

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**MALİGN VE PARAPNÖMONİK PLEVRAL EFÜZYONLARDA
NİTRİK OKSİT METABOLİZMASI VE OKSİDAN
STRES GÖSTERGESİ OLARAK MALONDİALDEHİT
DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Pınar KOYUNCU

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Serenay ELGÜN ÜLKAR**

**ANKARA
2015**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**MALİGN VE PARAPNÖMONİK PLEVRAL EFÜZYONLARDA
NİTRİK OKSİT METABOLİZMASI VE OKSİDAN
STRES GÖSTERGESİ OLARAK MALONDİALDEHİT
DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Pınar KOYUNCU

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Serenay ELGÜN ÜLKAR**

**ANKARA
2015**

KABUL VE ONAY

Düzenleme tarihi: 13/10/2015

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı : Pınar KOYUNCU	Sınav tarihi: 13 / 10 / 2015
Anabilim/Bilim Dalı : Tıbbi Biyokimya AD	
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Serenay ELGÜN ÜLKAR	


II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı:	
Tezin Niteliği: <input checked="" type="checkbox"/> Ana Dal Uzmanlık Tezi <input type="checkbox"/> Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu: <input checked="" type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3	

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
<input checked="" type="checkbox"/> Kabulüne	
<input type="checkbox"/> Reddine	
<input type="checkbox"/> Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
<input checked="" type="checkbox"/> Oy birliği <input type="checkbox"/> Oy çoğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekeçli açıklamalarınızı buraya yazınız	


Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU
Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı


Jüri Üyesi
Prof. Dr. H. Şerdar ÖZTÜRK
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı


Jüri Üyesi
Prof. Dr. Serenay ELGÜN ÜLKAR
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimim boyunca benden desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen, üzerimde büyük emekleri olan başta tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Serenay Elgün Ülkar olmak üzere Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. H. Serdar Öztürk ve kıymetli hocalarım Prof. Dr. Kadirhan Sunguroğlu, Prof. Dr. İlker Durak, Prof. Dr. Aslıhan Avcı, Prof. Dr. İmge Ergüder ve Prof. Dr. Erdiç Devrim'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca uzun yıllar birlikte çalıştığım kıymetli araştırma görevlisi arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmalarında yanımda olan laborantlarımıza ve biyokimya anabilim dalının tüm diğer çalışanlarına;

Uz. Dr. Zihni Karaeren, Uz. Dr. Esra Elmalı, Uz. Dr. Elif İşbilen ile Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nın tüm çalışanlarına ayrı ayrı teşekkür ederim.

Beni yetiştirip bugünlere gelmemde ödenemez emeği olan anne ve babama, varlıklarıyla kuvvet bulduğum kardeşlerime,

Her zaman desteğim olan sevgili eşim Adem Koyuncu'ya ve canım oğullarım Doğan Efe ve Selim'e hayatımda oldukları ve yaşamıma anlam kattıkları için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLOLAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Arginin ve Arginin Metabolizması	4
2.1.1. Arginazın inflamasyon ve karsinogenezdeki rolü.....	9
2.2. Nitrik Oksit (NO)	10
2.2.1. Nitrik Oksitin Tarihçesi	10
2.2.2. Nitrik oksit sentezi	11
2.2.3. Nitrik Oksit Sentaz İzofomları	12
2.2.4. NOS inhibitörleri ve donörleri	14
2.2.5. NO etki mekanizması.....	14
2.2.6. Nitrik oksitin inflamasyon ve infeksiyondaki rolü	15
2.2.7. Nitrik oksitin solunum sistemi üzerindeki etkileri.....	17
2.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	19
2.3.1. Serbest radikaller	20
2.3.2. Lipit peroksidasyonu.....	22
2.3.3. MDA ve karsinogenez	24
2.4. Plevranın Yapı ve İşlevi	25
2.4.1. Plevral sıvı dinamiği	25
2.4.2. Plevral sıvının transüda/eksüda ayrımı	27
2.4.3. Eksüdatif plevral efüzyona sebep olan hastalıklar	28
2.4.4. Transüdatif plevral efüzyona sebep olan hastalıklar.....	29
2.4.5. Konjestif kalp yetmezliğinde plevral sıvı	30
2.4.6. Malign plevral sıvı	31

2.4.7. Parapnömonik plörezi	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Gönüllü Seçimi.....	34
3.2. Gereçler	35
3.2.1. Cihazlar	35
3.2.2. Kimyasal Maddeler	36
3.3. MDA Düzeyinin Belirlenmesi	36
3.4. Nitrik Oksit (NO*) Miktarı Ölçüm Yöntemi	38
3.5. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	39
3.6. Arginaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	40
3.7. İstatistiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇLAR	53
ÖZET.....	55
SUMMARY	56
KAYNAKLAR	57
EKLER	69
EK 1: Etik Kurul Kararı	69
EK 2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µM	: Mikromolar
¹O₂	: Singlet oksijen
Ach	: Asetilkolin
ADA	: Adenozin Deaminaz
ADMA	: Asimetrik dimetil arjinin
A-I	: Arginaz 1
A-II	: Arginaz 2
AMP	: Adenozin monofosfat
ARDS	: Akut respiratuvar distres sendromu
ASL	: Arginino süksinat liyaz
ASS	: Arginino süksinat sentaz
ATP	: Adenozin trifosfat
BAL	: Bronko alveoler lavaj
BH₄	: Tetrahidrobiopterin
Ca	: Kalsiyum
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
Cd	: Kadmiyum
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
CO₂	: Karbondioksit
CP	: Karbamoil fosfat
CPS1	: Karbamoil fosfat sentetaz 1
CuCl₂	: Bakır (II) klorür
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDRF	: Endotel kaynaklı gevşetici faktör
EF	: Ejeksiyon fraksiyonu
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
F	: Faktör
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotit

Fe⁺²	: Ferröz Demir
Fe⁺³	: Ferrik Demir
FMN	: Flavin mononükleotit
g	: gram
gr/mol	: gram/mol
GTP	: Guanozin trifosfat
H⁺	: Hidrojen iyonu
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
HCO₃	: Bikarbonat
HNO₂	: Nitröz asit
HOCl	: Hipokloröz asit
IFN	: interferon
IL-1	: interlökin-1
IU	: İnternasyonal ünite
iNOS	: indüklenebilir nitrik oksit sentaz
Kb	: Kilobayt
kDa	: kilodalton
kg	: Kilogram
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
KKY	: Konjestif kalp yetmezliği
L	: Litre
LDH	: Laktat dehidrogenaz
L-NMA	: L-N-Metil arjinin
L-NNA	: L-N-Nitroarjinin
LOO•	: Lipit peroksil radikali
LOOH	: Lipit hidroperoksit
L-SMTC	: S-Metil L- tiyositrülin
M	: Molarite
Maks	: Maksimum
MDA	: Malondialdehit

mg	: Miligram
mg/dL	: Miligram/desilitre
Min	: Minimum
mL/kg	: Mililitre/kilogram
mL	: Mililitre
Mn	: Mangan
MnCl₂	: Mangan klorür
N	: Normal
N₂O₃	: Dinitrojen trioksit
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NADP⁺	: Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
NaOH	: Sodyum hidroksit
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
NF-Kb	: Nükleer faktör kappa B
NH₄⁺	: Amonyum
nm	: Nanometre
NMMA	: N-Monometil-L-Arjinin
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NO⁻	: Nitroksil anyonu
NO⁺	: Nitratil katyonu
NO₂	: Azot dioksit
NO₂⁻	: Nitrit
NO₂Cl	: Nitril klorür
NO₃⁻	: Nitrat
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O₂	: Oksijen molekülü
O₂⁻	: Süperoksit radikali
O₃	: Ozon

OCT	: Ornitin karbomoil transferaz
OD	: Optik dansite
OH⁻	: Hidroksil iyonu
OH[•]	: Hidroksil radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
ONOOH	: Peroksinitrik asit
OOH	: Hidroperoksil
Ort	: Ortalama
PC	: Pirüvat karboksilaz
pM	: Pikomolar
PMNL	: Polimorf nüveli lökosit
ppb	: Milyarda bir
PPi	: Pirofosfat
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
RO[•]	: Alkoksil radikali
RO₂[•]	: Peroksil radikali
sGS	: Soluble guanilat siklaz
SS	: Standart sapma
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TBARS	: Tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddeler
TCA	: Triklorasetik asit
TEP	: Tetraetoksipropan
Th2	: T helper 2 hücresi
TNF-α	: Tümör nekroz faktör
Tyr	: Tirozin
v/v	: hacim/hacim
w/v	: Ağırlık/hacim

