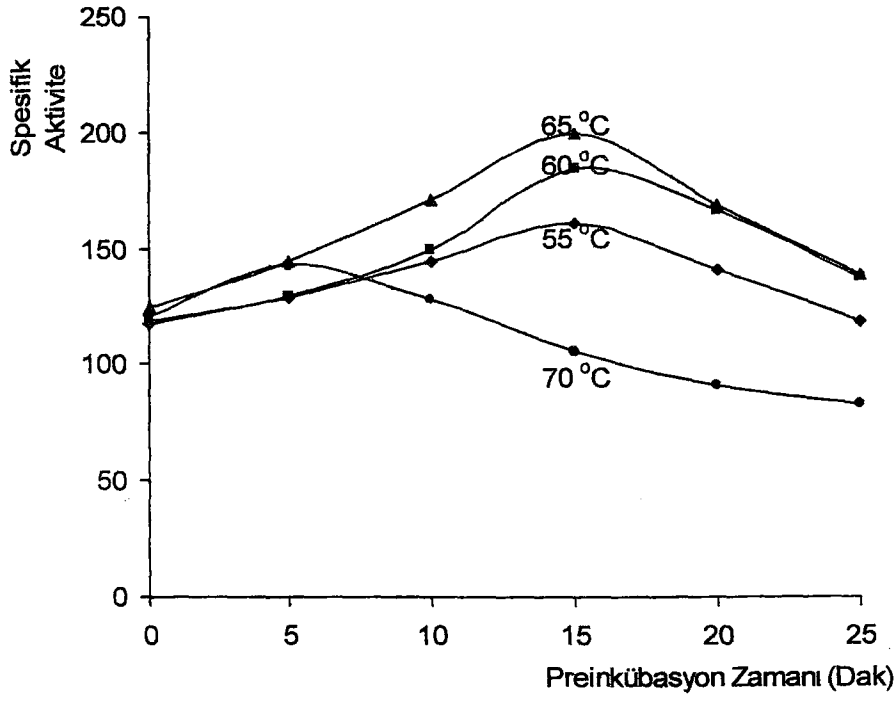


Şekil 16: Fasciola hepaticalı Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Preinkübasyon Isısına Bağlı Olarak Değişimi

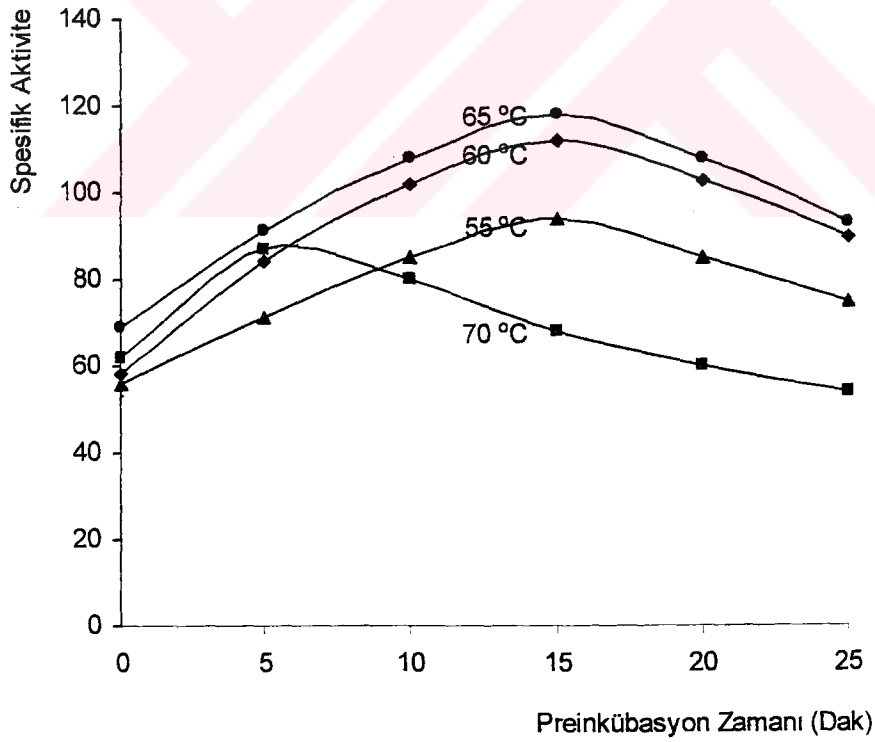
4.2. Preinkübasyon Zamanının Belirlenmesi

Koyun karaciğer doku arginazı için optimal preinkübasyon zamanını tesbit etmek amacıyla enzim, $MnCl_2$ varlığında ve 55, 60, 65, 70 °C'lik preinkübasyon ısılarında değişik sürelerde bekletilmiştir. Enzim aktivitesi, 55, 60, 65 °C'lerde 15. dakikaya kadar artmış, daha sonra başlangıçtaki aktiviteye kadar düşmüştür. 70 °C'de ise 5. dakikaya kadar artış, daha sonra bir düşüş meydana gelmektedir, bu düşüş başlangıçtaki aktivitenin altındadır.

Koyun karaciğer doku arginazı en yüksek aktiviteye 65 °C'de ve 15. dakikada ulaşmaktadır. 65 °C'de 15 dakikalık bir preinkübasyon uygulaması, enzim aktivitesini, preinkübasyon uygulanmamış doku örneklerine oranla sağlıklı dokuda % 51 (Şekil 17), fasciolasisli dokuda (Şekil 18) ise % 57 oranında artırmaktadır. Sağlıklı ve fasciolasisli dokuda optimal preinkübasyon süresi 15 dakika olarak kabul edilmiştir.



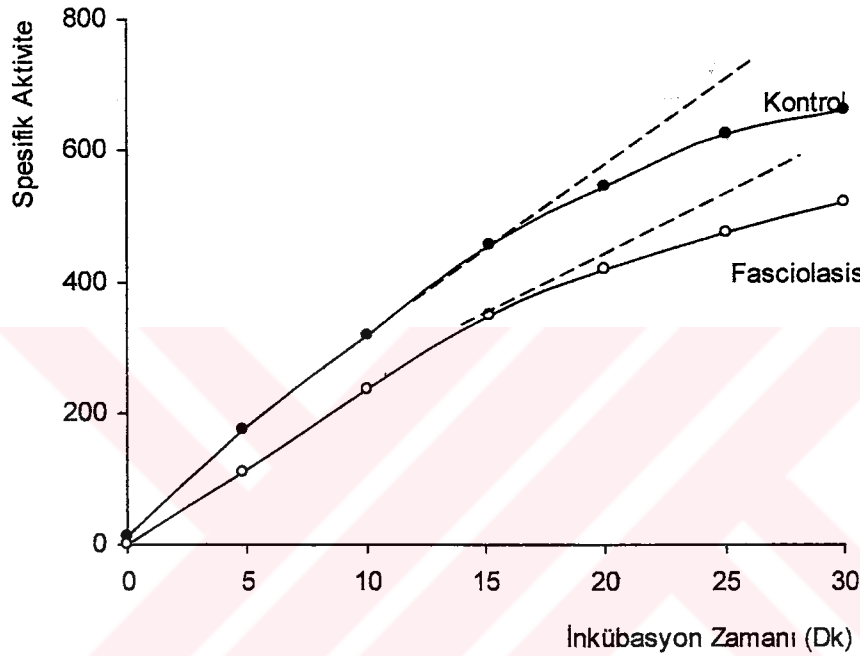
Şekil 17: Farklı Isılarda Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Sağlıklı Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesindeki Değişimler



Şekil 18: Farklı Isılarda Preinkübasyon Zamanına Bağlı Olarak F. hepaticalı Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesindeki Değişimler

4.3. İnkübasyon Zamanının Belirlenmesi

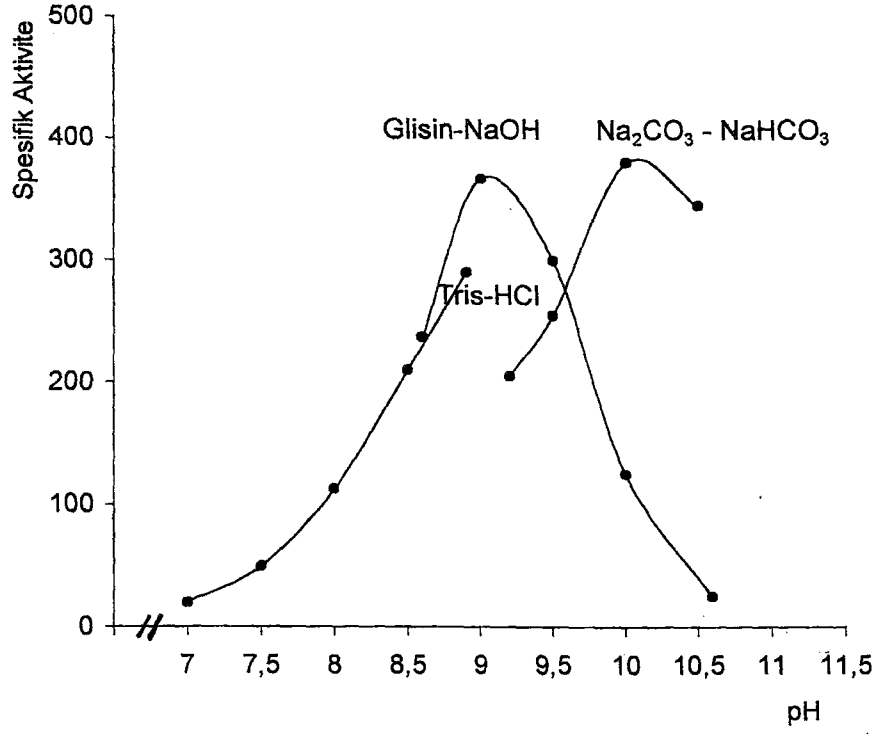
Koyun karaciğer doku arginazı için en uygun inkübasyon süresini saptamak amacıyla $MnCl_2$ varlığında, inkübasyon süresi değiştirilerek arginin-arginaz reaksiyonunun oluşması sağlanmıştır. Karaciğer doku arginazı 15. dakikaya kadar lineer bir artış gösterip 15. dakikadan sonra şekilde de görüldüğü gibi bu lineer artış yerini hiperbolik bir görünüme bırakmıştır. Bu nedenle sağlıklı ve fasciolasisli karaciğer doku arginazı (Şekil 19) için optimal inkübasyon zamanı 10 dakika olarak belirlenmiştir.



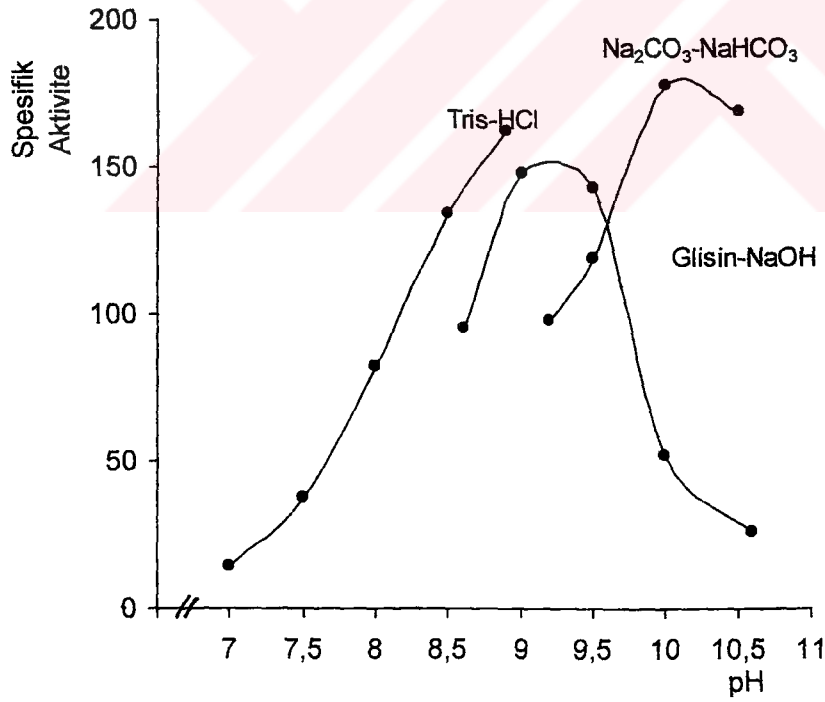
Şekil 19 : Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin İnkübasyon Zamanına Bağlı Olarak Değişimi.

4.4. PH'nın Belirlenmesi

Karaciğer doku arginazının optimal pH'larını saptamak için 7.0 ile 10.5 arasında değişen çeşitli tampon sistemleri kullanılmıştır. Bu tampon sistemleri pH 7.0-8.9'da Tris-HCl, pH 8.6-10.6'da Glisin-NaOH, pH 9.2-10.5'de Sodyum bikarbonat-Sodyum karbonat tamponları olup, argininin pH'sı ile tamponların pH'sı aynı tutulmuştur. Sağlıklı (Şekil 20) ve fasciolasisli (Şekil 21) koyun karaciğer doku arginaz aktivitelerinin ölçümü için en uygun tampon, Sodyum bikarbonat-Sodyum karbonat tampon sistemi olup, en uygun pH ise 10.0'dur.



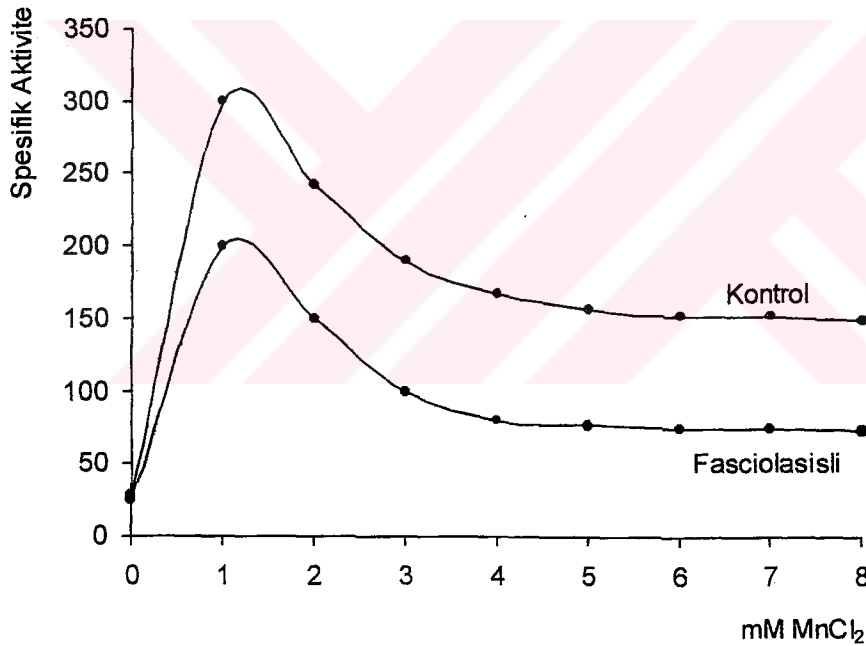
Şekil 20 : Sağlıkli Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya Göre Gösterdiği Değişiklikler



Şekil 21: Fasciolasisli Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin Çeşitli Tampon Sistemlerine ve pH'ya Göre Gösterdiği Değişiklikler