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.	L-Argininin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.2.	Arginin metabolizması.	5
Şekil 2.3.	Arginin sentezi.....	6
Şekil 2.4.	Arginaz enziminin katalizlediği reaksiyon.....	7
Şekil 2.5.	Argininin katıldığı metabolik yollar.....	9
Şekil 2.6.	NO oluşumu.....	12
Şekil 2.7.	NOS'un aktive edilmesi NO sentezlenmesi.....	15
Şekil 2.8.	Makrofaj kaynaklı NO, bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki yapmaktadır.....	16
Şekil 2.9.	NO oluşuktan sonra.....	17
Şekil 2.10.	Lipit peroksidasyonu ve MDA oluşumu.....	23

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1. Arginaz I ve Arginaz II izoformlarının karşılaştırılması.....	8
Tablo 2.2. NOS izoformları ve özellikleri	13
Tablo 2.3. Nitrik oksitin akciğerdeki fonksiyonları.....	18
Tablo 2.4. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri.....	21
Tablo 2.5. Plevral efüzyon oluşum mekanizmaları	26
Tablo 2.6. Plevral sıvı transüda/eksüda ayırımı.....	27
Tablo 2.7. Malign plevral efüzyonun en sık görülen nedenleri	32
Tablo 3.1. MDA ölçüm yöntemine ait protokol.	37
Tablo 3.2. NO [•] ölçüm yöntemine ait protokol.....	39
Tablo 3.3. NOS enzim aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol	40
Tablo 3.4. Arginaz aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol.	41
Tablo 4.1. Gruplar arası NO ve MDA düzeyleri ile NOS ve Arginaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması	43
Tablo 4.2. Serumda ve plevral sıvıda gruplar arası ADA, total protein, albümin, LDH ve glukoz değerlerinin karşılaştırılması.	45

1. GİRİŞ

L-arginin yan zinciri olarak bir guanidinyum grubu ve nötral pH'da pozitif yük taşıyan, bazik bir aminoasittir. Vücutta sentez edilen arginin çok sayıda fizyolojik olayda yer alır. Protein, üre, kreatin, L-prolin, L-ornitin, poliamin, agmatin ve NO sentezinde görev alan bir aminoasittir. Bununla beraber prolaktin, büyüme hormonu, insülin benzeri büyüme faktörü uyarımı gibi biyolojik etkileri de vardır (1). Arginaz ise, argininin diğer azotlu bileşiklere dönüşümünü kolaylaştırarak arginin yıkımında rol alan önemli bir hidrolitik enzimdir. Arginaz enziminin iki izoenzimi bulunmaktadır. Bunlar Arginaz tip I (A-I) ve Arginaz tip II (A-II)'dir. A-I izoenzimi sitozolik bir form olup karaciğerde baskın olan tiptir ve ürogenizde primer rol alır. A-II izoenzimi ise mitokondrial matrikste yerleşmiştir ve eritrositler ile diğer ekstrahepatik dokularda bulunur (2).

Nitrik oksit (NO), azot monoksit veya nitrojen monoksit diye de bildiğimiz bir gaz molekülüdür, hemen hemen bütün biyolojik sistemlerde yer alır ve lipofilik yapısı sayesinde birçok membrandan geçer. NO, L-argininden NADPH varlığında L-sitrülin oluşumu sırasında NOS (nitrik oksit sentaz) ile üretilir. Dolayısıyla arginaz ve NOS enzimleri aynı substratı kullanmaktadır. 3 tip NOS vardır. Bunlar nöronal, indüklenebilir ve endotelial tiptir. NOS; makrofaj, mast hücresi, nötrofil, nonadrenerjik-nonkolinerjik nöronlarda, fibroblastlarda, vasküler düz kasta, arteriyel ve venöz endotel hücrelerinde ve epitelyum hücrelerinde bulunmaktadır (3).

NO, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynayan çok önemli bir radikaldir. Damar genişletici, hücre koruyucu, trombosit agregasyonunu ve düz kas proliferasyonunu önleyici, immün modülatör, mikroorganizma ve tümör hücresi öldürücü bir dizi etkisi bilinmektedir (4). NO'nun etki mekanizması büyük oranda ortamda bulunan Ca^{++} konsantrasyonuna bağlıdır. Fizyolojik koşullarda NO, soluble guanilat siklaz (sGS) ve siklik guanosin 3' 5'- monofosfat (cGMP)'i aktive eder. Ayrıca NO'nun cGMP'den bağımsız sinyal yolları da bildirilmiştir (5). NO, eşleşmemiş bir elektrona sahip olduğundan bir serbest radikal olarak adlandırılır. Oksijen ve süperoksit radikalleriyle reaksiyona girerek reaktif nitrojen ve oksijen

türlerini oluşturur. Serbest radikallerin nükleik asitleri, proteinleri, lipitleri ve karbonhidratları okside etmeleri ise ciddi hücre hasarlarıyla sonuçlanır (6).

Son yıllarda reaktif oksijen metabolit üretiminin fizyolojik sınırların üzerinde olduğu zaman ne gibi sonuçlara yol açabileceği konusunda yapılan çalışmalar pek çok hastalığın patofizyolojisinde serbest radikallerin de rolü olduğunu ortaya koymuştur. Serbest radikallerin kanser, inflamasyon hasarı ve kimyasal toksisite gibi olayların gelişmesinde rol aldığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin hücre membranında bulunan poliansatüre yağ asitlerini etkilemesi sonucu meydana gelen zincirleme bir reaksiyondur. Lipid peroksidasyon düzeyinin ölçülmesinde en çok kullanılan test tiyobarbitürük asit (TBA) testi ile lipid peroksidasyon olayının son ürünü olan MDA'nın ölçülmesidir (7).

Plevral efüzyon rutin pratikte sık karşılaşılan klinik problemlerden olup, genellikle sistemik bir patolojinin veya başka bir organa ait hastalığın komplikasyonu olarak görülür. Plevral efüzyonun en sık görülen nedenleri; konjestif kalp yetmezliği, malignite, pnömoni ve tüberküloz olarak bildirilmiştir (8).

Akciğerler hem yüksek oksijen basıncına hem de yüksek oksidan konsantrasyonuna maruz kalan tek organdır (9). Plevra sıvılarında tanı amaçlı serbest oksijen radikalleriyle ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Oksidatif stresin çeşitli belirteçleri, akciğer hastalıklarında kan, balgam, BAL (bronkoalveoler lavaj) sıvısı, plevra sıvısı ve ekshalasyon havası gibi çeşitli biyolojik örneklerde tespit edilebilmektedir (10). Bu örnekler oksidatif stresin hem lokal hem de sistemik etkilerinin bulunduğunu gösterir. Ancak serbest radikallerin lokal üretimi ve plevral hastalıklardaki rolü tam olarak bilinmemektedir. Serbest radikaller normal metabolizmanın yan ürünü olarak oluşabildiği gibi infeksiyon, inflamasyon, karsinogenezis, ilaç ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisiyle de oluşabilmektedir.

Plevral hastalıklarda rol oynayan immünolojik ve moleküler mekanizmalarla ilgili bilgiler oldukça azdır. Belirli hastalıklarda, belirli hücrelerle infiltrasyon ön plandadır. İnflamasyonda mezotel hücreleri tarafından çok sayıda mediatör ve protein rol oynar. Bu mediatörlerden birisi de NO'dur (11). NO savunma

mekanizmasının yanı sıra, homeostatik mekanizmada da önemli rol oynamaktadır. NO düzeyleri inflamatuvar olaylarda çok yüksek düzeylere çıkabilmektedir ve insan akciğerinde NOS'un 3 tipinin vasküler yatakta, havayolunda ve parankimde eksprese edildiği gösterilmiştir.

Tüm bunlar birlikte değerlendirildiğinde arginin ve nitrik oksit metabolizması ile plevral sıvı etyopatogenezi arasında bir ilişki olabileceği düşünülebilir. Buradan yola çıkarak bu tez çalışmasında araştırmayı planladığımız maddeler şöyle sıralanabilir:

- Plevral sıvısı olan malignite, pnömoni veya konjestif kalp yetmezliği (KKY) tanısı almış üç grup hastanın plevral sıvı ve serumlarında glikoz, albümin, total protein, LDH (laktat dehidrogenaz) ve ADA (adenozin deaminaz) düzeyleri gibi biyokimyasal bazı parametreleri birbiri ile karşılaştırmak,
- Bu üç grup hastanın plevral sıvılarında arginaz ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzim aktiviteleri ile nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) düzeylerini ölçmek ve birbiri ile karşılaştırmak,
- Ölçülen bu değişkenler ile plevra sıvılarının oluşum mekanizmaları arasındaki olası ilişkiyi tartışmak.