4.5. $MnCl_2$ Konsantrasyonunun Belirlenmesi

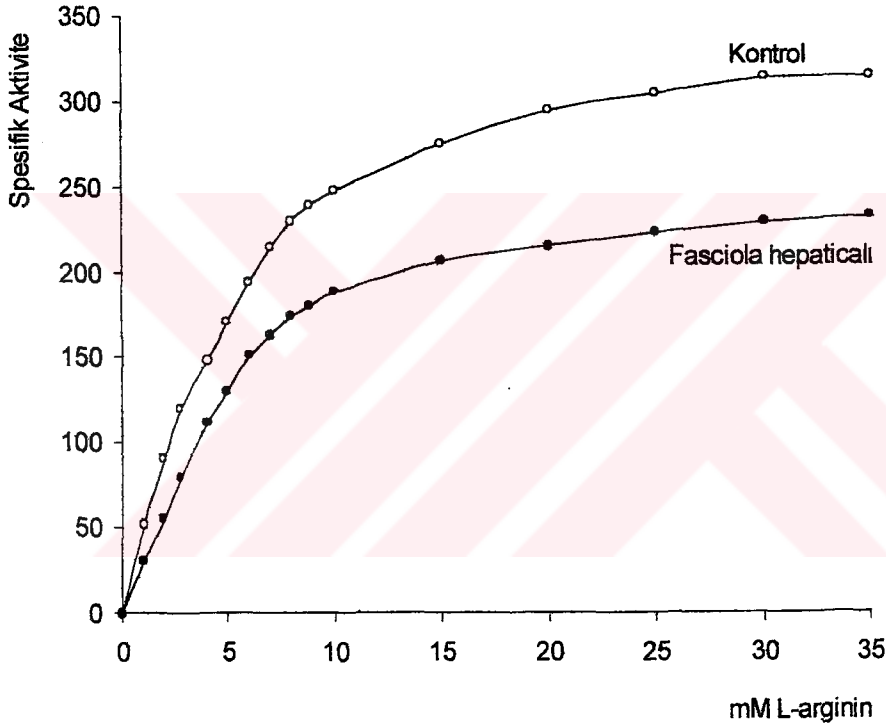
Koyun karaciğer arginaz aktivitesinin $MnCl_2$ konsantrasyonuna bağlı olarak değişimini araştırmak amacıyla preinkübasyon ortamına 0-8 mM arasında değişen konsantrasyonlarda, Mn^{+2} iyonları ilave edilmiştir. Şekil 22’de de görüldüğü gibi preinkübasyon ortamının Mn^{+2} içermediği durumlarda enzim aktivitesi düşüktür. Ortama Mn^{+2} iyonlarının ilavesi ile enzim aktivitesi belirgin olarak artmaktadır. En yüksek aktivitenin elde edildiği $MnCl_2$ konsantrasyonu 1 mM civarında olup, 1 mM’den itibaren enzim aktivitesi düşmektedir. Karaciğer doku arginazı için optimal Mn^{+2} konsantrasyonu 1 mM olarak saptanmış ve kabul edilmiştir.



Şekil 22: Sağlıklı ve Fasciola hepatica Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin $MnCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi

4.6. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

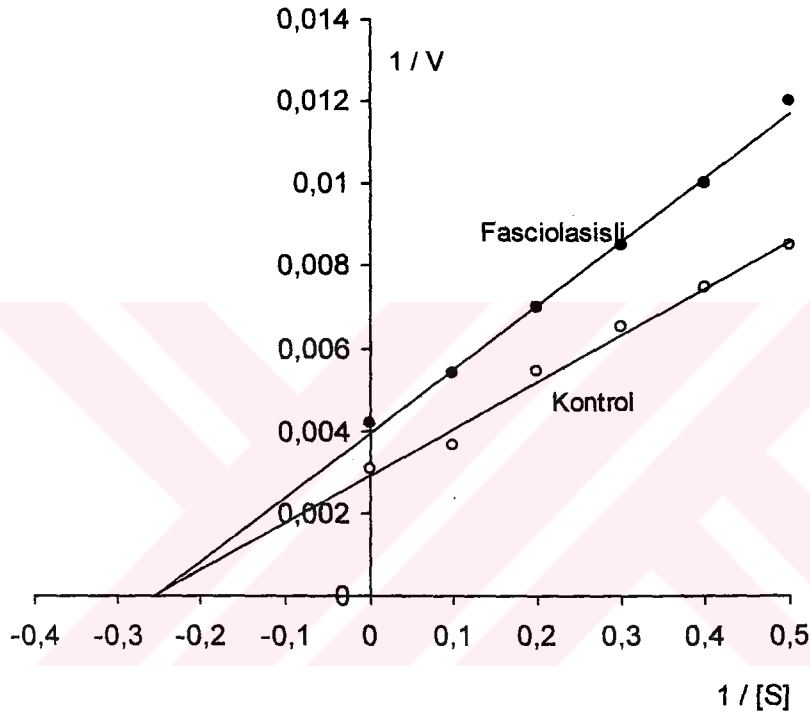
Karaciğer doku arginazı için optimal koşullar belirlendikten sonra arginazın substratı L-arginine karşı olan K_m 'i Michaelis-Menten kinetiği ile incelenmiştir. Bu amaçla enzim miktarı sabit tutulup, L-arginin konsantrasyonu değiştirilerek arginaz aktivitesine bakılmıştır. Reaksiyon hızının artışı, L-arginin konsantrasyonunun artışına paralellik göstermektedir. Başlangıçta, reaksiyon hızında görülen lineer artış daha sonra yerini hiperbolik bir görünüme bırakmakta ve en sonunda reaksiyon substrat konsantrasyonunun fonksiyonu olmaktan çıkarak, enzim substrat ile doymun hale gelmektedir.



Şekil 23 : Sağlıklı ve Fasciola hepaticali Koyun Karaciğer Doku Arginaz Aktivitesinin L-arginin Derişimine Bağlı Olarak Değişimi

Şekil 23'de de görüldüğü gibi sağlıklı koyun karaciğer dokusunda 3 mM, F. hepatica ile enfekte karaciğer dokusunda 3.5 mM'a kadar olan L-arginin konsantrasyonundaki artış, enzim aktivitesinde lineer bir artışa (birinci mertebeye kinetiği) neden olmuş, bu noktadan itibaren doğrusallık yavaş yavaş kaybolarak,

yerini hiperbolik bir görünüme (karışık merteye kinetiği) bırakmıştır. 20 mM'lık L-arginin konsantrasyonunda ise arginaz L-arginin ile doygunluğa ulaşarak (sıfır merteye kinetiği) reaksiyon sabit hızla devam etmiştir. Enzim aktivitesinin L-arginin konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi Michaelis-Menten eşitliği yanında, Lineweaver-Burk (Şekil 24) eğrileriyle de incelenmiş ve koyun karaciğer doku arginazının L-arginine karşı olan K_m 'inin 4 mM civarında olduğu bulunmuştur.



Şekil 24 : Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyun Karaciğer Arginazının L-arginine Karşı Olan K_m 'inin Lineweaver-Burk Eğrisi ile Saptanması

Tablo 3: Sağlıklı ve Fasciola hepatica ile Enfekte Koyunların Plazmalarında; Total Nitrit ve Malondialdehit, Eritrositlerinde; Katalaz, Glutasyon Peroksidaz ve Arginaz Aktivite Düzeyleri

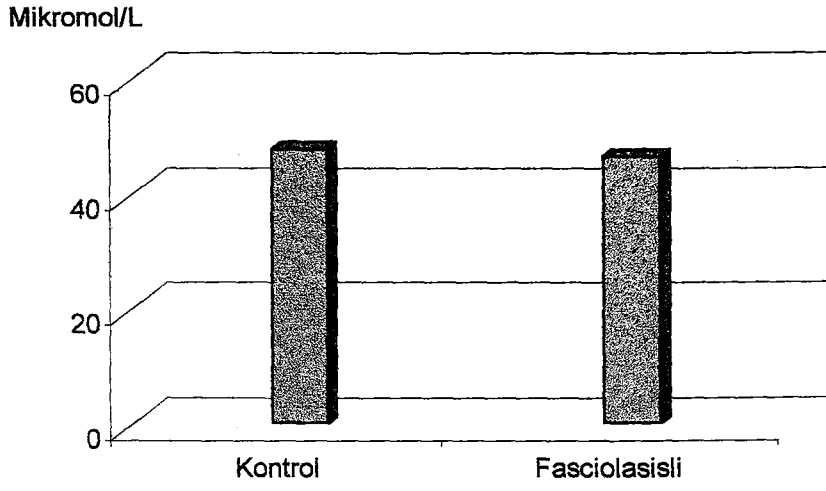
	Total Nitrit μ mol/L		MDA nmol/ml		Katalaz k/g Hb		GSH-Px U/g Hb		Arginaz Spesifik Aktivite	
	n		n		n		n		n	
Kontrol Grup	20	47.60 \pm 10.38	70	1.85 \pm 0.68	72	15.88 \pm 5.10	28	58.90 \pm 16.75	72	84.66 \pm 28.29
Fasciolasisli Grup	15	46.33 \pm 12.65	64	1.99 \pm 0.60	74	15.02 \pm 5.80	13	51.65 \pm 11.65	73	87.11 \pm 22.41
P		>0.05		>0.05		>0.05		>0.05		>0.05

Spesifik Aktivite: (Mikromol Üre / g Hb) x Saat

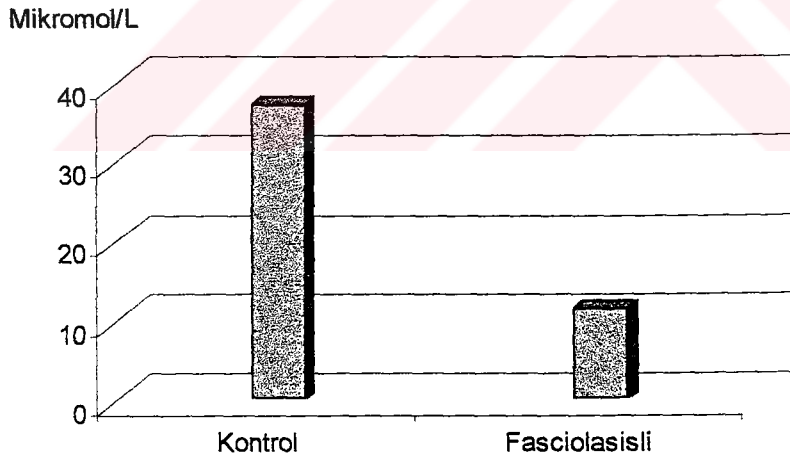
Tablo 4: Sağlıklı ve Fasciola hepatica ile Enfekte Koyunların Karaciğer Dokusunda Total Nitrit, Malondialdehit, Katalaz, Glutatyon Peroksidaz ve Arginaz Aktivite Düzeyleri

	Total Nitrit μ mol/L		MDA nmol/ gr Doku		Katalaz k/g Protein		GSH-Px U/g Protein		Arginaz Spesifik Aktivite	
	n		n		n		n		n	
Kontrol Grup	20	37.05 \pm 7.21	40	28.25 \pm 7.09	50	1548 \pm 526.17	21	34.63 \pm 9.50	50	236.65 \pm 57.64
Fasciolasisli Grup	20	11.45 \pm 2.82	20	1.18 \pm 1.41	20	484.27 \pm 189.98	20	90.54 \pm 33.19	20	50.37 \pm 19.63
P		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01

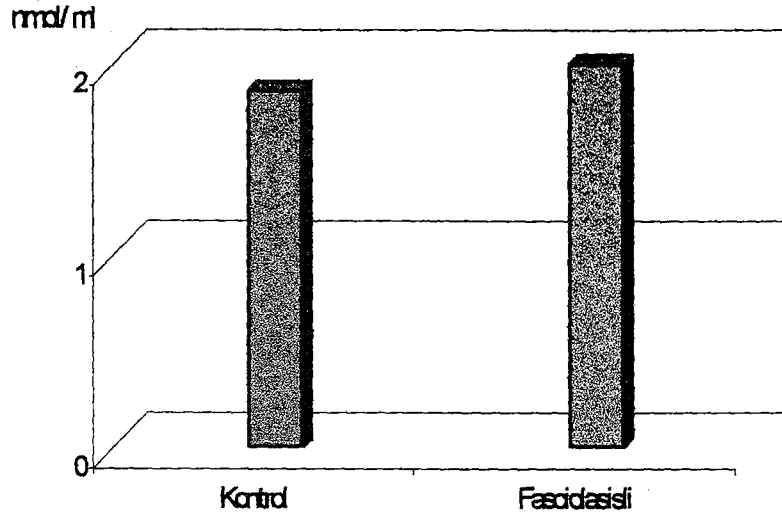
Spesifik Aktivite: (Mikromol Üre / mg Protein) x Saat



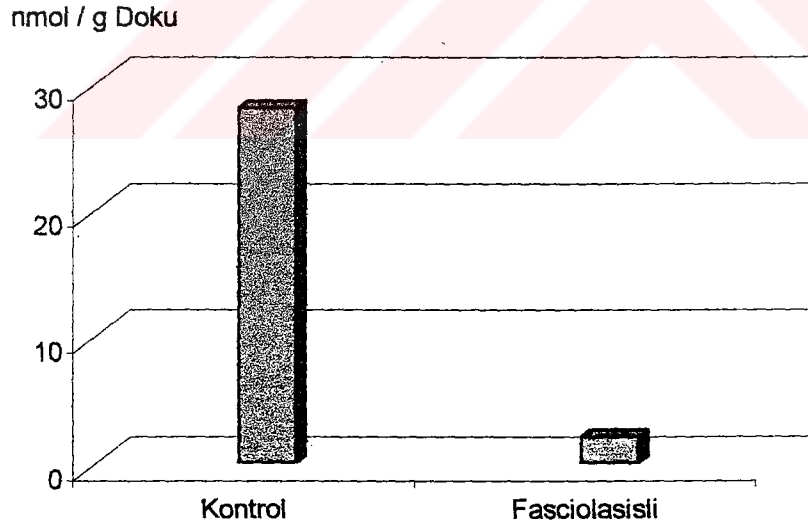
Şekil 25: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Plazma Total Nitrit Düzeylerindeki Değişimler



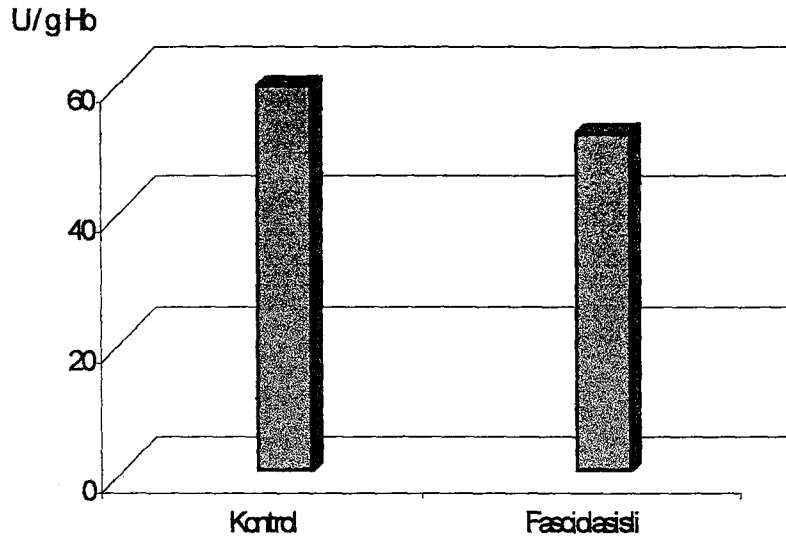
Şekil 26: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Karaciğer Total Nitrit Düzeylerindeki Değişimler