Bu amaçla Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran plevra sıvısı tespit edilmiş hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. Malignite, pnömoni veya KKY tanısı alan ve bu hastalıklara bağlı plevra sıvısı birikmiş olan hastalardan tanı ve/veya tedavi amacıyla alınan sıvı örneklerinden çalışmamız için de bir miktar ayrılmış ve sayılan parametreler incelenmiştir.

Literatüre baktığımızda, pnömoni, malignite ve kalp yetmezliğine bağlı oluşan plevral sıvılarda, bizim araştırdığımız parametrelerin hepsini birden içeren başka bir çalışmaya rastlayamadık. Çalışmamızın arginaz, NO, NOS ve MDA'nın bu üç grup hastalıkta birlikte incelenmiş olması bakımından yeni çalışmalara yol gösterici olacağı düşüncesindeyiz.

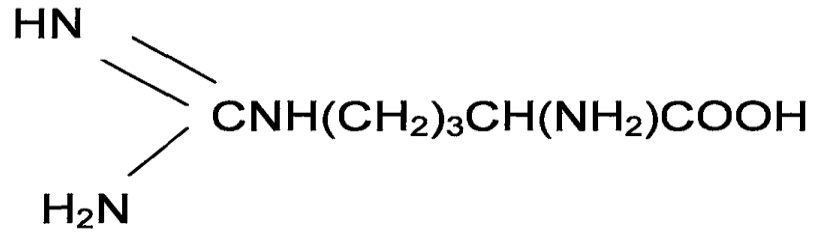
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Arginin ve Arginin Metabolizması

L-arginin (2-amino-5-guanidinovalerik asit) yan zinciri olarak bir guanidinyum grubu ve nötral pH'da pozitif yük taşıyan, bazik bir aminoasittir. Molekül ağırlığı 174,2 g/mol'dür. Alkolde az çözünür, eterde çözünmez.

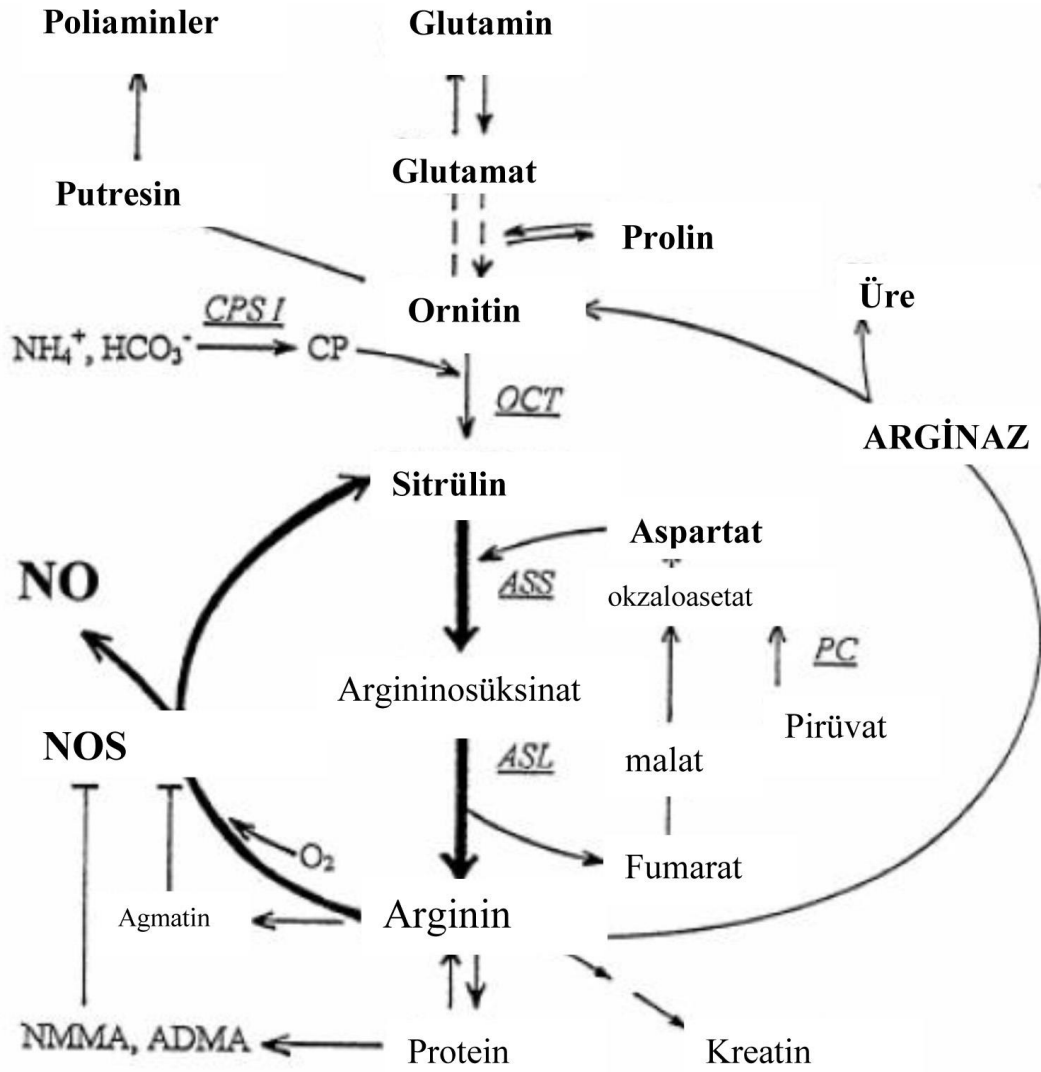
Vücutta sentez edilen arginin çok sayıda fizyolojik olayda yer alır. Çocukluk çağında ve protein sentezinin arttığı gebelik dönemlerinde besinlerle alınması gerektiğinden dolayı, yarı esansiyel olarak kabul edilir (12).

Arginin; protein, üre, kreatin, L-prolin, L-ornitin, poliamin, agmatin ve NO sentezinde görev alan bir aminoasittir. Bununla beraber prolaktin, büyüme hormonu, insülin benzeri büyüme faktörü uyarımı gibi biyolojik etkileri de vardır (1).



Şekil 2.1. L-Argininin kimyasal yapısı (13).

Arginin metabolizmasının büyük bölümü karaciğerde üre siklusunda meydana gelir. Arginin, sitrülinden argininosüksinat sentaz (ASS) ve argininosüksinat liyaz (ASL) tarafından sentezlenir ki bu enzimler üre siklusunun 3. ve 4. enzimleridir (14). Metabolizmanın diğer bölümü böbrekte meydana gelir ve arginin sitrülinden oluşarak kan dolaşımına verilir. Oluşan arginin NOS tarafından tekrar sitrülüne dönüşebilir. Diğer taraftan arginin, üre siklusunda arginaz tarafından hidrolize edilerek ornitin ve üreye çevrilir. Sonuç olarak NOS ve arginaz enzimleri ortak substrat olarak argininini kullanırlar (16).

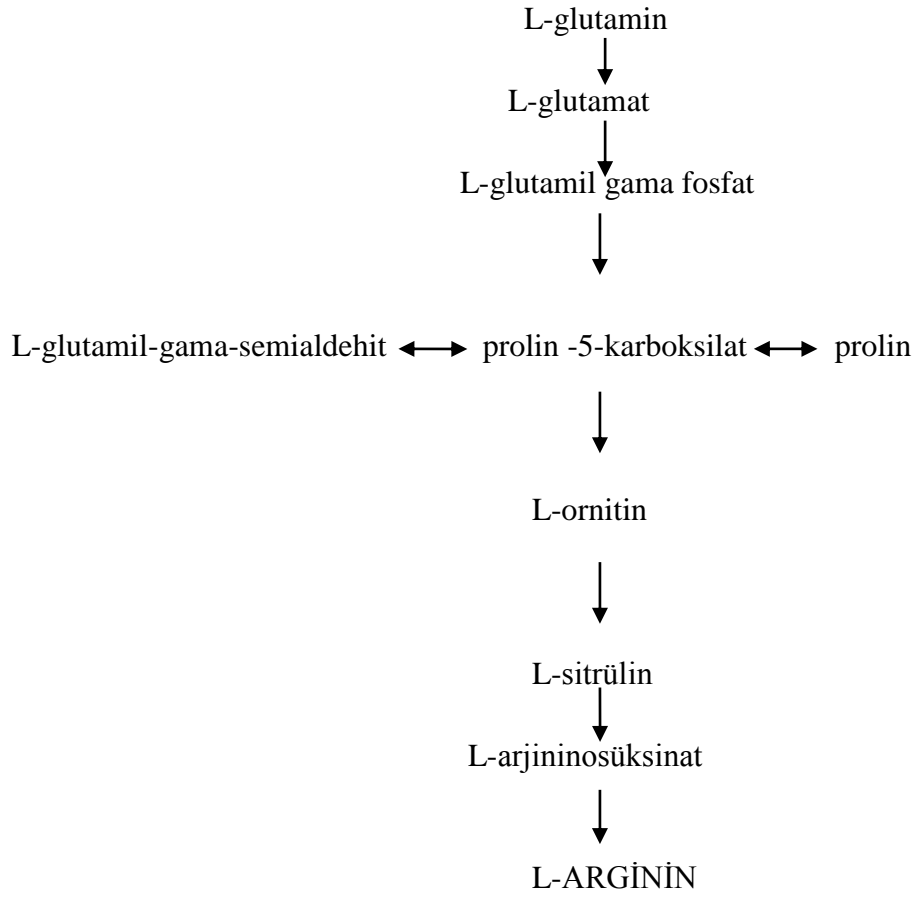


Şekil 2.2. Arginin metabolizması (15).

(CPS I; karbamoil fosfat sentetaz I, CP;karbamoil fosfat, PC;pirüvat karboksilaz, OCT; ornitin karbamoil transferaz, ASS; argininosüksinat sentetaz, ASL; argininosüksinat liyaz, NMMA; N^G-monometil-L-Arginin, ADMA; asimetrik N^G, N^G-dimetil-L-Arginin)

Endojen arginin analogları; agmatin, N-Monometil-L-Arginin (NMMA) ve asimetrik N-dimetil-L-Arginin (ADMA) NOS inhibitörleridir (15).

Arginin nitrojen dengesinin temelini oluşturan esansiyel bir aminoasittir. Yetişkinlerde arginin sentezinin çoğu renal proksimal tübüllerde oluşan sitrülinden gerçekleşir. Sitrülin, glutamin ve prolinden ince barsakta da sentezlenir.



Şekil 2.3. Arginin sentezi (16).

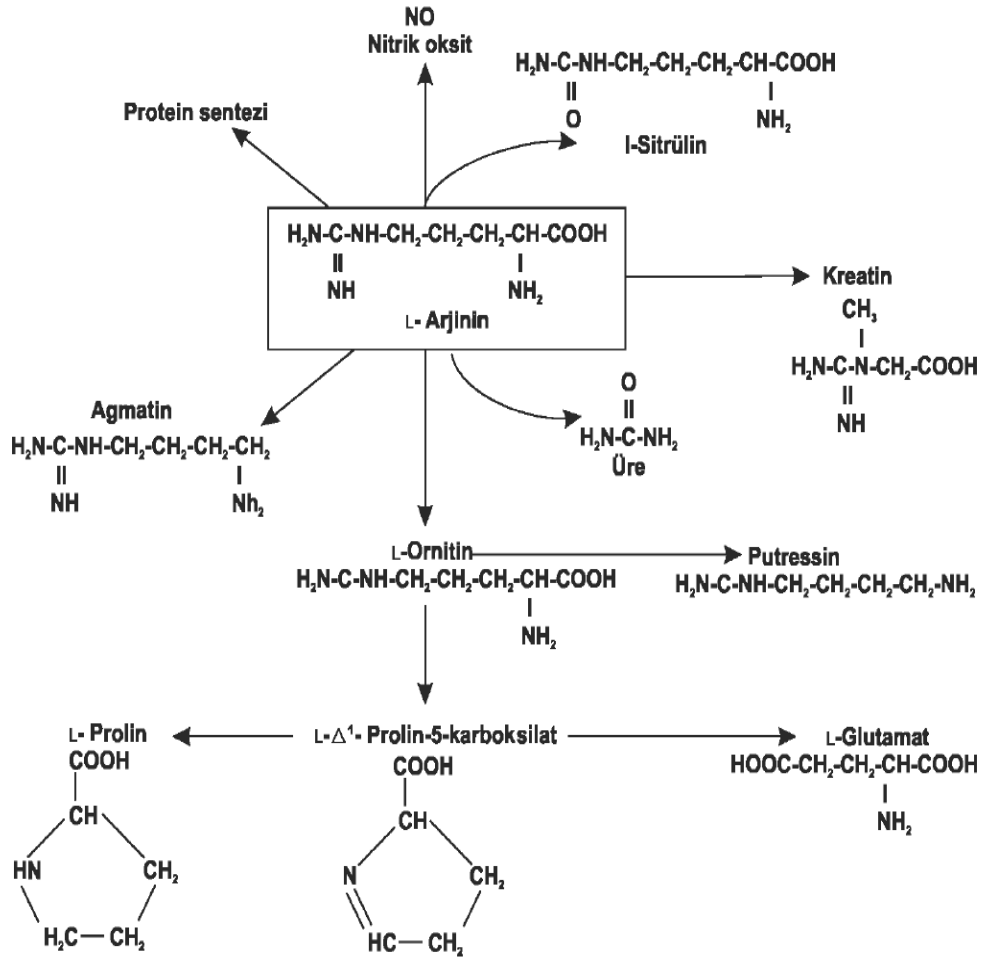
Arginaz (L-arginin üre hidrolaz veya amidinohidrolaz) arginini üre ve ornitine çeviren hidrolitik bir enzimdir. Karaciğer, arginaz aktivitesinin en yüksek olduğu dokudur. Ekstra hepatik dokulardaki aktivitesi karaciğerden belirgin olarak daha düşüktür. Bu dokuların başında eritrositler, lökositler, trombositler, plazma, böbrek, iskelet ve kalp kası, beyin, barsak, akciğer ve pankreas gelmektedir (17-20).

Tablo 2.1. Arginaz I ve Arginaz II izoformlarının karşılaştırılması (29).

	<i>Arginaz I</i>	<i>Arginaz II</i>
Bulunduğu Doku	Karaciğer, kırmızı kan hücreleri	Böbrek,beyin, Gastro-intestinal sistem, prostat
Subünite Moleküler Ağırlık (Da)	35.000	40.000
pI Değeri	9.3	6.8
Mn⁺² ihtiyacı (mmol/L)	20	2
Prolin ile inhibisyon	±	++
İsolösin ile inhibisyon	++	±
HücreSEL bölgesi	Sitozol	Mitokondri

İmmün sistemde arginaz I ve II'nin ekspresyonlarının artışı, immün sitokin cevabına yol açar. Arginaz I ve II'nin artışı, immün yetersizlik ile ilgili hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılmasında önemli rol oynayabilir (2).

Arginaz enzimi, argininin üre, ornitin, prolin, poliaminler, glutamin ve glutamat dönüşümünü kolaylaştırarak arginin yıkımında önemli bir rol alır. Arginin üre döngüsü yolu ile amonyak detoksifikasyonu için nitrojenin taşınmasında, depolanmasında ve atılımında elzem bir aminoasittir (30). Şekil 2.5'de argininin, protein sentezi, NO oluşumu, agmatin, ornitin, sitrülün ve kreatin sentezine doğrudan, prolin, glutamat ve putressin sentezine de ornitin üzerinden katılımı görülmektedir.



Şekil 2.5. Argininin katıldığı metabolik yollar (16).

2.1.1. Arginazın İnflamasyon ve Karsinogenezdeki Rolü

Arginaz ekspresyonunun inflamatuvar koşullar altında, çeşitli hücre ve dokularda yükseldiğinin önemli kanıtları vardır. Yapılan çalışmalarda yara yerinde makrofaj kaynaklı arginaz aktivitesinin, inflamasyon ve enfeksiyonda, konak dokuların iyileşmesinde yalnızca NO sentezi için substrat olarak argininini uzaklaştırarak değil, ayrıca, kollajen sentezi için gerekli olan prolinin sentezi için ornitin meydana getirerek bir rol oynadığı fikrine neden olmuştur (16).

Poliaminler hücre proliferasyonunda çok önemlidir. Arginazın artmasından ötürü yükselmiş ornitin seviyeleri karsinogenez gelişimiyle bağlantılı olabilir. İnsan meme kanseri hücrelerinde arginaz seviyeleri yüksek bulunmuştur. Arginaz II'nin, özellikle

mide ve kolon kanseri, akciğer kanseri ve renal hücre karsinoma hastalarında yükseldiği belirtilmiştir. Prostat kanserli hastaların serumunda da arginaz seviyesi yüksek çıkmıştır. Ayrıca arginaz aktivitesinin insan derisinin skuamöz ve bazal hücreli karsinomalarında da arttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla arginazın bir tümör belirteci olarak kullanılabileceği merak edilmekte ve bu konuyla ilgili birçok araştırma yapılmaktadır (28, 31).