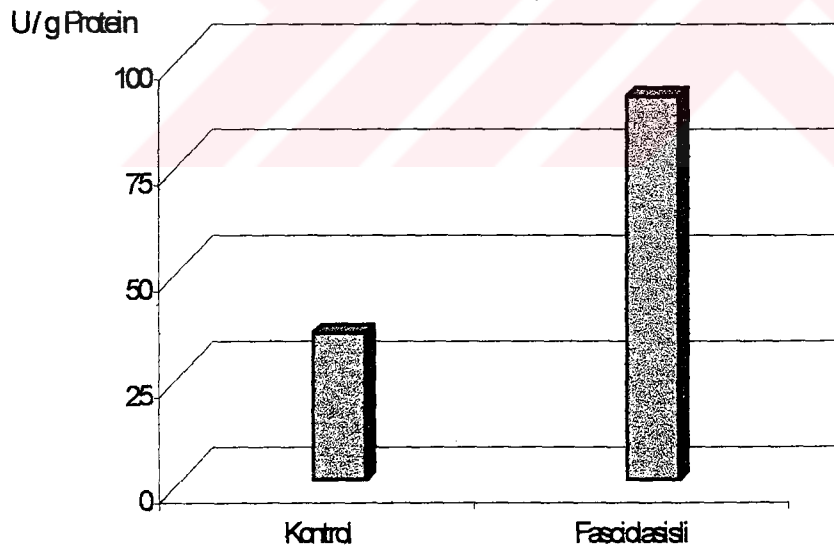
Şekil 27: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Plazma Malondialdehid Düzeylerindeki Değişimler



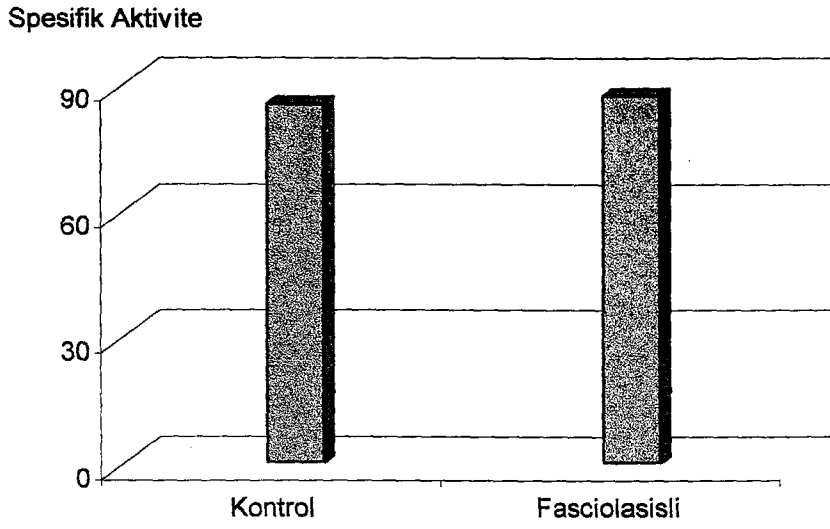
Şekil 28: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Karaciğer Malondialdehid Düzeylerindeki Değişimler



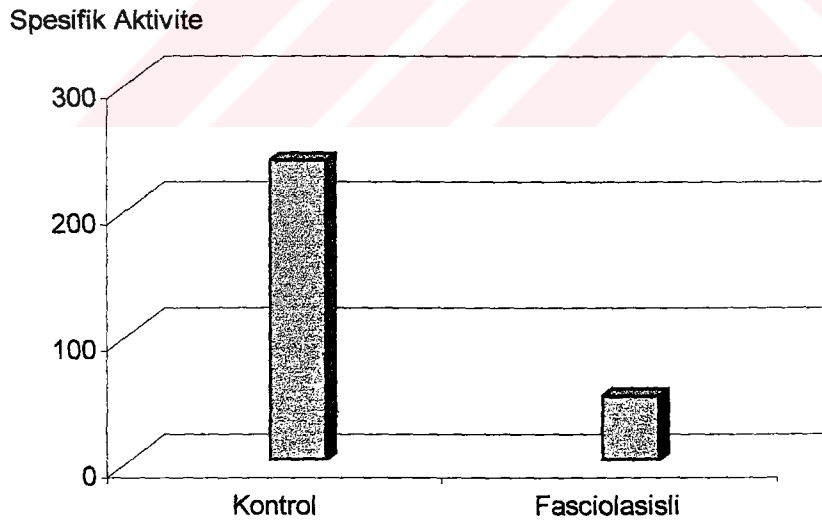
Şekil 29: Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Eritrosit GSH-Px Aktivite Düzeylerindeki Değişimler



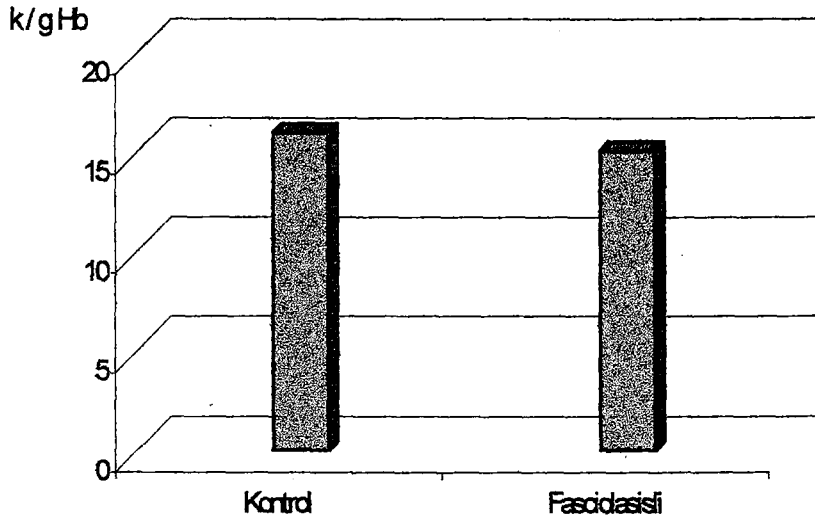
Şekil 30 : Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Karaciğer GSH-Px Aktivite Düzeylerindeki Değişimler



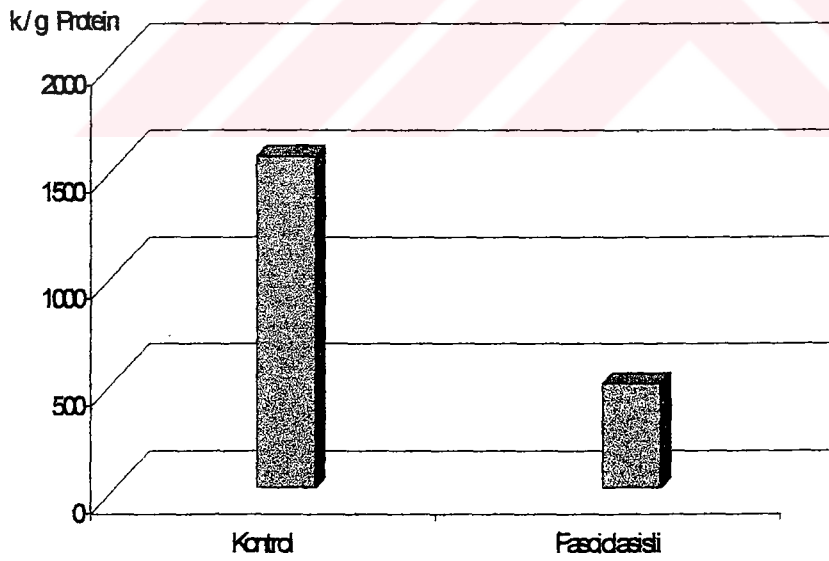
Şekil 31 : Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Eritrosit Arginaz Aktivite Düzeylerindeki Değişimler



Şekil 32 : Sağlıklı ve Fasciolasisli Koyunların Karaciğer Arginaz Aktivite Düzeylerindeki Değişimler



Şekil 33 : Sağlıklı ve Fasciolosisli Koyunların Eritrosit Katalaz Aktivite Düzeylerindeki Değişimler



Şekil 34: Sağlıklı ve Fasciolosisli Koyunların Karaciğer Katalaz Aktivite Düzeylerindeki Değişimler

5. TARTIŞMA

Fasciolasis sığır, koyun, keçi ile diğer evcil ve yabani ruminantların bir trematod invazyonu olup, büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Fasciolasiste bir karaciğer tahribatı söz konusudur. Bu tahribat karaciğere gelen ve safra kanallarında olgunlaşan parazitlerin sayısına bağlıdır. Parazitin genç formları tahribatı karaciğer parankimasında, olgunları ise safra kanallarında oluştururlar.

Ülkemizde paraziter hastalıklarla ilgili yayınların çokluğu ve elde edilen sonuçlar bu sorunun çok yaygın olduğunun göstergesidir. Paraziter hastalıkların Türkiye ekonomisine büyük darbeler vurduğu bir gerçektir. Bu hastalıklardan korunmak için tanının ve özellikle erken teşhisin büyük önemi vardır.

Ülkemizde hayvanlarda düzenli olarak parazit muayenesi yapılmadığı için özellikle subklinik olarak seyreden enfeksiyonların tanısı gecikmekte ve sağaltım yöntemleri ile birlikte kontrol yöntemleri de önem kazanmaktadır. Günümüzde paraziter hastalıkların erken teşhisinde rutin parazitolojik muayenelerin yanısıra konakçının biyokimyasal yapısında meydana gelen bazı değişikliklerin tespiti ile serolojik testlerden de yararlanılmaktadır.

F. hepatica, F. gigantica gibi ruminantlarda yaygın olarak görülen karaciğer parazitleri konakçılarının karaciğerinde büyük harabiyetler meydana getirdiği için karaciğer enzim aktivitelerinde de değişiklikler gözlenmektedir.

Karaciğer vücuttaki en büyük organdır, çok sayıda ve değişik işlevleri vardır. Siroz, karaciğer interstitiumunun (destek dokusunun) süregen ve proliferatif yangısı olup, karaciğerde ilerleyici bir fibrozis veya nedbeleşme söz konusudur. Karaciğer parankimi gözden kaybolur ve bunun yerini giderek yaygın bir biçimde üreyen interstitiel doku alır. Karaciğer parankim kitlesinin azalması siroz gibi kronik karaciğer hastalıklarında sık olarak görülür (5,6). Sirozun pek çok nedeni vardır, paraziter invazyonlar hayvanlardaki en önemli sebeplerden birisidir. Günümüzde doğu alemlerinde paraziter invazyonlardan hasar görürken, batı alemlerinde de fazla alkol tüketimi ile aynı sorunu ve sonucu yaşamaktadır.

Jubb, Kennedy (54) ve Pamukçu (120), fasciolasiste parazit larvalarının açtığı tünellerin bir skatriks dokusu ile dolduğunu, bu dokunun lenfosit ve eozinofillerden oldukça zengin olduğunu, hafif infestasyonlar neticesi teşekkül

eden skatriks dokusunun sonradan kaybolduğunu, şiddetli durumlarda ise bu nedbe dokusunun birbirleri ile birleşerek karaciğer fibrosisine sebep olduğunu, ayrıca parazitin safra kanallarına geçmesiyle bu kanallarda genişlemeler meydana getirdiğini, ilerlemiş durumlarda safra kanalları etrafında şiddetli bir granülasyon dokusunun oluştuğunu ve bu dokunun giderek kalsifikasyona uğradığını belirtmektedirler.

Arginaz üre döngüsünün son basamağında L-arginini, üre ve ornitine hidrolize eder. Memelilerde karaciğer başta olmak üzere pekçok dokuda varlığı saptanmıştır (4,39). Fasciolasis karaciğerde ciddi tahribatlara yol açan paraziter bir enfeksiyondur. *F. hepatica*'da bulunan arginazın biyokimyasal görevinin nedenini Isserof (49) ve Kurelec (74) kollagen sentezi için gerekli prolin ve hidroksi prolinin sağlanması olarak izah etmektedirler. Isserof (48) sıçanlara prolin enjekte edildiği zaman karaciğerde siroz oluştuğunu göstermiştir. Bu bulgular *F. hepatica* enfeksiyonu sonucu oluşan kronik sirozun parazitin devamlı ortama saldığı prolinde meydana gelebileceğini açıklamaktadır (48,52). Arginaz enzimi en yüksek aktiviteye karaciğer dokusunda sahip olduğu için, fasciolasis sonucu oluşan karaciğer harabiyetinin arginaz aktivitesinde ve arginaz enziminin kinetiğinde herhangi bir değişiklik meydana getirip getirmediğini anlayabilmek için arginaz düzeyleri ve enzimin kinetiği çalışılmıştır.

Fasciolasisli ve sağlıklı koyun karaciğer doku arginazının optimal preinkübasyon ısısı 65 °C olarak bulunmuştur.

Daha önce birçok dokuda çalışılan arginazların optimal preinkübasyon ısıları 50-60 °C civarında bulunmuştur. Preinkübasyon ısısı olarak sıçan karaciğeri (141), insan tükürüğü (67), tiroid dokusu (50), uterusu (39), eritrositi (19,39,87) 55 °C, yine lösemili insanların saflaştırılmış lenfosit ve granulositleri (130), rat memesi (53) arginazı için 55 °C, *Moniezia expansa* (111) ve *Moniezia benedeni* (116) için 53 °C, insan ve koyun vitreus arginazı için 40 °C (37), sığır rumen doku arginazı için (28) 60 °C olarak bulunmuştur.

Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle optimal ısıya 40-50 °C'ler arasında erişir, bu derecelerin üstünde enzimlerin ısıya bağlı olarak denatüre olma hızı, enzimin reaksiyon hızı artışından daha süratli olduğu için enzim aktivitesi azalmaktadır. Şekil 15-16'da da görüldüğü gibi enzim aktivitesi Mn^{+2} varlığında

65 °C'ye kadar yükselmekte, 65 °C'den itibaren ise düşmektedir. Bulduğumuz bu sonuçlara göre diyebiliriz ki; sağlıklı ve fasciolasisli koyun karaciğer doku arginazı diğer arginazlardan daha fazla ısıya dayanıklıdır.

Çalışmamızın diğer bir bölümünde, değişik sürelerde farklı preinkübasyon ısıları uygulanarak; maksimum aktiviteye ulaşmak için gereken preinkübasyon zamanı tespit edilmiştir. Şekil 17-18'de de görüldüğü gibi enzim 55, 60, 65, 70 °C'lik ısılarda preinkübe edildiğinde; en yüksek aktiviteye 65 °C'de 15 dakikada ulaşmaktadır.

Bu konu ile ilgili çalışmalara baktığımızda preinkübasyon süresi, insan tiroid dokusu (50), tükürüğü (67), karaciğer ve eritrosit (19) arginazı için 20 dakika olarak bulunmuştur. Tavuk böbrek (65) ve rat karaciğer (141) arginazı için bu süre 5 dakika olarak belirlenirken, Lubońska ve ark. (87)'ları insan eritrositleri için bu sürenin 15 dakika, Erişir ve Ozan (28) sığır rumen doku arginazı için 9 dakika olarak bulmuşlardır.

Enzimatik reaksiyonlar vücut ısısında cereyan ettiğinden inkübasyon ısısı 37 °C olarak alınıp reaksiyon için gerekli inkübasyon zamanını tespit etmek amacı ile 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 dakikalarda enzim inkübasyona tabii tutulmuştur. Elde edilen veriler grafiğe uygulandığında Şekil 19'dan da anlaşılacağı gibi enzim aktivitesi 15. dakikaya kadar lineer bir artış göstermekte, bu dakikadan sonra lineerlikten sapmaktadır. 15. dakikadan sonra lineeritenin bozulması dikkate alınarak inkübasyon süresi sağlıklı ve fasciolasisli koyun karaciğer arginazı için 10 dakika olarak alınıp ünite tarifi saate göre yapılmıştır.

İnkübasyon süresine göre ünite tanımı yapıldığından, araştırmacılar bu konuda farklı süreler kullanmış ve aktiviteyi buna göre tanımlamışlardır. İnsan tiroid doku arginazı için bu süre 30 dakika (50), karaciğer için 20 dakika (39), eritrosit için 8 dakika (39,145), uterus için 20 dakika (39), vitreus için 9 dakika (37), Moniezia benedeni için 15 dakika (116), sığır rumen doku arginazı için 13 dakika (28) olarak alınmıştır.

Çalışmada enzim aktivitesi üzerine farklı pH'ların ve tamponların etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla Tris-HCl, Glisin-NaOH ve NaHCO₃-Na₂CO₃ tampon sistemleri kullanılmıştır. Arginazın optimal pH'sı bir çok doku türünde çalışılmış ve argininin arginaz ile hidrolizi için gerekli optimal pH'nın doku türüne göre

değiştirdiği ve bu pH'nun 9.3-11 arasında bazik pH sınırları içinde olduğu bildirilmektedir (19,67,104,141,146,162).

Arginaz enzimi ölçümünde araştırmacılar farklı tampon sistemleri kullanmışlardır. Spector ve ark. (146)'ları, Tris-HCl tampon sistemini kullanmış, insan yetişkin ve fetal karaciğer ve böbrek arginazının optimum pH'sını 9.5-11 arasında, gastrointestinal kanal ve böbreğinkini ise 9.5 olarak bulmuşlardır. Colombo ve Konarska (19), hem karaciğer hem de eritrosit için karbonat tampon (pH: 9.5) sistemi kullanmışlardır. Ozan ve ark.(111)'ları *Moniezia expansa* arginazı için en uygun tamponun karbonat tamponu (pH: 9.5) olduğunu tespit etmişlerdir. Van Elsen ve Leroy (162), glisin-NaOH tamponu kullanarak optimum pH'yı fibroblast, böbrek ve eritrosit için 9.7, karaciğer için ise 10 olarak bulmuşlardır. Erişir ve Ozan sığır rumen doku arginazı için en uygun tamponun bikarbonat-karbonat tamponu olduğunu (pH: 9.7) saptamışlardır (28).

Şekil 20 ve 21'de de görüldüğü gibi sağlıklı ve fasciolasisli koyun karaciğer doku arginazı da bazik pH'da optimum aktivite vermekte ve diğer doku arginazları için belirlenmiş olan pH değerleri ile uyum göstermektedir.

Enzimlerin aktivasyonları için gerekli bileşiklere kofaktör denilir ve enzimler için mutlak gereklidir. Mn⁺² değerlikli bir metal olup, arginazın vazgeçilmez bir kofaktörüdür. Arginazın yüksek katalitik aktivite gösterebilmesi, subünitelerine dissosiyasyon olmaması ve quarterner yapısının şekillenmesi için her subünitenin bir mol Mn⁺² içermesi gerekmektedir. Sağlıklı ve fasciolasisli koyun karaciğer doku arginazı 1 mM'lık Mn⁺² iyonları varlığında maksimum aktivite göstermektedir (Şekil 22). Sağlıklı ve fasciolasisli dokularda preinkübasyon ortamına Mn⁺² ilave edilmediği zaman 25 U/protein civarında olan arginaz aktivitesi Mn⁺² iyonlarının ilavesiyle sağlıklı hayvanda 300 U/proteine, fasciolasisli hayvanda ise 200 U/proteine kadar yükselmiştir. Yapılan çalışmalarda dokular için Mn⁺² konsantrasyonları farklı olup insan karaciğeri için 2.0 mM (19), insan tükürüğü için 5.0 mM (67), tavuk böbreği için 5.0 mM (65), tiroid doku arginazı için 2.5 mM (50), eritrosit arginazı için 5.0 mM (19,68), *Moniezia benedeni* arginazı için 0.5 mM (116) ve sığır rumen doku arginazı için 1 mM (28) olarak tespit edilmiştir. Bu konu ile ilgili tüm çalışmalarda ortak nokta

manganın arginaz aktivitesi için vazgeçilmez bir kofaktör olduğu ve optimal Mn^{+2} derişiminin dokuya göre farklılık göstermesidir. Koyun karaciğer doku arginazının, L-arginine karşı olan K_m 'ini araştırmak amacıyla enzim miktarı sabit tutulup, L-argininin değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzimin aktivitesi; 3.5 mM'lık L-arginin konsantrasyonuna kadar lineer bir artış göstermekte, bu noktadan sonra hiperbolik bir görünüm almakta ve 20 mM L-arginin konsantrasyonundan itibaren reaksiyon sabit hızla devam etmektedir. Bu eğri tipik bir Michaelis-Menten eğrisidir. Burada maksimum aktivitenin yarısına tekabül eden substrat konsantrasyonu K_m 'i, yani enzimin substratına karşı olan ilgisini göstermektedir. Michaelis-Menten (Şekil 23), Lineweaver-Burk (şekil 24) eğrileri ile K_m 'ler değerlendirildiğinde sağlıklı ve fasciolasisli koyun karaciğerlerinde K_m 'in 4 mM civarında olduğu gözlenmiştir.

İnsan karaciğer arginazı için K_m 10.14 mM (146), insan eritrosit arginazı için K_m 1.5 mM (145), *Moniezia expansa* arginazı için 7 mM (111), *Moniezia benedeni* arginazı için 12.5 mM (116), koyun tükürük arginazı için 10 mM (115), sığır rumen doku arginazı için K_m 4 mM olarak bulunmuştur (28). Ozan ve Gülen (110) tarafından yapılan bir çalışmada K_m değerleri sığırların tükürüklerinde 5-5.5 mM, eritrositlerinde 2.5 mM ve karaciğerlerinde ise 2.3 mM civarında bulunmuştur.

Yukarıda verilen örneklerden de anlaşılacağı üzere arginaz enziminin arginine karşı K_m değeri dokuların farklılığına göre değişmektedir. Ancak benzer doku çalışmalarında da uyum görülmemektedir. Dokular aynı olduğu halde sonuçların uyum içinde olmaması, canlıların türlerinin farklı olmasından ve optimize edilen şartların farklılığından kaynaklanabilir.

Arginaz enzim aktivitesinin kanserli hücrelerde normal hücrelere göre daha fazla miktarlarda bulunduğu, kolorektal kanserleri (80), epidermal papillomları (69), sinir dokusu tümörleri (158), prostat karsinomları (43) ve mide kanserlerinde (165) gösterilmiştir. Serum arginaz aktivitesinin arttığı diğer patolojik durumlar karaciğer hücre harabiyeti, hemolitik anemiler (155) ve myokard enfarktüsüdür (123).

Serum arginaz aktivitesinin düşük olduğu bir durum ise enzim defektinin otozomal resesif geçiş gösterdiği arginemidir (152).

Plazma enzim analizleri yoluyla sığırlarda *F. hepatica* enfeksiyonunun diagnozu ile ilgili yapılan bir çalışmada, plazmada albumin, total bilirubin, total protein, arginaz, aspartat aminotransferaz (AST) ve gamma-glutamil transpeptidaz (GGT) aktiviteleri ölçülmüştür. AST aktivitesindeki artış karaciğer parankim hasarını, GGT aktivitesindeki artış ise hepatobiliyer hasarı göstermekte olup, bu enzim aktiviteleri arasındaki farklılıklar göç ile duktal faz arasında ayırım yapılmasını sağlar. Plazma arginaz aktivitesi ile parazit enfeksiyonu arasında bir ilişki bulunamamıştır (166). Arginaz karaciğere özgü bir enzim olmasına rağmen fasciolasisten kaynaklanan karaciğer hasarının belirlenmesinde kullanışlı değildir. Arginaz aktivitesinin plazmada değişiklik göstermemesi arginazın mitokondriya bağlı bir enzim (21) olmasıyla ve enzimin genç parazitin göçü esnasında etrafını çevreleyen sıvının içerisine salınmamasıyla açıklanmaktadır. Karaciğerde hasar meydana getiren organik solventler kullanılarak köpeklerde oluşturulan intoksikasyonda plazma arginaz aktivitesinde artışlar meydana gelmiştir (105). Özellikle CCl_4 gibi organik solventler, mitokondri benzeri organellerin membranlarındaki fosfolipid tabakasının çözülmesine sebep olarak arginaz gibi mitokondri membranına bağlı enzimlerde artışa neden olabilir (131).

Fasciolasisli sığırlarda serum GGT, AST, alkalin fosfataz (ALP) ve arginaz aktiviteleri ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada hayvanlara 72 gün süreyle *F. hepatica* metaserkeri verilmek suretiyle fasciolasis oluşturulmuştur. Daha sonra bu hayvanlarda AST, ALP, arginaz ve GGT aktiviteleri 2 hafta aralıklarla ölçülmüştür. Parazit sayısı 19-87 arasında iken serum ALP ve arginaz aktivite düzeylerinde kontroller ile karşılaştırıldığı zaman bir artış olmadığı gözlenmiştir (14). ALP aktiviteleri genellikle koyun ve sığır dışındaki hayvanlarda safra tıkanıklığında arttığı için (21), sığırlarda artışın olmaması beklenen bir sonuçtur. Ancak arginaz için sonuç beklenildiği gibi olmamıştır, çünkü ruminantlarda karaciğer nekrozunda arginaz aktivitesindeki artış spesifik ve karaciğer harabiyetinde önemli bir artış beklenmektedir. Bu çalışmada arginaz aktivitesinde artışın gözlenmemesi göç halindeki parazitlerin sayısının az olması nedeniyle yeteri kadar karaciğer harabiyeti olmamasına bağlanmıştır.

Türkoğlu (159)'nun yaptığı çalışmada CCl_4 enjekte edilerek siroz oluşturulan sıçanların karaciğer arginaz aktivitelerinde önemli düşüşler bulunmuştur.

Ozan ve Gülen (109) tarafından yapılan bir çalışmada *F. hepatica* enfeksiyonu sonucu oluşan sirotik sığır karaciğerleri ile plazmalarında bazı amino asit metabolizması enzim düzeyleri ölçülmüş ve yapılan çalışmada plazma arginaz aktivitesinde artış, sirotik karaciğer arginaz aktivitesinde ise düşüş kaydedilmiştir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada sağlıklı ve *F. hepatica* koyunların eritrosit arginaz aktivite düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmezken, karaciğer arginaz aktivitesi açısından fasciolasisli hayvanlarda istatistiksel olarak önemli bir düşüş gözlenmiştir. Eritrosit arginaz ile ilgili olarak bulduğumuz sonuçlar Bulgin ve ark. ile Wyckoff ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmalar ile ; karaciğer arginaz aktivitesi ile ilgili bulduğumuz sonuçlar ise Ozan ve Gülen tarafından yapılan çalışma ile uyum içerisindedir.

NO vücutta yapısal olarak yer almış olan NOS enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla, normal koşullarda vasküler tonusun devamlılığının sağlanması için sentezlenmektedir. Asetilkolin, bradikinin, glutamat, adenozin difosfat (ADP) gibi fizyolojik uyarılar endotel hücrelerdeki NOS'ı aktifleştirir. Kalsiyum-kalmoduline bağımlı olan bu enzim aktifleşince L-arginin ve oksijenin reaksiyona girerek L-sitrüllin ve NO 'e dönüşümünü sağlar (44,45,96,97). Bu reaksiyon sonucu oluşan NO damar düz kas hücrelerine diffuze olur ve guanilat siklaz enziminin hem grubuna bağlanarak enzimi aktif hale getirir. Aktifleşen guanilat siklaz enzimi GTP'ı, cGMP'a dönüştürerek kas gevşemesine neden olur (44,97).

iNOS hücre içinde bulunmaz. Özellikle makrofaj (monosit, nötrofil, hepatosit) ve damar endotel hücrelerinde sentez edilmektedir (15,85). Bu hücrelerin spesifik sitokinlerle aktivasyonu, NOS'ın indüksiyonu ve NO sentezine yol açmaktadır. NO 'e duyarlı patojenlerden bazıları şunlardır; *Leishmania* türleri, *Plasmodium* türleri, *Trypanosoma* türleri, *Schistosoma mansoni*, *Mycobacterium* türleri, *Listeria*, *Toxoplasma gondii* ve *Cryptococcus neoformans* (106).

NO vücutta çok hızlı metabolize olarak ürünleri olan nitrit ve nitrate dönüşmektedir. Serum nitrit ve nitrat düzeyleri NO metabolizmasının değerlendirilmesinde bir ölçü olarak kullanılmaktadır. Deney hayvanlarında ve insan çalışmalarında in vitro ve in vivo olarak NO aktivitesinin göstergesi olarak nitrit ve nitrat düzeylerinin değerlendirildiği pek çok çalışma vardır (98).

F. hepatica ili ilgili bulduğumuz sonuçları karşılaştırabileceğimiz çalışma sayısı az olduğu için sonuçlarımızı yorumlamada sirozla ilgili makalelerden de faydalandık.

Rockey ve Chung (133) tarafından yapılan bir çalışmada safra kanalı bağlanarak veya CCl₄ verilerek karaciğer hasarı veya siroz oluşturulmuş ratlarda sinusoidal endotelial hücreler (SEC) tarafından nitrit üretimi ölçülmüştür. Intrahepatik vazküler rezistans, endotelin ve NO gibi vazorelaksasyon yapıcı bileşikler ve vazokonstrükte edici bileşikler tarafından düzenlenmektedir. Endotelial hücrelerdeki NOS enzimi (ecNOS) tarafından üretilen NO karaciğerde NO'nun en önemli kaynağıdır ve SEC'de bu izoform tanımlanmamıştır. Bu çalışma SEC tarafından ecNOS'un üretilip üretilmediğini belirlemek, böylece karaciğer hasarından sonra NO üretiminin SEC kaynaklı mı yoksa ecNOS kaynaklı mı olduğunu tayin etmek amacıyla düzenlenmiştir. NO aktivitesi cGMP düzeyi ve nitrit ölçümü ile belirlenmiştir. Sonuçta karaciğerdeki ecNOS'un en önemli kaynağının SEC olduğu, ecNOS mRNA'sı ve SEC protein seviyesi karaciğer hasarı ile değişmediği halde ecNOS fonksiyonunun değiştiği ve sirotik hayvanlarda SEC tarafından NO salınımının gözden kaybolduğu bulunmuştur. Bu veriler endotelial hasarlı diğer hastalıklar kadar intrahepatik portal hipertansiyonun patogenesisi için de oldukça önemlidir.

Guarner ve ark. (34)'lerinin yapmış oldukları bir çalışmada NO'in son ürünleri olan nitrit ve nitrat düzeylerinin sirozlu hastaların serumunda arttığı ve bu artışın endotoksemi ile paralellik gösterdiği savunulmaktadır. NO oluşumundan sorumlu NOS aktivitesi ile ilgili çalışmalar yapan Ros (135) sirozlu hastalarda enzim aktivitesinin arttığını göstermiştir.