Stratus ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada meme kanserinde preoperatif dönemde serum arginaz aktivitesinin sağlıklı kadınlardan 4 kat yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bu araştırmacılara göre serum arginaz aktivitesi meme kanserinde duyarlı bir belirteçtir (32).

Leu ve arkadaşları kolorektal kanserli hastalarda serum arginaz aktivite düzeyini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda kolorektal kanserli dokuların normal mukozal dokulara göre 2 kat fazla arginaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (17).

Wu ve arkadaşları gastrik kanserli hastalarda plazma arginaz aktivitesini kontrollere oranla yüksek saptamışlardır (33).

Konarska ve arkadaşları kolorektal karsinomlarda arginaz aktivitesinin normal mukozadan en az 10 kat yüksek ve adenomlarda görülen hafif dereceli displazide en az 3 kat yüksek olduğunu bulmuşlardır. İncelenen lezyonlara yakın mukozaya morfolojik olarak normal olsa da arginaz aktivitesi normal mukozaya göre önemli oranda yüksek olup bu yükseklik tümörde bulunan displazinin derecesi ile ilgili bulunmuştur (34).

2.2. Nitrik Oksit (NO)

2.2.1. Nitrik Oksitin Tarihi

Nitrik oksit molekül ağırlığı 30,006 g/mol olan bir gazdır. NO, serbest radikal yapısındadır ve yarı ömrü çok kısa olup 20-30 saniyedir. NO, lipofilik özellikte olup, yüksek konsantrasyonlardaki NO oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda

çözünme özelliği gösterir. Düşük konsantrasyonlarda ise, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilir. NO'nun üzerinde yük taşımaması ve eşlenmemiş elektron bulundurması onu önemli bir mesajcı yapar. Yani yüksüz olduğu için hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçer ve eşlenmemiş elektrona sahip olması nedeniyle hızlı reaksiyona girer (35).

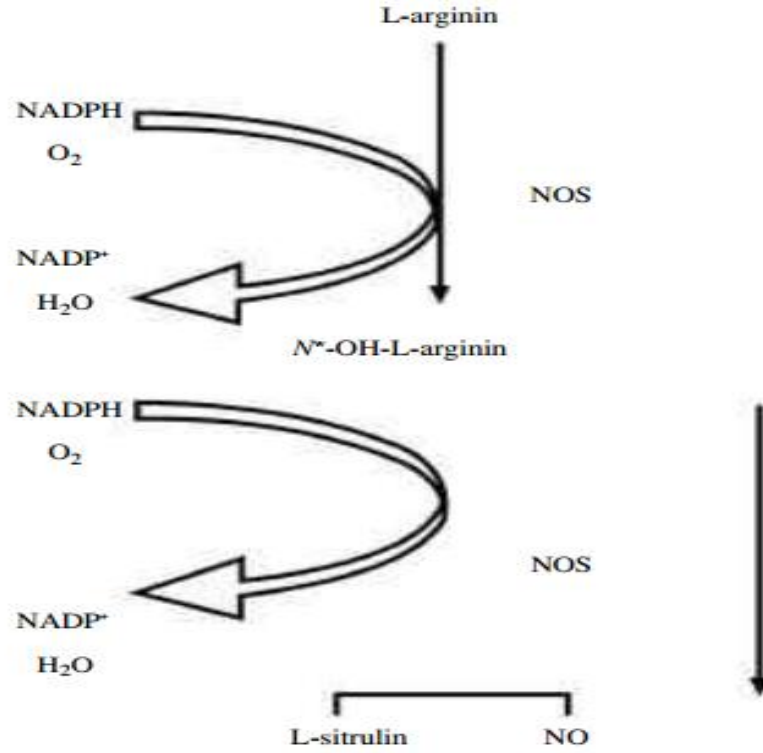
1980'lerde Furchgott ve Zawadzki asetilkolin gevşemesi için endotelli damardan endotelsiz damara geçebilen ve kısa yarı ömürlü bir maddenin bu gevşemeden sorumlu olduğunu ileri sürmüşler ve endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ismini vermişlerdir (36).

1983'de Ferid Murad'ın grubu EDRF'nin cGMP bağımlı bir gevşeme oluşturduğunu gözlemlemiştir. 1986 ve 1987 yıllarında Furchgott ve L. Ignarro, birbirinden ayrı olarak EDRF'nin NO olabileceğini iddia etmişlerdir. 1987 yılında da Salvador Moncada'nın grubu, NO'nun L-arginin aminoasidinden sentezlendiğini ve bu sentezin basamaklarını ortaya koymuştur (37).

1992'de NO yılın molekülü seçilirken, 1998 yılında Furchgott, Ignarro ve Murad'ın NO'nun kardiyovasküler sistemde sinyal iletimiyle ilgili çalışmaları nobel ödülüne layık görülmüştür.

2.2.2. Nitrik Oksit Sentezi

NO, L-argininden sitrülün oluşumu sırasında, L-argininin guanidin nitrojen grubunun hidroksilasyonu ile oluşan ara üründür. Sentez için nikotinamid adenin dinükleotit monofosfat (NADPH), kalmodulin, oksijen ve dört kofaktöre (hem, flavin mononükleotit, flavin adenin dinükleotit ve tetrahidrobiyopterin) ihtiyaç vardır (38). Vücutta birçok dokuda NO sentezlenmektedir. NO, endojen L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzim sistemi tarafından sentezlenir. İşlev sonrasında NO hızlı ve kararlı bir şekilde okside edilerek inaktif bileşikler olan nitrit ve nitrat gibi son ürünlere dönüşür.



Şekil 2.6. NO oluşumu (39).

2.2.3. Nitrik Oksit Sentaz İzofomları

Nitrik oksit sentaz enzimleri üçe ayrılır (40).

Nöronal (nNOS veya NOS-1): Beyin, nonadrenerjik ve nonkolinerjik periferik sinirler ve akciğer, pankreas, mide ve uterus gibi dokularda bulunur.

İndüklenebilir (iNOS veya NOS-2): İmmünolojik uyarılarla indüklenir ve neredeyse bütün çekirdekli hücrelerde bulunur.

Endotelial (eNOS veya NOS-3): Endotel hücrelerinde bulunur.

eNOS ve nNOS düşük miktarlarda sürekli olarak eksprese edilir ve kalmodulin varlığında sitoplazmik iyonize kalsiyum artışına paralel olarak ekspresyonları artar. Kalsiyumun hücre içine akışı, NO'nun hızla üretilmesine neden olur. Hücre içi iyonize kalsiyum azalmaya başladığı an ise enzim inaktif forma geçerek NO üretimi durmaktadır. Buna karşın iNOS, çeşitli sitokinler ve diğer uyarılar tarafından

makrofajlar ve diğer bazı hücre gruplarının aktive edilmesiyle indüklenerek NO sentezine katılır ve bunun için de kalsiyum artışına ihtiyaç duymaz (41).

Vücutta NO konsantrasyonu düzenli olarak düşük seviyelerde dalgalanmalar gösterir ve eNOS ve nNOS tarafından kontrol edilir. Bu iki enzimin sentezi posttranskripsiyonel seviyede kontrol edilirken, iNOS nükleer faktör kappa B gibi transkripsiyonel faktörlere cevap olarak sentezlenir (42). iNOS kalsiyum ve uyarıcı ajanlardan bağımsız çalıştığı için aktivitesi daha uzundur. Bunlara bağlı olarak iNOS'un ürettiği NO seviyesi, fizyolojik sınırların oldukça üstündedir. Bu durum hücrel süperoksit anyon varlığında oldukça toksik olan peroksinitrit anyonunun oluşmasına neden olur. Bunun sonucunda da lipit peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, protein hasarı gibi nedenlerle hücrel hasar oluşabilir. Sonuç olarak düşük konsantrasyonlardaki NO, hücrel fonksiyonları pozitif olarak düzenlerken, yüksek konsantrasyonlarda hücre üzerinde toksik etkiler yaratabilir.

Tablo 2.2. NOS izoformları ve özellikleri (43).