Gupta ve ark. (35)'lerinin yapmış oldukları bir çalışmada sirotik ratların intrahepatik mikrosirkülasyonunda NO üretiminde bir azalma ve endotelial disfonksiyon gözlenmiştir. Yapılan çalışmada sirotik karaciğerlerde nitrit ve nitrat

üretimini belirgin olarak düşüğü bulunmuştur. Klasik olarak vazomotor endotelial fonksiyon, asetilkolin gibi endotelial agonistlere verilen vazorelaksasyon cevabın ölçümü ile belirlenmektedir. Asetilkolinin vazküler ton üzerine iki türlü etkisi vardır. Düşük dozlarda endotelial hücrelerdeki muskarinik reseptörler üzerine etki ederek endotele bağlı vazorelaksasyon yaparken, yüksek dozlarda ise aynı reseptörlere etki ederek vazokonstriksiyon meydana getirir. Bu çalışmada sirotik intrahepatik mikrosirkülasyonda artmış vazküler ton üzerine endotelyumun fonksiyonel rolü araştırılmıştır. Sirotik mikrosirkülasyonda asetilkoline verilen damar gevşetici cevap azalması vazorelaksasyon sağlayıcı faktörlerin sentezinin azalması ile açıklanmıştır. Sirotik karaciğerdeki NO[•] üretimini azalması endotelial disfonksiyonu doğrulamaktadır.

F. hepatica ile enfekte ratlarda mitojenlere karşı mononükleer dalak hücrelerinin proliferatif cevaplarının araştırıldığı çalışmada NO[•] seviyelerini belirlemek için peritoneal hücre süpernatant kültürlerinde nitrit miktarı ölçülmüştür. Lipopolisakkarit uyarımlı peritoneal hücreler tarafından üretilen NO[•] miktarında giderek bir azalma belirlenmiştir. Lipopolisakkarit uyarımlı peritoneal hücreler tarafından üretilen NO[•] miktarındaki azalmayla F. hepaticanın ekskretor-sekretor antijenleri kısmen ilgilidir. Öte yandan enfekte ratların peritoneal hücreleri tarafından üretilen NO[•] miktarındaki azalma peritoneal göç boyunca NO[•]'in öldürücü etkisinden kaçınmak için parazitin stratejilerinden biri olabilir (16).

Artmış intrahepatik rezistans sonucu oluşan portal hipertansiyon karaciğer sirozlu hastaların yaygın komplikasyonlarından biridir ve karaciğer sirozlu hastalarda ölüme neden olabilir. Karaciğerdeki yara prosesleri fibrogenesisteki artıştan ve yara bölgesindeki kontraksiyondan ibarettir. Endotelial NOS'ın enzimatik fonksiyonundaki azalmadan kaynaklanan NO[•] üretimindeki azalmanın ve karaciğerin stallet hücrelerinin artmış olan kontraksiyonunun sirotik karaciğerdeki intrahepatik rezistansın artışına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. NCX-1000, ursodeoksikolik asitin NO[•] salıcı bir derivativesi olup, karaciğerde NO[•] salınımını sağlar ve portal hipertansiyon gelişimini önler. Fiorucci ve ark. (29)'ları tarafından yapılan bir çalışmada intraperitoneal CCl₄ verilerek ratlarda oluşturulan portal hipertansiyon ve karaciğer fibrosisi üzerine UDCA ve NCX-

1000'in etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki, bu iki maddenin uygulanması karaciğerde kollojen birikimini azaltmış, NCX-1000 karaciğerde asit oluşumunu engellemiş ve intrahepatik rezistansı azaltmıştır.

Fasciolasisli koyunlarla ilgili olarak yapmış olduğumuz bu çalışmada karaciğer ve serumdaki NO. düzeyini belirlemek için enzimatik olarak nitratı nitrite indirgedikten sonra total nitriti ölçtük. Sağlıklı hayvanlardaki değerler ile karşılaştırdığımızda fasciolasisin serum nitrit düzeyini etkilemediğini, ancak karaciğer nitrit düzeyini önemli ölçüde azalttığını bulduk. Karaciğer ile ilgili olarak bulmuş olduğumuz sonuçlar Gupta ve ark. ile Fiorucci ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmalar ile uyum içerisindedir.

Serbest radikaller son yıllarda üzerinde en çok durulan ve araştırmaların yoğunlaştığı bir konudur. Serbest radikallerin hücrel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı hücrel savunma mekanizmalarının açıklığa kavuşması, bugün bilinmeyen pek çok klinik durumun patogenezisine açıklık getirecektir (94).

Lipid peroksidasyonu, membranlarda bulunan (fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol) PUFA'lerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur (31,36).

Lipid peroksidasyonu ve sonuçları ilk aşamada biyolojik zarları ilgilendirir. Peroksidasyon sonucu zar lipidlerinin kompozisyonları değişir, zarların kalsiyuma geçirgenlikleri artar, sarkoplazmik retikuluma kalsiyum pompalanması inhibe olur (55).

Hücrelerin lipid peroksidasyonuna direnç kazandıkları patolojik durumların bilinen örneği kanserdir. Bu durum, tümör hücre zarlarındaki biyokimyasal değişimlerle açıklanmaktadır. Tümör hücre zarlarında antioksidant lipofilik bileşiklerin (özellikle Vit E) derişimi normal hücrelerinkinden fazladır (95). Buna ilave olarak, normal hücrelerle kıyaslandıklarında, tümör hücre zarlarında polienoik yağ asitlerinin daha az buldukları gösterilmiştir (90,91).

Sirozun pek çok sebepleri olduğu ve sebeplerine göre sınıflandırıldığı zaman paraziter sirozların dışında alkolik sirozların da varlığından daha önceden bahsedilmişti.

Zidenberg-Cherr ve ark.(173,174)'ları 12-20 ay süre ile alkolle besledikleri domuzlarda karaciğer homojenatı ve mikrozomlarda aşırı doymamış yağ asidi miktarının azaldığını ve bunun sonucu olarak peroksid oluşum indeksinin de düşük olduğunu göstermişlerdir.

Ribiore ve ark.(132)'ları ratları diyet ve alkolle 8 hafta süre ile beslemişler ve kalp kasında lipid peroksidasyonu araştırmışlardır. İlk haftalarda lipid peroksidasyonun arttığını 4. haftadan sonra azalmaya başladığını 8. haftada ise anlamlı derecede düştüğünü tespit etmişlerdir.

Bütün bu bulgular alkolün lipid bileşimini değiştirdiğini ve lipid peroksidasyonundaki azalmanın bundan kaynaklandığını göstermekte olup bu da alkoliklerde lipid peroksidasyonundaki azalmanın hücre zarı lipid bileşiminin bozulmasından kaynaklanabileceği tarzındaki düşünceleri desteklemektedir.

Tümör hücreleri ile ilgili yapılan bir çalışmada; Moris hepatomlarında oksijen radikal temizleyici enzim içeriği, tümör büyüme hızıyla ters orantılı olarak azalmıştır. Hepatomun mikrozomal membranları normal rat karaciğer membranlarına oranla organik hidroperoksitler veya süperoksit radikalleri tarafından uyarılan lipid peroksidasyonuna karşı daha dirençli bulunmuştur. Tümör hücre membranındaki lipid peroksidasyonunu sınırlayıcı faktör PUFA'lerinin miktarının azlığı ile ilgili bulunmuştur (32).

Kanser hücrelerinde lipid peroksidasyonu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada; tümörün büyüme hızıyla ilgili olarak peroksidasyon derecesinin azaldığı görülmüştür. Peroksidasyona karşı hücrenin duyarlılığının azalması hücrel membranlardaki lipid kompozisyonunun değişmesi özellikle de PUFA'lerinin belirgin derecede azalması ve membranın statik ve dinamik özelliklerinin değişmesiyle açıklanmıştır. Daha önceki çalışmalarda hücrel oksijen radikal temizleyici enzimlerde belirgin derecede bir düşme olduğu bildirilmiştir. Bu veriler in vivo oksijen toksisitesi altında meydana gelen oksijen radikal uyarımlı hasarın sonucunda tümör membranlarının yapısal ve fonksiyonel olarak değiştiğini açıklar (90).

Bu çalışmada fasciolasisli hayvanların plazma MDA düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmadığı, karaciğer MDA düzeylerinde ise kontrollere göre önemli oranda bir düşme meydana geldiği gözlenmiştir. Çalıştığımız

karaciğer dokusunun ileri derecede fibrotik olması, hücre membran yapısının bozulmuş olabileceğini ve bunun da hücrenin lipid peroksidasyonuna karşı direnç sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Plazmada üretilen ve eritrosit hücre membranını geçebilen H_2O_2 ve O_2^- iyonları eritrositlerde toplanır. Bu açıdan eritrositler önemli bir havuzdur. Eritrositlerde H_2O_2 'nin detoksifikasyonunu sağlayan **GSH-Px** ve **CAT**, süperoksit radikallerinin dismutasyonunu sağlayan Cu/Zn-SOD ile vitamin A, C ve E gibi çeşitli antioksidant savunma sistemleri bulunur. Bu savunma sistemlerinin sayesinde toksik hidroksil radikallerinin oluşması engellenir (147).

Peroksizomlar total hücresel H_2O_2 üretiminin en önemli kaynaklarıdır ve peroksizomlar glukolat oksidaz, D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksiasit oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi H_2O_2 üreten enzimleri içermektedir. Peroksizomal katalaz üretilen bu H_2O_2 'i peroksidatif reaksiyonlardaki diğer substratları okside etmek üzere kullanır. Bu tip oksidatif reaksiyonlar özellikle böbrek ve karaciğer hücrelerindeki peroksizomlarda önemlidir (153).

Katalaz, kanser, diabet, katarakt, aterosklerozis, iskemik-reperfüzyon hasarı, artrit, nörodejeneratif hastalıklar, beslenme bozuklukları ve yaşlanmayı içine alan pekçok patolojik şartlarla ilgili olarak ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidant sistemin öncelikli komponentidir (92,164).

F. hepaticanın peroksit metabolizması ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada; F. hepaticanın mitokondrial preparasyonları süksinat ve NADH gibi birtakım substratlar ile inkübasyonu H_2O_2 oluşumuna yol açar. H_2O_2 memeli dokuları için son derece toksik bir bileşik olup, katalaz enzimi tarafından hızla yıkılır. F. hepaticada katalaz enzimi olmadığı için H_2O_2 'i parçalayacak alternatif enzim ihtimali araştırılmıştır. Yapılan araştırmalar sonucu F. hepaticada katalaz, NADH bağlı peroksidaz, NADPH bağlı peroksidaz, lipooksijenaz, GSH-Px ve NAD bağlı GR aktivitesine rastlanılmamıştır. Düşük seviyelerde NADP bağlı GR aktivitesine rastlanılmıştır. Ökaryotlara nazaran prokaryotlarda sitokrom-c ile ilgili peroksidazlar mevcuttur. F. hepaticada SOD aktivitesine rastlanılmıştır. Bu enzim süperoksit anyonlarını oksijen ve H_2O_2 'e parçalar ve bu reaksiyon helmintlerdeki H_2O_2 'in en önemli kaynaklarından biri olabilir (10).

Safra kesesi tıkanıklığında antioksidant enzim durumları ve N-asetilsisteinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada karaciğer glutatyon konsantrasyonları ve TBA konsantrasyonları belirgin derecede artmış buna karşılık mikrozomal ve mitokondriyal membran akışkanlığı, katalaz aktivitesi, sitozolik ve mitokondriyal SOD aktivitesi, glutatyon S-transferaz, sitozolik ve mitokondriyal GSH-Px aktivitesi azalmıştır (121).

Koyunlarda CCl₄ toksisitesinde plazma MDA, GSH-Px ve katalaz aktivite tayini ile ilgili yapılan çalışmada; karaciğer hasarının olduğu plazma bilirubin konsantrasyonu ve AST aktivitesi ile gösterilmiştir. Plazma MDA düzeyleri belirgin derecede yükselmiş, GSH-Px aktivitesi iniş-çıkışlar göstermiş, katalaz aktivitesi ise deney süresince herhangi bir değişiklik göstermemiştir (160).

İnsanlarda hepatosellüler tümör ve karaciğer sirozu ile ilgili yapılan bir çalışmada hepatik neoplazilerde peroksizomal enzim olan katalaz aktivitesinde bir azalma gözlenmiştir. Adenomlar hariç bütün tümör hücrelerinin ektrafokal hepatositlere oranla çok az sayıda peroksizom içerdiği ve tümörün derecesi ile ilgili olarak tümördeki antijenik bölgelerde bir azalma olduğu kaydedilmiştir (82).

Hindistan çocukluk devresi sirozu, karaciğer hücrelerinin şişmesi ve dejenerasyonu ile karakterize olan bakır metabolizmasındaki anormalliklerin görüldüğü bir hastalıktır. Bu hastalıkta antioksidant enzimlerden katalaz aktivitesi sağlıklı kişilere oranla önemli derecede azalmıştır. Moleküler düzeyde yapılan araştırmalar sonucunda DNA fragmentasyonunda bir artış görülmüştür. Nükleusta bakırın birikmesi ve katalaz aktivitesindeki azalma bu hastalıkta görülen hepatositlerdeki DNA fragmentasyonu ile ilgili bulunmuştur (125).

Adriamisin verilerek kronik böbrek yetersizliği oluşturulan ratlarda fibrosis ile ilgili proteinlerin salınımını ve antioksidant enzimler araştırılmıştır. Hayvanlara 20 hafta boyunca adriamisin verilmiş ve ratlarda nefrotik sendrom, tubulo-interstiel fibrosis gelişimi ile ilgili olarak böbrek yetersizliği ve glomerulosklerosis oluşmuştur. Adriamisin enjeksiyonundan 20 hafta sonra böbrek korteks antioksidant enzimlerinden katalaz % 41, Cu-Zn-SOD % 56 ve GSH-Px % 69 oranında aktivite kaybına uğramışlardır (161).

Karaciğerdeki nekroz sonrası onarımın yaşla olan ilgisinin araştırıldığı bir çalışmada, ratlara 96 saat süreyle thioacetamide verilerek hepatosellüler nekroz

oluşturulmuş ve nekroz oluşumunu doğrulamak için serum AST seviyesine bakılmıştır. 96 saatlik deneysel periyodun sonunda MDA, Cu/Zn-SOD ve katalaz aktivitesi yaşlı ratların hepatositlerinde belirgin derecede düşmüştür (137).

Yapılan bir başka çalışmada ratlara 6 ay boyunca haftada 3 kez intra peritoneal tiyoasetamid verilerek hiperplastik nodüler siroz oluşturulmuş ve bazı enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda peroksidlerin eliminasyonundan sorumlu olan enzimlerden katalaz ve GSH-Px 6 aylık intoksikasyonun sonucunda belirgin derecede azalmış, Cu-Zn ve Mn SOD ise toksikasyon süresince artmaya devam etmiştir (138).

İnsan karaciğerinde serbest oksijen radikal temizleyici enzim aktiviteleri ile ilgili yapılan bir çalışmada farklı karaciğer hastalıklı (kronik persistent hepatitis, kronik aktif hepatitis, non-alkolik siroz, alkolik siroz ve akut hepatitis) hastalardan biopsiyle alınan karaciğer örneklerinde SOD, katalaz ve GSH-Px aktiviteleri ölçülmüştür. Kronik aktif hepatit, non-alkolik ve alkolik siroz ve akut hepatitide katalaz aktivitesi kontrollere göre önemli derecede düşük bulunmuştur. GSH-Px aktivitesi ise gruplar arasında önemli bir farklılık göstermemiştir (156).

Deneysel olarak hayvanlara kronik arsenik verilerek karaciğer hasarı oluşturulmuş ve karaciğer dokularında glutasyon, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve GSH-Px enzim aktiviteleri 6 ay sonra kontrollere göre belirgin olarak düşmüş, karaciğer katalaz aktivitesi ise 9. ayda belirgin olarak azalmıştır. Uzun süreli arsenik toksisitesinden dolayı hepatik fibrosis meydana geldiği gösterilmiştir (136).

Fasciolosis sonucu meydana gelen hasara bağlı olarak karaciğer dokusunda katalaz enzim aktivitesinde önemli derecede düşüşler gözlenirken, eritrosit katalaz aktivitesinde bir değişikliğe rastlanılmamıştır. Katalaz aktivitesinin karaciğer dokusundaki düşüşü ile ilgili bulmuş olduğumuz sonuçlar yukarıda örnek verilen pek çok çalışma ile uyum içerisindedir.

H_2O_2 sadece Se bağımlı enzimle ilgili GSH-Px aktivitesini tespit edebilir. Se-bağımsız GSH-Px, H_2O_2 ile tepkimeye girmez, organik hidroperoksit substratlarıyla aktivite gösterir. Total GSH-Px aktivitesi tayininde ise hem Se bağımlı hem de Se bağımsız enzimleri aktive eden t-BOOH kullanılır

(77,122,142). Bu araştırmada GSH-Px enzim tayini için t-BOOH kullanılmış, dolayısıyla total GSH-Px aktivitesi ölçülmüştür.

Cordero ve ark.(20)'ları tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli karaciğer hastalıklarında (steatosis, alkolik hepatitis, hepatik siroz, aktif kronik hepatitis ve şiddetli kronik aktif hepatitis) karaciğer ve eritrosit GSH-Px aktiviteleri ile MDA seviyeleri ölçülmüş ve bu ölçümler sonucunda eritrosit GSH-Px aktivitesi yönünden karaciğer hastalıklarının hiçbir çeşitinde bir değişiklik görülmemiştir. Karaciğerde ise kontrol grubuna göre steatosisde GSH-Px aktivitesi artmıştır. Alkolik karaciğer hastalığının başlangıç aşamasındaki toksik ajanlar tarafından meydana getirilen aktivite artışı karaciğer hasarındaki artış ile açıklanmaktadır. Karaciğer MDA seviyesi ile GSH-Px arasında kontrol grubunda negatif bir korelasyon görülmüştür.

Taurinin karaciğer sirozuna karşı koruyucu etkisini araştırmak amacıyla ratlara Thioacetamide (TAA) verilerek siroz oluşturulmuş ve ratlarda karaciğerde MDA seviyesinin artmış olduğu , glutatyon ve GSH-Px aktivitesinin ise azalmış olduğu bulunmuştur (8).

Yılmaz ve Bağecioğlu (170) yapmış oldukları bir çalışmada CCl₄ ile ratlarda siroz oluşturmuş ve karaciğer dokusunda MDA, GSH-Px, Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve pirüvat kinaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Sirozlu grubun karaciğer MDA düzeylerinin kontrollere göre yüksek, GSH-Px aktivitelerinin, Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitelerinin ise düşük olduğunu bulmuşlardır.

Zidenberg-Cherr ve ark.(173,174) domuzlara 13 ve 20 ay süre ile alkol vermeleri sonucunda karaciğerde GSH-Px aktivitelerinin ve glutatyon konsantrasyonunun düştüğünü göstermişlerdir. GSH-Px aktivitesinin düşük oluşunu düşük glutatyon düzeyine, düşük glutatyon düzeyini ise onun antioksidant rolüne bağlamışlardır.

Ozan ve ark. (113)'ları tarafından yapılan bir çalışmada *Theileria annulata* ile enfekte sığırların eritrositlerinde GSH-Px, glukoz-6-fosfat daehidrogenaz (G6PD) ve arginaz aktivitelerine bakılmıştır. alışmalar sonucunda *Theileria* ile enfekte sığırların eritrosit GSH-Px ve arginaz aktiviteleri kontrol grubuna göre düşerken, G6PD aktivitelerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

Ruminantların karaciğer dokusu antioksidant enzim (katalaz, GSH-Px) ve lipid peroksidasyon (MDA) düzeyleri üzerine tür ve cinsiyetin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; en yüksek karaciğer GSH-Px aktivitesi sığırlarda, en yüksek katalaz aktivitesi koyunlarda, en yüksek MDA düzeyleri ise keçilerde saptanmıştır. Erkek ve dişiler arasında yapılan karşılaştırmalarda ise karaciğer GSH-Px aktivitesi dişi sığırlarda, MDA düzeyi erkek koyunlarda, katalaz aktivitesi dişi koyunlarda daha yüksek bulunmuş olup, tür ve cinsiyetler arasındaki bu farklılığın farklı oksidant hasar mekanizmalarından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (169).

Yağlı karaciğer ile ilgili yapılan bir çalışmada, ratlar deneysel olarak alkol ile beslenmiş ve karaciğer glutatyon S-transferaz aktivitesi, GSH-Px aktivitesi, lipid peroksid ve glutatyon içeriği ölçülmüştür. Karaciğer glutatyon içeriği 2. haftada azalıp, 6. haftada artmış, karaciğer lipid peroksidasyon içeriği 4-6. haftalarda artmış, GSH-Px aktivitesi 4. haftada artmıştır. Karaciğer GSH-Px aktivitesindeki artışın lipid peroksid üretimiyle ilgili olabileceği şeklinde yorum getirilmiştir (83).

F. hepatica ile ilgili olarak yapmış olduğumuz bu çalışmada, eritrosit GSH-Px enzim aktivitesinde sağlıklı ve fasciolasisli hayvanlar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamazken, karaciğer GSH-Px enzim aktivitesinin fasciolasisli hayvanlarda önemli derecede arttığı bulunmuştur. Artışla ilgili bulduğumuz bu sonuçlar Cordero ve ark.'ları tarafından yapılan çalışma ile uyum içerisindedir.

6. ÖZET

Fasciola hepatica koyunlarda sık olarak görülen ve karaciğerde harabiyete neden olan paraziter bir hastalıktır. Çalışmamızda kronik fasciolasis sonucu oluşan hepatik fibrosis ve sirozlu koyunlarda;

-Eritrosit ve karaciğer arginaz enzim düzeyleri ile karaciğer arginaz enziminin biyokimyasal özellikleri,

-Serbest radikal hasarının göstergesi olarak plazma ve karaciğer lipid peroksidasyon düzeyleri,

- Nitrik oksit göstergesi olarak serumda ve karaciğerde total nitrit düzeyleri,

-Antioksidant savunma sistemlerinden eritrosit ve karaciğerde katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivite düzeyleri ölçülmüştür.

Nitrit tayininde Griess, arginaz tayininde Tiyosemikarbazid-Diasetilmonoksim-Üre (TDMU), katalaz tayininde Aebi, glutatyon peroksidaz tayininde Beutler, plazma malondialdehid düzeyi tayininde Satoh ve Yagi'den modifiye edilen metot, doku malondialdehid düzeyi tayininde Ohkawa ve ark.'larının geliştirdiği metot, protein tayininde Lowry, hemoglobin tayininde siyanomethemoglobin metodu kullanılmıştır.

Sonuçta;

-Sağlıklı ve fasciolasisli koyunların eritrosit arginaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve plazma malondialdehid ile serum nitrit düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($P > 0.05$).

-Karaciğer arginaz enziminin biyokimyasal özellikleri fasciolasisli ve sağlıklı koyunlar arasında fark göstermemiştir. Koyun karaciğer doku arginazının aktivasyonu için ; 1 mM Mn^{+2} iyonlarının varlığı, 65 °C'de 15 dakika preinkübasyonun gerekliliği saptanmıştır. Karaciğer doku arginaz enzimi için en uygun tampon karbonat tamponu olup, optimal pH:10 civarında bulunmuştur. Enzimin substratı olan L-arginine karşı K_m 'i Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk yöntemleri ile bulunmuş olup, 4 mM civarındadır.

Fasciolasisli karaciğer dokusunda arginaz, katalaz enzim aktivite düzeyleri ile malondialdehid ve nitrit düzeyleri düşmüş, glutatyon peroksidaz aktiviteleri artmıştır ($P < 0.01$).

Lipid peroksidasyonundaki düşüş, ileri derecedeki fibrosis sonucu hücre zarının yapısındaki doymamış yağ asitlerinin azalmasından, arginaz ve katalaz aktivitesindeki düşüşler de karaciğerdeki fibrotik doku artışından kaynaklanabilir. Karaciğerde nitrit düzeyindeki azalma karaciğer endotel hücreleri ve hepatositlerdeki hasardan, glutatyon peroksidaz aktivitesindeki artış karaciğer harabiyetinden ileri gelebilir.



7. SUMMARY

Fasciola hepatica is a parasiter disease which is often seen in sheep and causes liver injury. In the study of sheep with cirrhosis and fibrosis which is come into being by chronic fasciolasis;

- Levels of arginase enzyme in erythrocyte and liver and biochemical features of arginase enzyme in liver,
- Levels of lipid peroxidation in plasma and liver as an indication of free radical damage,
- Levels of total nitrit in serum and liver as an indication of nitric oxide,
- Enzyme activity levels of catalase and glutathione peroxidase which are from antioxidant defence system are measured.

The method of Griess was used for measuring levels of nitrit; Tiyosemicarbazide-Diasetilmonoxim-Urea (TDMU) method for activity of arginase; Aebi method for activity of catalase; Beutler method for activity of glutathione peroxidase; a modified method of Satoh and Yagi for plasma levels of MDA; the Ohkawa et al. method for tissue levels of MDA; The Lowry method for protein concentration and siyanomethemoglobin method for concentration of hemoglobin.

In the conclusion;

- Any differences can not be found between erythrocyte arginase, catalase, glutathione peroxidase and plasma malondialdehyde and levels of serum nitrit of healty sheep ($P > 0.05$).

There is no difference between healty sheep and sheep with fasciolasis for biochemical features of liver arginase enzyme. It was determined that presence of 1 mM Mn^{+2} ions, 15-minute-preincubation at 65 °C and 10 minute-incubation at 37 °C are necessary for activation of arginase in liver tissue of sheep. The most suitable buffer for enzyme of arginase in liver tissue is bicarbonate buffer and it was found about optimal pH:10. Km which is against L-arginine-substrat of enzyme-was found by the method of Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk and it is about 4 mM.

-While levels of arginase, catalase enzyme activity and nitrit and malondialdehyde in liver with fasciolasis decrease, glutathione peroxidase activity increases ($p < 0.01$).

Decrease in lipid peroxidation can be come into being decreasing pollyunsaturated fatty acids in structure of cell membrane as a result of excessive fibrosis. Decrease in activities of arginase and catalase can be come into existence from increasing of fibrotic tissue in liver. Decrease in level of nitrit in liver can be come into being from damage endothelial cells and hepatocytes in liver. Increase in activity of glutathione peroxidase can be come into being from liver injury.

8. KAYNAKLAR

- 1-Aebi H. (1984). Catalase. In Vitro. Methods in Enzymology. 105: 121-126.
- 2-Alibaşoğlu M ve Yeşildere T. (1988). Patoloji, İ.Ü.Vet. Fak. Pethask Yayınları, İstanbul.
- 3-Aminlari M. (1992). Novel Colorimetric Method for Assaying Arginase Activity. Clin Biochem. 25: 431-436.
- 4-Aminlari M, Vaseghi T. (1992). Arginase Distribution in Tissues of Domestic Animals. Comp. Biochem. Physiol, Vol. 103B, No.2: 385-389.
- 5-Aykan T B, Tüzüner N, Sav A, İnce Ü. (1990). Kısa Patoloji. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul.
- 6-Aytuğ C N, Alaçam E, Özkoç Ü, Yalçın B C, Türker H, Gökçen H. (1990). Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği. Tüm-Vet Hay. Hizm. Yay. N0:2. İstanbul.
- 7-Bahk E. (1986). Doku İncinmesi ve Yangısal Olaylarda Oksijen Serbest Radikallerinin Önemi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 25 (2): 809-815.
- 8-Balkan J, Dogru-Abbasoglu S, Kanbagli O, Cevikbaş U, Aykac-Toker G, Uysal M. (2001). Taurine has a Protective Effect Against Thioacetamide-Induced Liver Cirrhosis by Decreasing Oxidative Stress. Hum Exp Toxicol. 20 (5): 251-4.
- 9-Barnes P J, Belvisi M G. (1993). Nitric Oxide and Lung Disease: Thorax. 48: 1034-1043.
- 10-Barrett J. (1980). Peroxide Metabolism in the Liver Fluke, Fasciola hepatica. J Parasitol. 66 (4): 697.
- 11-Bassenge E. (1994). Coronary Vasomotor Responses: Role of Endothelium and Nitrovasodilators. Cardiovasc Drugs Ther (USA). 8 (4): 601-10.
- 12-Beckman J and Tsai J H. (1994). Reactions and Diffusion of Nitric Oxide and Peroxynitrite. The Biochemist. 16 (5): 8-10.
- 13-Beutler A. (1975). A Manual of Biochemical Methods. 2nd Ed. Grunef Strottan, New York.
- 14-Bulđın M S, Anderson B C (1984). Serum Gamma Glutamyl Transpeptidase Activity in Cattle with Induced Fasciolasis. Res. Vet. Sci. 37: 167-171.
- 15-Cendan J C, Topping D L, Pruitt J, Snowdy J, Copeland E M, Lind D S. (1996). Inflammatory Mediators Stimulate Arginine Transport and Arginine-

Derived Nitric Oxide Production in a Murine Breast Cancer Line. *J. Surg. Res. USA.* 60 (2): 248-288.

16-Cervi L, Rossi G, Cejas H, Masih D T. (1998). Fasciola hepatica-Induced Immune Suppression of Spleen Mononuclear Cell Proliferation: Role of Nitric Oxide. *Clin Immunol Immunopathol.* 87 (2): 145-154.

17-Cheeseman K H, Slater T F. (1993). An Introduction to Free Radical Biochemistry. *British Medical Bulletin.* 49: 481-493.

18-Chinard F P. (1952). Photometric Estimation of Proline and Ornithine. *J. Biol. Chem.* 199: 91-95.

19-Colombo J P, Konarska L. (1984). Arginase. In: Bergmeyer, Grabl M (Eds). *Methods of Enzymatic Analysis.* 3 rd. Ed. Weinheim: Vertag Chemic. 285-294.

20-Cordero R, Ortiz A, Hernandez R, Lopez V, Gomez M M, Mena P. (1996). Hepatic and Erythrocytic Glutathione Peroxidase Activity in Liver Diseases. *Rev Esp fisiol.* 52 (3): 167-72.

21-Cornelius C E. (1980). Liver Function, in Kaneko J J (ed). *Clinical Chemistry of Domestic Animals,* ed 3. New York, Academic Pres Inc, pp 201-257.

22-Corraliza I M, Soler G, Eichmann K, Modolell M. (1995). Biochemical and Biophysical Research Communications. 206: 667-673.

23-Dawson V L. (1995). Nitric Oxide: Role Neurotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol (Australia).* 22 (4): 305-8.

24-De Haan J D, Bladier C, Griffiths P et al. (1998). Mice With a Homozygous Null Mutation for the Most Abundant Glutathione Peroxidase, Gpx1, Show Increased Susceptibility to the Oxidative Stress-Inducing Agents Paraquat and Hydrogen Peroxide. *J Biol Chem.* 273: 22528-36.

25-Dimmeler S, Brune B. (1992). Characterization of a Nitric-Oxide-Catalysed ADP-Ribosylation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 210: 305-310.

26-Düzgüneş O, Kesici T ve Gürbüz F. (1983). İstatistik Metotları. I. A. Ü. Ziraat Fak. Yayınları. No:861, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.

27-Edwards A D. (1995). The Pharmacology of Inhaled Nitric Oxide. *Arch Dis Child* 72: F127-130.