Tanım	eNOS	nNOS	iNOS
Kromozom	7	12	17
Yapı	Homodimer	Homodimer	Homodimer
Molekül ağırlığı	135 kDa	155 kDa	130 kDa
cDNA büyüklüğü	4,4 kb	10,0 kb	4,1 kb
Düzenleme	Ca/Kalmodulin	Ca/Kalmodulin	Gen transkripsiyonu
Kofaktörler	NADPH, FAD, FMN, BH ₄ , Hem	NADPH, FAD, FMN, BH ₄ , Hem	NADPH, FAD, FMN, BH ₄ , Hem
Uyaran	ACh, bradikinin, ATP, ADM, proliferasyon, stres	Nöro-uyarıcı aminoasitler, östrojen	IL-1, TNF- α , NF- κ B, IFN, endotoksin, doku hasarı
NO Üretimi	Düşük (pM)	Düşük (pM)	Yüksek (μ M)
Hücre Tipleri	Endotel hücreleri, düz kas hücreleri	Nöronlar, iskelet kas hücreleri, kalp kası	Endotel hücreleri, makrofajlar, birçok hücre tipi

2.2.4. NOS İnhibitörleri ve Donörleri

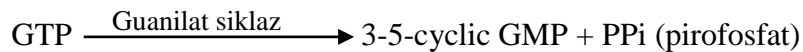
NOS izoformları normal koşullarda ve patolojik durumlarda birbirinden farklı amaçlarla NO sentezlerler. Bu nedenle izoformlara özgü inhibitörlerin kullanımı hastalığın tedavisi sırasında komplikasyonlara neden olmaması için önemlidir.

L-arginin analogları NOS enzimlerinin inhibitörleri grubunu oluştururlar. Ayrıca alkil grubu içeren analoglar da vardır. Bunlar, L-NMA (L-N-Metil arjinin), L-NNA (L-N-Nitro arjinin) ve L-SMTC (S-Metil L-Tiyositrülin)dir. Bu analoglar 3 izoformu da inhibe edebilirler. L-NMA arginin bağımlı makrofajların sitotoksitesini önler.

NO donörleri ise, NO organik vazodilatörleridir. Etkilerini gösterebilmek için önce NO'ye dönüşmeleri gerekir. Gliseril trinitrat (nitrogliserin) gibi organik nitratlar veya nitritler NO salınımında kullanılmakta, S-Nitrosoglutasyon gibi S-Nitroso bileşikleri, hem NO ürünleri için deneysel bir araç olarak hem de tedavilerde kullanılmaktadır (44)

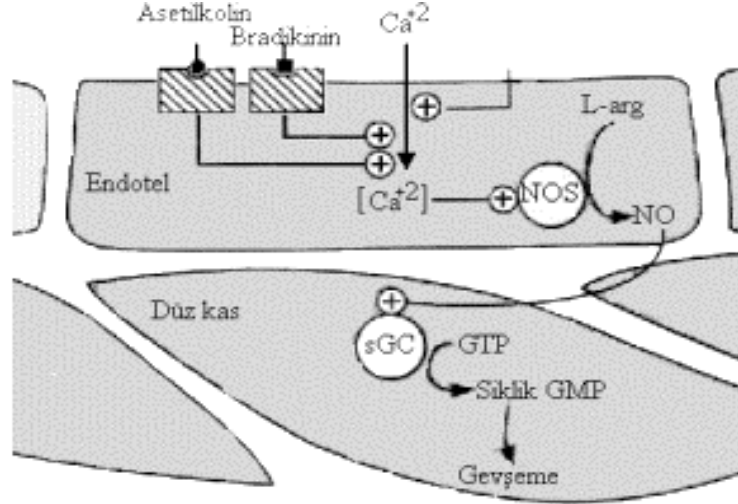
2.2.5. NO Etki Mekanizması

NO'nun etki mekanizmaları büyük oranda ortamda bulunan Ca^{++} konsantrasyonuna bağlıdır. Fizyolojik koşullarda NO, soluble guanilat siklaz (sGS) ve siklik guanosin 3' 5'- monofosfat (cGMP)'i aktive eder. Ayrıca NO'nun cGMP'den bağımsız sinyal yolları da bildirilmiştir (5). NO guanilat siklaz enziminin hem grubuyla reaksiyona girerek cGMP oluşumuna ve protein fosforilasyonuna neden olur. cGMP, farklı dokulara değişik mesajları taşıyan ikincil habercidir. Sinyal iletiminde çözünür guanilat siklaz NO ile aktive edilir.



NO, siklik guanilil siklazı aktive ettiği konsantrasyonlarda mitokondrial elektron transport zincirinin terminal komponenti olan sitokrom c oksidaz enzimini geri dönüşümlü ve oksijenle yarışmalı olarak inhibe eder (45). Sitokrom oksidaz enzimi

memelilerde hücresel oksijenin %90'ından fazlasını tüketir. Sitokrom oksidaz enzimi sitokrom cFe⁺²'yi sitokrom cFe⁺³ e oksitlerken, moleküler oksijeni suya redükler. Bu sırada mitokondriyal matriksten membranlar arası boşluğa H⁺ transfer edilir. Bu iyonların tekrar matrikse geçişi ATP (Adenozin 5'-trifosfat) sentezi ile olur.



Şekil 2.7. NOS'un aktive edilmesi NO sentezlenmesi (46).

NO, sitokrom oksidazı inhibe ederek adeta metabolik hipoksi meydana getirmektedir. NO tarafından hücre solunumu inhibe edildiği zaman mitokondriden bir Ca⁺² çıkışı gerçekleşir, bu da Ca⁺² bağımlı proteazların aktive olmasına neden olur. İntrasellüler Ca⁺² seviyesindeki artışlar mitokondriyal dehidrogenazları aktive edebilir. Bu durumda, akut hipoksi Ca⁺²'un hücre içine girişine ve NO sentezinin artışına sebep olabilir. Böylece, ortamın oksijen konsantrasyonu azaldıkça hücrelerin oksijen ihtiyacını azaltarak kendini adapte ettiği de söylenebilir (47).

2.2.6. Nitrik Oksitin İnflamasyon ve İnfeksiyondaki Rolü

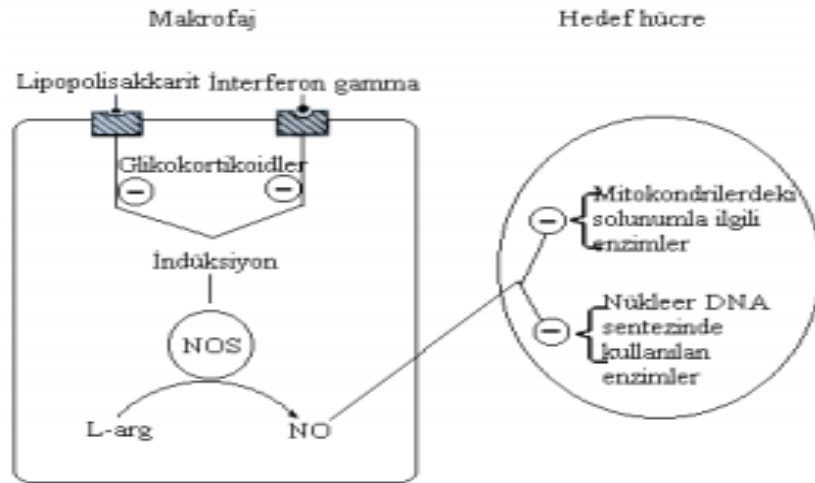
İnterferon veya bakteri lipopolisakkaritleri tarafından aktive edilen makrofajlar büyük miktarda NO sentez ederler. Aktivasyonun olmadığı durumlarda makrofajlarda NOS bulunmaz. İndüksiyondan sonra enzim sentezi ve dolayısıyla NO sentezi meydana gelmektedir. L-Arginin-NO yolunun indüklenmesi, saatlerce hatta

günlerce devam eden NO sentezine neden olmaktadır. Ancak aşırı NO sentezi hücreler için oldukça zararlı etkiler meydana getirmektedir. Makrofaj kaynaklı NO, bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki yapmaktadır (48).

NO, bakteri, parazit gibi birçok patojenin ve tümör hücrelerinin ATP üreten oksidatif fosforilasyonun, glikolizin, TCA siklusunun Fe^{++} içeren bazı enzimlerini inhibe etmekte ve sonuçta bakteri, parazit ve tümör hücrelerini öldürmektedir (49). NO, hedef hücrelerde, DNA sentezinin hız kısıtlayıcı enzimi olan ribonükleotit redüktazı bloke eder ve hücre DNA'sının deaminasyonu ile bu hücrelerde sitostatik etki meydana getirir. Ayrıca NO'nun bazı virüslerde viral replikasyonu inhibe ederek antiviral etki oluşturduğu bildirilmiştir. Özellikle monositlerde L-Arjinin-NO yolu, tümör hücreleri ve mikroorganizmalara karşı çok önemli bir savunma mekanizmasıdır (50).

İnflamatuar cevap sırasında nitrik oksit damarlarda önemli rol oynar. Vasküler düz kas gevşemesini sağlayarak trombosit agregasyonunu ve adezyonunu engeller, lökositlerin toplanmasını engeller ve mast hücrelerinin indüklediği inflamasyonun önüne geçmeye çalışır.

NO'dan türeyen reaktif oksijen türlerinin antimikrobiyel özellikleri vardır. Peroksi nitrat, 5- nitrozotiyol ve nitrojen dioksit gibi bu türevler mikrobiyal DNA ve lipid yapılarını parçalama özelliklerine sahiptir (51).

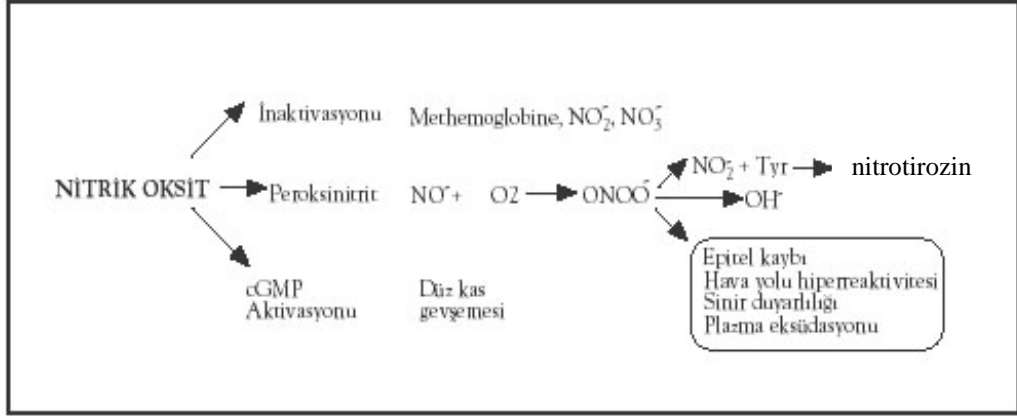


Şekil 2.8. Makrofaj kaynaklı NO, bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki yapmaktadır (52).

2.2.7. Nitrik Oksitin Solunum Sistemi Üzerindeki Etkileri

Nitrik oksit oluştuktan sonra:

- 1) Methemoglobine, nitrite (NO_2^-) veya nitrata (NO_3^-) dönüşerek inaktive olabilir.
- 2) Süperoksit anyonları (O_2^-) ile birleşerek peroksinitrite (ONOO^-) dönüşebilir. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri (OH^-) ve tirozinle (Tyr) birleşerek nitrotirozini oluştururlar. OH^- ve ONOO^- astım patogenezinde rol alan moleküllerdir;
- 3) Guanil siklaz aktivasyonu ile cGMP'yi artırarak düz kas gevşemesine neden olabilmektedir (53).



Şekil 2.9. NO oluştuktan sonra (53).

Solunum havasında NO (sağlıklı bireylerde 5-10 ppb) ve bronkoskopik lavaj ve indüklenmiş balgam örneklerinde NO metabolitlerinin saptanması, NO'nun hava yollarında sentezlendiğini gösteren bulgulardır (54). Nitrik oksidin akciğerdeki hücrel kaynakları, epitel hücreleri, pulmoner arter ve venlerin endotel hücreleri, inhibitör nonadrenerjik sinirler, düz kas hücreleri, mast hücresi, mezotel hücreleri, nötrofil, makrofaj ve lenfositlerdir. Üç NOS izoformu da akciğerde mevcuttur. Özgül olarak NOS I, inhibitör nonadrenerjik nonkolinerjik nöronlardan salınır, NOS III ise endotel hücrelerinde yer alır. NOS II normal hava yolu epitelinde yer alır ve sitokinler, endotoksin ve reaktif oksijen radikalleri tarafından indüklenir (55).

Ekshale edilen nitrik oksidin potansiyel kaynakları, pulmoner dolaşım, alt ve üst hava yolları ve paranazal sinüslerdir. Özellikle üst solunum yollarında ve paranazal sinüslerde yüksek konsantrasyonlarda NO sentezlenmektedir. Nitrik oksidin yüksek oranda yayılabilme kapasitesi, hemoglobine bağlanabilme kapasitesinin oksijene göre 3000 kat daha fazla olması ve akciğerdeki zengin damar yapısı, pulmoner dolaşımı NO için biyolojik bir atık deposu haline getirmektedir (56).

Tablo 2.3. Nitrik oksitin akciğerdeki fonksiyonları (53).

YARARLI	ZARARLI
1. Bronkodilatasyon	1. Semptomlarda ve hava yolu obstrüksiyonunda artışa neden olan inflamatuvar yanıt
2. Arteriyel vazodilatasyon	2. Bronşiyal vazodilatasyon, astımlı hastalarda görülen hava yolu hiperemisi
3. Mukosiyer klirensin düzenlenmesi	3. Post-kapiller venüllerdeki kan akımını artırarak hava yollarında ödem
4. Savunma sistemleri: Bakteri, virus ve parazitlere toksik etki	4. Pulmoner damarlardaki vazodilatasyona bağlı ventilasyon-perfüzyon dengesizliği
	5. Doğrudan veya submukozal bezlerdeki kan akışını artırarak mukus sekresyonunda artış
	6. T-helper 2 (Th2) aktivasyonunda dolaylı artışa bağlı olarak astmatik inflamasyonda artış
	7. Hava yollarında inflamatuvar hücrelerce oluşturulan süperoksit anyonları ile birleşerek peroksinitrit iyonları oluşturması

Bronkodilatör bir gaz olan nitrik oksit, aynı zamanda bronşiyal dolaşımda potent bir vazodilatatör olması nedeniyle de plazma eksüdasyonu ve inflamatuvar mediatörlerin bronşiyal epitelde birikmesine yol açabilir. Sentez edildikten sonra hava yollarındaki inflamatuvar hücreler tarafından oluşturulan süperoksit anyonla birleşerek, gerek direkt olarak gerekse de toksik hidroksil radikalleri oluşturarak havayollarında epitelyal hasara yol açarlar. Bu nedenle nitrik oksitin bronşiyal inflamasyonu belirlemede iyi bir belirteç olduğu kabul edilmektedir (57).

Nitrik oksit, bir serbest radikaldir. Ayrıca, organizmada peroksinitrit anyonu ve hidroksil radikali gibi çok etkin radikallerin üretilmesine neden olur. Bu radikaller dokulara zarar verir. Öte yandan doğrudan doğruya mitokondriyal solunum zincirini inhibe ettiği bilinmektedir (58).

Nitrik oksit aynı zamanda serbest radikal süperoksit tarafından da inaktive edilmektedir. Böylece süperoksit dismutaz gibi süperoksidi ortadan kaldıran enzimler, nitrik oksidin ömrünü uzatabilir. Nitrik oksidin süperoksitle reaksiyonu sonunda peroksinitrit (ONOO-) oluşur ki bu, oldukça güçlü doku hasarına yol açan bir maddedir (59).

Tutluoğlu ve arkadaşları bronşiyal astımda nazal lavajda nitrit/nitrat miktarının arttığını, özellikle bu durumun astım atağındaki hastalarda belirgin olduğunu ortaya koymuşlardır (60).

Saleh ve arkadaşları idiyopatik pulmoner fibrozisli 48 hastada makrofaj, nötrofil ve alveolar epitellerde nitrik oksit sentetaz ve nitrotirozinin güçlü ekspresyonunu gözlemlemişlerdir. Peroksinitrit ile nitrik oksidin artan üretiminin bu hastalarda oksidatif hasardan sorumlu olabileceklerini söylemişlerdir (61).

Yapılan çalışmalarda NOS'ların akciğer kanserli dokularda da ekprese olduğu bulunmuştur (62). Aynı zamanda NO'nun tümör kan akımını ve vasküler permeabilitesini artırdığı da tespit edilmiştir (63).

Fujimoto ve ark. eNOS aracılığı ile oluşturulan NO'nun mutajenik ve karsinojenik aktivitesi olduğunu ve adenokarsinom tipi akciğer kanserinde önemli rol oynadığını göstermişlerdir (64).