- 28-Erişir M, Ozan S T. (1999).** Sığır Doku Rumen Arginazının Saflaştırılmasından Önce ve Saflaştırılmasından Sonra Bazı Özellikler. *Tr J of Veterinary and Animal Sciences* 23/3: 597-608.
- 29-Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, Palazzetti B, Tallet D, Soldato P and Morelli A. (2001).** NCX-1000, a NO-Releasing Derivate of Ursodeoxycholic Acid, Selectively Delivers NO to the Liver and Protects Against Development of Portal Hypertension. *Physiology*. 98 (15): 8897-8902.
- 30-Fostermann U, Closs E I, Pollock J S et al. (1994).** Nitric Oxide Synthase Isozymes: Characterisation, Purification, Molecular Cloning and Functions. *Hypertension*. 23: 112-131.
- 31-Freeman B A, Crapo J D. (1982).** Biology of Disease, Free radicals and Tissue Injury. *Lab Invest*. 47: 412-426.
- 32-Galeotti T, Masotti L, Borello S, Casali E. (1991).** Oxy-Radical Metabolism and Control of Tumour Growth. *Xenobiotica*. 21 (8): 1041-51.
- 33-Geyer J W and Dabich D. (1971).** Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Analytical Biochemistry*, Vol. 39(2): 412-417.
- 34-Guarner C, Sorino G, Tomas A, Bulbero O, Novella M T, Balonza et al. (1993).** Increased Serum Nitrate and Nitrite Levels in Patients with Cirrhosis; Relationship to Endotoxemia. *Hepatology*. 18: 1139-1143.
- 35-Gupta T K, Toruner M, Chung M K, Groszmann R J. (1998).** Endothelial Dysfunction and Decreased Production of Nitric Oxide in the Intrahepatic Microcirculation of Cirrhotic Rats. *Hepatology*. 28 (4): 926-31.
- 36-Gutteridge J M C, Halliwell B. (1990).** The Measurement and Mechanism of Lipid Peroxidation During the in Vivo Aging of Human Erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 937: 480-489.
- 37-Gürsu M F. (1993).** Çeşitli Türlerin Humor Vitreuslarında Üre ve Kaynaklarının Araştırılması. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi.

- 38-Gürsu M F, Doğrul M, Ozan T S. (1997).** Çeşitli Türlerde Plazma Üre Düzeyleri İle Eritrosit Arginazları Arasındaki İlişki. F.Ü. Sağlık Bil Dergisi. 11 (1): 91-98.
- 39-Halifeoğlu İ. (1993).** İnsan Karaciğer, Eritrosit ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- 40-Halliwell B. (1991).** Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. Am J Med. 91: 14-21.
- 41-Halliwell B. (1994).** Free Radicals, Antioxidants and Human Disease: Curiosity, Cause, Consequence? The Lancet. 344: 721-4.
- 42-Halliwell B, Gutteridge J M C. (1989).** Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd ed, Clarendon Press, Oxford.
- 43-Harris B E, Pretlow T P, Bradley E L. (1983).** Arginase Activity in Prostatic Fluid of Patients With Benign Prostatic Hyperplasia and Prostatic Carcinoma. Cancer Res. 43(6): 3008-3012.
- 44-Ignorra L J. (1990).** Biosynthesis and Metabolism of Endothelium-Derived Nitric Oxide: Annu Rev Pharmacol Toxicol. 30: 535-560.
- 45-Ignorra L J. (1990).** Nitric Oxide. A Novel Signal Transduction Mechanism for Transcellular Communication. Hypertension (USA). 16 (5): 477-83.
- 46-Ikemoto M, Tabata M, Murachi T and Totani M. (1989).** Purification and Properties of Human Erythrocyte Arginase. Ann Clin Biochem. 26 (6): 547-553.
- 47-Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakagawa Y. (1998).** Suppression of Leukotriene Formation in RBL-2H3 Cells that Overexpressed Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase. J Biol Chem. 273: 1990-7.
- 48-Isseroff H, Tunis M, Read C P. (1972).** Changes in Amino Acide of Bile in F. hepatica Infections. Comp Biochem Physiol. 41B: 157-163.
- 49-Isseroff H, Joseph T, Sawma and Remo D. (1977).** Fasciolasis: Role of Proline in Bile Duct Hyperplasia. Science. 198: 1157-1159.
- 50-İlhan N, Gülen Ş. (1993).** Tiroid Arginaz Enzim Aktivitesinin Farklı Metal İyonları Varlığında Isıya Karşı Stabilitesi. Biyokimya Dergisi. 4: 59-67.

- 51-Jackson J M, Beaudet A L, O'Brien W E. (1986).** Mammalian Urea Cycle Enzymes. *Ann Rev Genet.* 20: 431-464.
- 52-Jeanette E, Isseroff H. (1974).** Prolin in Fasciolasis: 1. Comperative Activities of Ornithine - γ -Transaminase and Prolin oxidase in Fasciola and in Mamalian Livers. *Journal of Parasitology.* Vol.60: 574-577.
- 53-Jenkinson C P and Grigor M R. (1994).** Rat Mammary Arginase; Isolation and Characterization. *Biochem. Med and Met Biol.* 51: 156-165.
- 54-Jubb K V F, Kennedy P C. (1970).** Pathology of Domestic Animals. Academic Press. Inc. New York.
- 55-Kağan V E. (1988):** Lipid Peroxidation in Biomembranes. 55-111, CRC Press Inc., Florida.
- 56-Kaplan L A. (1987).** Urea. 22-27. Ed. Pesce A.J., Kaplan L.A. In: 'Methods in Clinical Chemistry'. The C.V. Mosby Company, St. Louis, Washington D.C, Toronto.
- 57-Kedra-Luboiniska M, Zamecka E, Porembaska Z. (1988).** The Isolation and Immunological Properties of Two Arginase Forms from Human Erythrocytes. *Biochem Med and Met Biol.* 39: 247-257.
- 58-Kılınc K. (1985).** Oksijen Radikalleri, Üretilmeleri, Fonksiyonları, Toksik Etkileri. *Biyokimya Dergisi.* 10: 60-89.
- 59-Kiechle FL, Malinski T. (1993).** Nitric Oxide Biochemistry, Pathophysiology and Detection. *Clin Chem.* 100: 567-575.
- 60-King J. (1965).** Arginase. *Practical Clinical Enzymology* . D van Nostrand Company, London, 220-225.
- 61-Klebanoff S J. (1980).** Oxygen Metabolism and Toxic Properties of Phagocytes. *Ann Int Med.* 93: 480-9.
- 62-Knight J A. (1995).** Diseases Related to Oxygen-Derived Free Radicals. *Ann Clin Lab Sci.* 25: 111-121.
- 63-Knowles R. (1994).** Nitric Oxide Synthases. *The Biochemist.* 16 (5): 3-6.
- 64-Known N S, Stuehr D J, Nathan C F. (1991).** Inhibition of Tumor Cell Ribonucleotide Reductase by Macrophage Derived Nitric Oxide. *J Exp Med.* 174: 761-8.

- 65-Kodowaki H, Nesheim M C. (1978).** An Assay for Arginase in Chicken Kidney. *Comp. Biochem. Physiol.* 61B: 281-285.
- 66-Konarska L and Tomaszewski L (1986).** Studies on L-Arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. I. Ontogenic Evolution of Arginase Isoenzymes. *Biochem Med and Met Biol.* 35:156-159.
- 67-Konarska L, Tomaszewski L, Colombo J P, Terheggen H G. (1985).** Human Salivary Arginase and Its Deficiency in Argininaemia. *J Clin Chem Clin Biochem.* vol.23: 337-342.
- 68-Konarska L, Tomaszewski L, Rolczyk U. (1986).** Studies on L-arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney. II. Effect of Hydrokortisone and Thyroxine. *Biochem. Med and Met Biol.* 35(2): 170-178.
- 69-Koza R A, Megosh L C, Palmieri M, O'Brien T G. (1991).** Constitutively Elevated Levels of Ornithine and Polyamines in Mouse Epidermal Papillomas. *Carcinogenesis*, 12(9): 1619-1625.
- 70-Köroğlu E. (2000).** Veteriner Helminтологи Ders Notları. No:41. Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi. Elazığ.
- 71-Köse K, Doğan P. (1992).** Lipid Peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi Ek-1:* 340-350.
- 72-Kubes P, Suzuki M, Granger D M. (1991).** Nitric Oxide; An Endogenous Modulator of Leucocyte Adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 4651-4655.
- 73-Kuhn N J, Talbot J, Ward S. (1991).** PH-Sensitive Control of Arginase by Mn (II) Ions at Submicromolar Concentrations. *Archs Biochem and Biophys.* 286 (1): 217-221.
- 74-Kurelec B. (1975).** Molecular Biology of Helminth Parasites. *The Int J Biochem.* 6: 375-386.
- 75-Lamoureux G, Bourbeau S, Dubais G, Charbonneau R, Gagnon M and Grad B R. (1987).** A Rapid Method for Determining Catalase in Human Blood. *Clin Chim Acta.* 167: 105-111.
- 76-Laurie D, Kaplowitz D N. (1991).** Glutathione Metabolism and Its Role in Hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 52: 287-305.

- 77-Lawrence R A, Burk R F. (1978).** Species Tissue and Subcellular Distribution of Non Se-Dependent Glutathione Peroxidase Activity. *J Nutr.* 108: 211.
- 78-Lei X G, Evenson J K, Thampson K M and Sunde R A. (1995).** Glutathione Peroxidase and Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase are Differentially Reulated in Rats by dietary Selenium. *J Nutr.* 125: 1438-1446.
- 79-Lepoivre M, Feischi F, Coves J, Thelander L, Fontecave M. (1991).** Inactivation of Ribonucleotide Reductase by Nitric Oxide. *Biochem Biophys Res. Commun.* 179: 442-8.
- 80-Leu S Y, Wang S R, (1992).** Clinical Significance of Arginase in Colorectal Cancer. *Cancer,* 70 (5): 733-736.
- 81-Lin J Y, Chadee K. (1992).** Macrophage Cytotoxicity Against *Entamoeba histolytica* Trophozoites is Mediated by Nitric Oxide from L-arginin. *J Immunol.* 148: 3999-4005.
- 82-Litwin J A, Beier K, Volkl A, Hofmann W J, Fahimi H D. (1999).** Immunocytochemical Investigation of Catalase and Peroxisomal Lipid Beta-Oxidation Enzymes in Human Hepatocellular Tumors and Liver Cirrhosis. 435 (5): 486-95.
- 83-Lizuka J, Sato J, Sugimoto M. (1991).** Glutathione S-Transferase in Alcoholic Fatty Liver. *Arukuro Kenkyuto Yakabutsu Ison.* 26 (5): 428-446.
- 84-Loscalzo J, Welch G. (1995).** Nitric Oxide and Its Role in the Cardiovasculer System. *Prog Cardiovasc Dis (USA).* 38 (2): 87-104.
- 85-Lowenstein C J, Dinerman J L, Synders S H. (1994).** Nitric Oxide: A Physiologic Messenger. *Ann Intern Med.* 120: 227-237.
- 86-Lowry By O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. (1951).** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent . *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- 87-Luboinska M K, Zamecke E, Porembska Z. (1988).** The Isolation and Immunological Properties of Two Arginase Form Human Erythrocytes. *Biochem Med and Metab Biol.*39: 247-257.
- 88-Lunec J, Blake D. (1990).** Oxygen Free Radicals: Their Relevance to Disease Processes. In: Cohen RD, Lewis B, Albert KGMM. *The Metabolic and Moleculer Basis of Acquired Disease.* Balliere Tindall, London. 189-212.

- 89-Lyall F, Young A, Greer I A. (1995).** Nitric Oxide Concentrations are Increased in the Fetoplacental Circulation in Preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 173 (3): 714-718.
- 90-Masotti L, Casali E, Gesmundo N, Sartor G, Borello S, Piretti M V, Pagliuca G. (1988):** Lipid Peroxidation in Cancer Cells: Chemical and Physical Studies. *Annals N Y Acad Sci.* 551: 47-57.
- 91-Masotti L, Casali E, Gesmundo N, Sartor G, Cavatorta P, Borello S, Galeotti T. (1989).** Lipid Peroxidation and Physical Properties of Smooth and Rough Hepatoma Micromes. *Cell Biophys.* 14 (1): 53-65.
- 92-Mates J M, Sanchez-Jimenez F. (1999).** Antioxidant Enzymes and their Implications in Pathophysiologic Processes. *Front Biosci.* 15: 339-45.
- 93-Mc Cord, J M. (1983).** The Superoxide Free Radical: Its Biochemistry and Pathophysiology. *Surgery.* 94 (3): 412-414.
- 94-Mc Cord, J M. (1985).** Mechanism of Disease, Oxygen-Derived Free Radicals in Post Ischemic Tissue Injury. *The New Eng J Med.* 312: 159-163.
- 95-Menkes M S (1986):** Serum Beta-Carotene, Vitamin A and E, Selenium and the Risk of Lung Cancer. *The New Eng J Med.* 315: 1250-1254.
- 96-Moncada S. (1992).** The L-Arginine; Nitric Oxide Pathway. *Acta Physiol Scand.* 143: 201-227.
- 97-Moncada S, Higgs A. (1993).** Mechanism of Disease. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *The New Eng J Med.* 30: 2002-2012.
- 98-Moncada S, Palmer R M J, Higgs E A. (1991).** Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43 (2): 109-142.
- 99-Moncada S, Palmer R M J, Higgs E A. (1991).** Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacol Reviews.* 43 (9): 109-137.
- 100-Munoz-Fernandez M A, Fernandez M A, Fresno M. (1992).** Synergism Between Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interferon-Gamma on Macrophage Activation for the Killing of Intracellular *Trypanosoma cruzi* Through a Nitric Oxide-Dependent Mechanism. *Eur J Immunol.* 22: 301-307.
- 101-Muszynska G. (1976).** Immobilization of Rat Liver Arginase. *C.I. Biospecific Chromatography.* 633-637, *Protides of Biological Fluids* 23 RD. Collogium, Pergamon Pres- Oxford and New York.

- 102-Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. (1996).** Pathological Aspect of Active Oxygens / Free radicals. *Japan. Journal of Physiology.* 46: 15-32.
- 103-Nathan C. (1992).** NO as a Secretary Product of Mammalian Cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
- 104-Nikumb S K, Santhanam K, Rama K, Rao M V. (1987).** Hepatic and Serum Arginase and Ornithine Transcarbamylase Activities of Rats Maintained on Diets of Different Protein Quality. *Ann. Nut Metab.* 31: 387-394.
- 105-Noonan N E, Meyer D J. (1979).** Use of Plasma Arginase and γ -glutamyl Transpeptidase as Spesific Indicators of Hepatocellular or Hepatobiliary Disease in Dogs. *Am J Vet Res.* 40: 942-947.
- 106- O'Donnell C, Liew E. (1994).** Immunological Aspects of Nitric Oxide. *The Biochemist.* 16 (5): 19-21.
- 107-Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979).** Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem.* 95: 351-358.
- 108-Olesen J, Thomsen L L, Iversen H. (1994).** Nitric Oxide is a Key Molecule in Migraine and Other Vascular Headaches. *Trends Pharmacol Sci (England).* 15 (5): 149-53.
- 109-Ozan S, Gülen Ş. (1987).** Fasciola hepatica Enfeksiyonu Sonucu Oluşan Sirotik Sığır Karaciğer ve Plazmalarında Bazı Amino Asit Metabolizması Enzim Düzeyleri Üzerinde Çalışmalar. *Fırat Üniversitesi Dergisi (Sağlık Bilimleri) 1, (1-A):* 113-126.
- 110-Ozan S, Gülen Ş. (1989).** Sığır Tükürüğünde Arginaz Enzimi ve Özelliklerinin Tükürük Bezleri, Eritrosit ve Karaciğer Arginazları ile Karşılaştırılması. *Doğa TU Vet ve Hay Der. Cilt* 13-2.
- 111-Ozan S, Gürsu M F, Gülen Ş. (1993).** Kısmen Arıtılmış *Moniezia expansa* Arginazının Bazı Özellikleri. *Doğa Tr J of Veterinary and Animal Sciences.* 17: 245-250.
- 112-Ozan S, Gürsu M F, Bayraktutan U, Gülen Ş. (1990).** Farklı Türlerin Eritrositlerindeki Arginaz Aktivitesi ile Üre Düzeyleri Arasındaki İlişki. *Cumhuriyet Üniv Tıp Fak 1. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi; Sivas.*
- 113-Ozan T S, Yaralıoğlu S, Yılmaz S, Özer E, Şaki E C, Sevgili M. (1999).** *Theileria annulata* ile Enfekte Sığırlarda GSH-Px, G6PD, Arginaz Aktiviteleri ile

Bazı Biyokimyasal Parametreler. Tr J of Veterinary and Animal Sciences. 23 (3): 553-557.

114-Öğüş İ H, Balk M, Aksoy Y, Müftüoğlu M, Özer N. (1998). The Effects of Oxidative Stress on the Redox system of the Human Erythrocyte. Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants. Plenum Press, New York.

115-Özdemir N, Gürsu M F, Gülen Ş. (1987). Akkaraman, Morkaraman ve İvesi Koyunlarının Eritrositlerinde ve Tükürüklerindeki Arginaz Aktiviteleri Arasındaki İlişki. Biyokimya Dergisi. Kongre Özel Sayısı. Vol: XII, No: 2.

116-Özdemir N, Ozan S. (1991). M. benedeni Arginazının Bazı Biyokimyasal Özellikleri. 7. Ulusal Parazitoloji Kongresi; Girne-Kıbrıs.

117-Özdemir Y, Ozan S, Özdemir N, Gürsu F, Halifeoğlu İ, Gülen Ş. (1988). The Evaluation of Methods Used for the Measurement of Arginase Activity. 1. Marmara Tıp Günleri, Biyokimya Seksiyonu, 11.

118-Paakkari I, Lindsberg P. (1995). Nitric Oxide in the Central Nervous System. Ann Med (England). 27 (3): 369-77.

119-Palmer R M J, Asthon D S, Moncada S. (1988). Vascular Endothelial Cells Synthesize Nitric Oxide from L-arginine. Nature. 333: 664-666.

120-Pamukçu M. (1968). Veteriner patoloji. Cilt 1, A.Ü. Basımevi.

121-Pastor A, Collado P S, Almar M, Gonzalez-Gallego J. (1997). Antioxidant Enzyme Status in Biliary Obstructed Rats: Effects of N-Acetylcysteine. J Hepatol. 27 (2): 363-370.

122-Pehrson B. (1985). Selenium-Dependent and Non-Selenium Dependent Glutathione Peroxidase Activity in Tissues From Young Bulls. Zbl Vet Med A. 32: 488-491.

123-Porembska Z, Kedra M. (1975). Early Diagnosis of Myocardial Infarction by Arginase Activity Determination. Clin Chem Acta. 60(3): 355-361.

124-Porembska Z, Zamecka E. (1984). Immunological Properties of Rat Arginases. Acta Biochimica Polonica. 31 (2): 223-227.

125-Prasad R, Kaur G, Nath R, Walia B N. (1996). Molecular Basis of Pathophysiology of Indian Childhood Cirrhosis: Role of Nuclear Copper Accumulation in Liver Mol Cell. Biochem: 156 (1): 25-30.

- 126-Pryor W A. (1986).** Oxy-Radicals and Related Species: Their Formation, Lifetimes and Reactions. *Annu Rev Physiol.* 48: 657-667.
- 127-Radomski M W, Palmer R M S, Moncada S. (1987).** Endogenous Nitric Oxide Inhibits Human Platelet Adhesion to Vascular Endothelium. *Lancet.* 2: 1057-58.
- 128-Radomski M W, Palmer R M S, Moncada S. (1990).** Characterization of the L-Arginine:Nitric Oxide Pathway in Human Platelets. *Br J Pharmacol.*101: 325-8.
- 129-Rather S. (1955).** Enzymatic Synthesis of Arginase (Condensing and Splitting Enzymes). In *Methods in Enzymology.* Academic Pres Inc. 2:359-364.
- 130-Reyero C, Dorner F. (1975).** Purification of Arginases from Human-Leukemic Lymphocytes and Granulocytes: Study of Their Physicochemical and Kinetic Properties. *Eur J Biochem.* 56: 137-147.
- 131-Reynolds E S. (1968).** Liver Parenchymal Cell Injury. I. Initial Alterations of the Cell Following Poisoning with Carbon Tetrachloride. *J Cell Biol.* 19: 139-157.
- 132-Ribiere C, Hininger I, Rovach H, Nordmann R. (1992).** Effects of Chronic Ethanol Administration on Free Radical Defence in Rat Myocardium. *Biochemical Pharmacology.* 44 (8): 1495-1500.
- 133-Rockey D C, Chung J J. (1998).** Reduced Nitric Oxide Production by Endothelial Cells in Cirrhotic Rat Liver: Endothelial Dysfunction in Portal Hypertension. *114(2):* 344-351.
- 134-Rodvell V W. (çeviri: G. Menteş):** Proteinlerin ve Amino Asidlerin Metabolizması. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodvell VW (Eds.). Harper'ın Biyokimyası'nda. İstanbul. Barış Kitabevi, 1993: 336-391.
- 135-Ros J, Jimenez W, Lamas S, Claria J, Arroga V, Rodes J. (1993).** Increased Vascular Nitric Oxide Synthase (NOS) Activity in Aortic Segments of Rats with Cirrhosis and Ascites. *J Hepatol.* 18 (1): S14.
- 136-Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Charkaborty S K, Mazumder D N. (2000).** Hepatic Damage caused by Chronic Arsenic Toxicity in Experimental Animals. *J. Toxicol Clin Toxicol.* 38 (4): 395-405.

- 137-Sanz N, Diez-Fernandez C, Cascales M. (1998).** Aging Delays the Post-Necrotic Restoration of Liver Function. *Biofactors*. 8 (1-2): 103-109.
- 138-Sanz N, Diez-Fernandez C, Fernandez-Simon L, Alvarez A, Cascales M. (1995).** Relationship Between Antioxidant Systems, Intracellular Thiols and DNA Ploidy in Liver of Rats During Experimental Cirrhogenesis. *Carcinogenesis*. 16 (7): 1585-1593.
- 139-Sato I, Morita I, Kaji K, Ikeda M, Nagao M, Murota S. (1993).** Reduction of Nitric Oxide Producing Activity Associated with in Vitro Aging in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cell. *Biochem and Biophys Res Comm*. 195: 1070-1076.
- 140-Satoh K. (1978).** Serum Lipid Peroxide in Cerebrovascular Disorders Determined by a New Colorimetric Method. *Clin Chim Acta*. 90: 37-43.
- 141-Schimke R T. (1962).** Adaptive Characteristics of Urea Cycle Enzymes in the Rat. *J Biol Chem*. 237 (2): 459-467.
- 142-Scholz R W, Cook L S, Todhunter D A. (1981).** Distribution of Selenium-Dependent Nonselenium-Dependent Glutathione Peroxidase Activity in Tissues of Young Cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 42 (10): 1724-1729.
- 143-Sies H. (1991).** Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. *Am J med*. 91:3C31S-3C38S.
- 144-Skrzypek-Osiecka I, Robin Y, Poremska Z. (1983).** Purification of Rat Kidney Arginases A₁ and A₄ and their Subcellular Distribution. *Acta Biochimica Polonica* 30 (1) : 84-92.
- 145-Sondaç Ü. (1991).** Orak Hücre Hastalığında Eritrosit Arginaz Aktivitesi ve Karbamilasyonun Etkisi. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.
- 146-Spector E B, Rice S C H, Moedjono S, Bernard B, Cederbaum S D. (1982).** Biochemical Properties of Arginase in Human Adult and Fetal Tissues. *Biochemical Medicine* 28: 165-175.
- 147-Strange R C, Jones P, Bieknell J, Scarpello J. (1992).** Expression of CuZn Superokside Dismutase and Glutathione Peroxidase in Erythrocyte from Diabetic and Non-Diabetic Subject. *Clin Chim Acta*. 207: 261-263.

- 148-Sunde R A. (1990).** Molecular Biology of Selenoproteins. *Annu Rev Nutr.* 10: 451-474.
- 149-Tappel A L. (1972).** Free Radical Peroxidation of Lipids. *Ann N Y Acad Sci.* 203: 12-28.
- 150-Tayeh M A, Marletta M A. (1989).** Macrophage Oxidation of L-Arginin to Nitric Oxide, Nitrite and Nitrate: Tetrahydrobiopterin is Required as a Cofactor. *J Biol Chem.* 264: 19654-58.
- 151-Taylor-Robinson A W, Severn A, Phillips R S. (1996).** Kinetics of Nitric Oxide Production During Infection and Reinfection of Mice with Plasmodium Chabaudi. *Parasite-Immunology.* 18-8: 425-30.
- 152-Terheggen H G, Lavinha F, Colombo J P. (1972)** Familial Hyperargininemia. *J Genet Hum.* 20:69-84.
- 153-Thannickal V J, Fanburg B L. (2000).** Reactive Oxygen Species in Cell Signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mo Physiol.* 279: L1005-L1028.
- 154-Tietz N W. (1986).** Textbook of Clinical Chemistry. WB. Saunders Company, Philadelphia, pp 1532-1534.
- 155-Tietz N W. (1990).** Clinical Guide to Laboratory Tests. Ed. NW. Tietz. WB Saunders Company, Philadelphia.
- 156-Togashi H, Shinzawa H, Wakabayashi H, Nakamura T, Yamada N, Takahashi T, Ishikawa M. (1990).** Activities of Free Oxygen Radical Scavenger Enzymes in Human Liver. *J Hepatol* 11 (2): 200-205.
- 157-Toker N K. (1990).** Oksijen Toksisitesi ve Serbest Radikaller. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecm.* 53 (2): 157-161.
- 158-Trapeznikova S S, Navasardiants D G, Levchenko L I, (1986).** Comparative Study of the Activity of Arginase Isoenzymes in Brain Tumors of Humans and Experimental Animals. *Vopr Med Khim.* 32(6): 29-34.
- 159-Türkoğlu C. (1985).** Studies on Some Hepatic Urea Cycle Enzymes and Pyrimidine Biosynthesis in CCl₄ Injected rat. Middle East Thecnical University, Ph. D. Thesis. Ankara.
- 160-Vajdovich P, Szilagyı A, Gaal T. (1995).** Evaluation of Blood Lipid Peroxidation Parameters in Carbon Tetrachloride (CCl₄) Toxicity in Sheep. *Acta vet Hung.* 43 (4): 423-9.

- 161-Van den Branden C, Ceyskens B, De Craemer D, Pauwels M, Van den Houte K, De Bleser P, Hellemans K, Geerts A, Verbeelen D. (2000).** Renal Antioxidant Enzymes and Fibrosis-Related Markers in the Rat Model. *Nephron*. 86 (2): 167-75.
- 162-Van Elsen A F and Leroy J G. (1975).** Arginase Isoenzymes in Human Diploid Fibroblasts. *Biochem. And Biophys Res Commun*. 62 (2): 191-243.
- 163-Varela A F, Runge A, Ignarro L J, Chaudhuri G. (1992).** Nitric Oxide and Prostacyclin Inhibit Fetal Platelet Aggregation: a Response Similar to that Observed in Adults. *Am J Obstet Gynecol*. 167: 1599-604.
- 164-Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. (1999).** An Update on the Role of Free Radicals and Antioxidant Defense in Human Disease. *Int J Clin Lab Res*. 29: 49-55.
- 165-Wu C W, Wang S R, Chang T J, Lin E C, Chang K L, Huang M H, Lui W Y, P'eng F K, Chi C W. (1989).** Regulation of Arginase Production by Glucocorticoid in Three Human Gastric Cancer Cell Lines. *Life Sciences*. 51: 1355-1361.
- 166-Wyckoff III J H and Bradley R E. (1985).** Diagnosis of *Fasciola hepatica* Infection in Beef Calves by Plasma Enzyme Analysis. *Am J Vet Res*. 46 (5): 1015-1019.
- 167-Xie Q, Cho H J, Calaycay J, Mumford R A, Swiderek K M, Lee T D, Ding A, Troso T, Nathan C. (1992).** Cloning and Characterization of Inducible Nitric Oxide Synthase from Mouse Macrophages. *Science*. 256 (10): 225-228.
- 168-Yagi K. (1984).** Assay for Blood Plasma or Serum. *Methods in Enzymol*. 105: 328-31.
- 169-Yaraloğlu S, Özdemir N. (2001).** Ruminantların Karaciğer Dokusu Antioksidan Enzim ve Lipid Peroksidasyon Düzeyleri Üzerine Tür ve Cinsiyetin Etkileri. *F.Ü. Sağlık Bil Dergisi*. 15 (2): 345-352.
- 170-Yılmaz S, Bahçecioğlu İ H. (2000).** Karbontetraklorür ile Siroz Oluşturulmuş Ratlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzim ve Pirüvat Kinaz Aktiviteleri. *Turk J Vet Anim Sci*. 24 (1): 25-28.
- 171-Zamecka E, Poremska Z. (1988).** Five Forms of Arginase in Human Tissues. *Biochem Med and Met Biol*. 39: 258-266.

172-Zhang J, Synder S H. (1992). Nitric Oxide Stimulates Auto-ADP-Ribosylation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. Proc Natl Acad Sci. USA. 89: 9382-9385.

173-Zidenberg-Cherr S, Halsted C H, Olin K L, Reisenauer A M, Keen C L. (1990). The Effect of Chronic Alcohol Ingestion on Free Radical Defence in the Miniature Pig. J Nutr. 120: 213-217.

174-Zidenberg-Cherr S, Olin K L, Villaneueva J, Tang A, Phinney S D, Halsted C H and Keen C L. (1991). Ethanol-Induced Changes in Hepatic Free Radical Defense Mechanisms and Fatty-Acid Composition in the Miniature Pig Hepatology. 13: 1185-1192.

175-Zwart L L, Meerman J H N, Commandeur J N M and Vermeulen N P E. (1999). Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Humans. Free Radical Biology and Medicine. 26: 202-226.



9. ÖZGEÇMİŞ

1966 Elazığ doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1985 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandım ve 1990 yılında mezun oldum. 1994-Eylül döneminde Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora başladım. Evli ve iki çocuk annesiyim. Halen Biyokimya Anabilim Dalı'nda Arş. Gör. olarak görev yapmaktayım.



10. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince en iyi şekilde yetişmem için bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve tez çalışmalarımın yürütülmesinde çok büyük emeği olan sayın hocam Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN'a, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç. Dr. Necmi ÖZDEMİR'e, sayın Doç. Dr. Yusuf Türköz'e, fakülte arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Seval YILMAZ'a ve Yrd. Doç. Dr. Mine ERİŞİR'e, istatistik işlemlerindeki yardımlarından dolayı Dr. İbrahim ŞEKER'e ve oda arkadaşım Arş.Gör. Mehtap ÖZÇELİK'e, ayrıca her türlü desteklerinden dolayı aileme sonsuz teşekkür ederim.