2.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Organizmanın prooksidan-antioksidan dengesinin korunması, sağlıklı bir yaşam sürdürülmesi için çok önemli ve gereklidir. Oksijenle sürekli temas halinde olmak serbest radikal oluşumunu da beraberinde getirir. Serbest radikal oluşumundaki artışa ve/veya antioksidan sistemdeki yetersizliğe bağlı olarak organizmada oksidatif stres gelişir (65).

2.3.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış orbitalinde ortaklanmamış bir elektron taşıyan oldukça yüksek reaktiviteye sahip moleküllerdir. Ömürleri çok kısa olan bu tanecikler bir an önce etraflarındaki moleküllerle etkileşime girerek elektron alıp kararlı hale ulaşmaya çalışırlar. Serbest radikaller organizmada metabolik olaylar sırasında oluşabilecekleri gibi, radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasal maddeler gibi çeşitli dış etkenler nedeniyle de oluşabilirler (66).

Aerobik organizmalar yaşamlarını sürdürmek için oksijene gereksinim duyarlar. Oksijen hücrede bir dizi reaksiyondan geçerek suya dönüşür. Böylece hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlar. Bu süreçte oksijenin % 2-3 kadarı suya dönüşmeyip oksijen kaynaklı radikaller oluşur. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali, iki elektron alarak indirgenmesi ile hidrojen peroksit, üçüncü elektronun eklenmesi ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali, dördüncü elektronun eklenmesiyle de su oluşur (65).

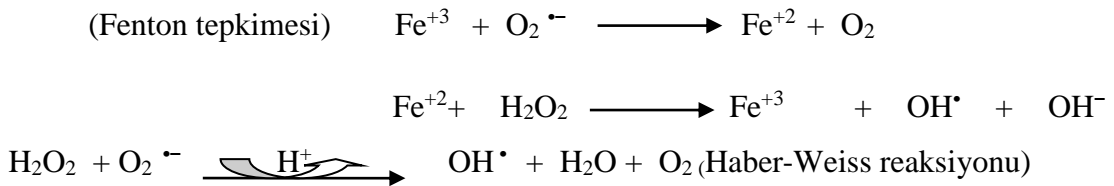
Serbest radikaller organizmada mitokondride ve hücrenin diğer fraksiyonlarında membrana bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar ile oluşur. Bunlar arasında mikrozomal fonksiyonlu oksidaz sistemi, sitoplazmik ksantin oksidaz, hücre membranına bağlı NADPH oksidaz ve lipoksijenazlar gibi enzimlerin kataliz ettiği reaksiyonlar sayılabilir.

Aerobik organizmalarda serbest radikallerin çoğu oksijen ve azot kaynaklıdır. Bunlardan bir kısmı radikal niteliklidir bir kısmı ise bazı reaksiyonlara katıldıktan sonra radikallere dönüşür (65).

Tablo 2.4. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri (67).

Reaktif Oksijen Türleri (ROT)		Reaktif Azot Türleri (RAT)	
Radikaler	Non-Radikaler	Radikaler	Non-Radikaler
Hidroksil OH [•]	Peroksinitrit ONOO ⁻	Nitröz oksit NO [•]	Peroksinitrit OONO ⁻
Süperoksit O ₂ ^{•-}	Hipokloröz Asit HOCl	Azot Dioksit NO ₂ [•]	Peroksinitröz Asit ONOOH
Nitrik oksit NO [•]	Hidrojen Peroksit H ₂ O ₂		Nitroksil NO ⁻
Peroksil RO ₂ [•]	Singlet Oksijen ⁻¹ O ₂		Nitril Klorür NO ₂ Cl
Lipid Peroksil LOO [•]	Ozon O ₃		Nitrotil Katyonu NO ⁺
Alkoksil RO [•]	Lipid Peroksit LOOH		Dinitrojen trioksit N ₂ O ₃
Hidroperoksil OOH [•]			Nitröz Asit HNO ₂

Bu radikaller içinde özellikle hidroksil radikali çok reaktiftir. Bu radikalin oluşumunda demir ve bakır gibi geçiş metalleri çok önemli rol oynar. Süperoksit radikali ve H₂O₂ çok zararlı olmadığı halde, demirin katalitik etkisiyle hidroksil radikaline dönüşebilir. Bu dönüşüm Haber –Weiss/ Fenton reaksiyonları olarak bilinir. Dolayısıyla hidroksil radikali oluşumunu engellemek için süperoksit radikalının ve H₂O₂'nin etkili enzimler tarafından hızla metabolize edilmesi gerekir.



2.3.2. Lipit Peroksidasyonu

Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle başta lipitler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme ve onlara zarar verebilme özelliğindedir (68).

Hücredeki tüm moleküller serbest radikal hasarına uğrayabilirler fakat lipitler buna en yatkın moleküllerdir (69). Serbest radikaller lipitlerin peroksidasyonunu başlatarak hücre membranlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açarlar. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali lipit peroksidasyonunu başlatan başlıca radikallerdir (70).

Lipit peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki α - metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlar ve böylece yağ asidi zinciri bir radikal niteliği kazanır. Bu lipit radikali dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğrar. İlk önce molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatı oluşur. Bu yağ asidi radikali oksijen eklenmesiyle hızlı bir şekilde peroksil radikaline dönüşür. Bu lipit peroksil radikalleri membran yapısındaki diğer çok doymamış yağ asidi moleküllerinden hidrojen atomlarını çıkartarak yeni reaksiyonları başlatır, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşür. Lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile lipit peroksidasyon reaksiyonları sona erer. Lipit hidroperoksitler antioksidanlarla (α -Tokoferol gibi) veya demir içeren proteinlerle (hemoglobin gibi) etkilenebilir; sonuçta hidrokarbon gazlar (etan, pentan) ve doymamış aldehitler (MDA) oluşturur.

MDA, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda oluşan başlıca bir sekonder ürün olup, bu ürünün uzun ömürlü ve yüksek reaktiviteye sahip olması sebebiyle dokulardaki düzeyleri 1960'lı yıllardan günümüze kadar peroksidasyonun şiddetini belirlemek için kullanılmaktadır.

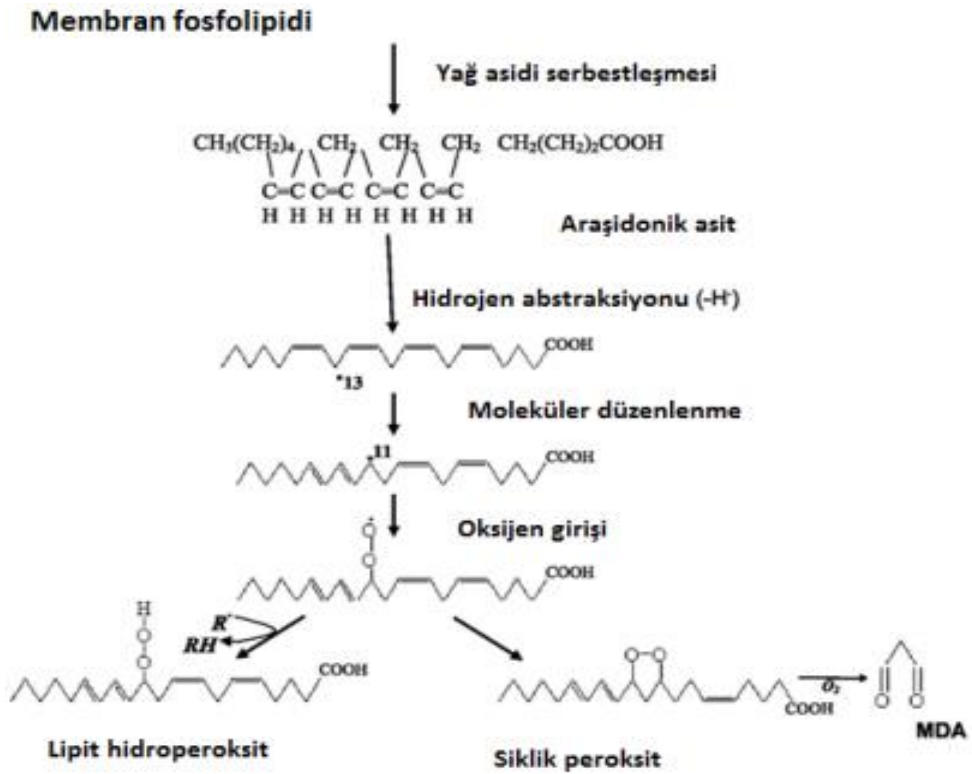
MDA gibi reaktif aldehitler oluştukları bölgeden uzağa diffüze olabildikleri için uzak bölgelerde de doku hasarına sebep olabilirler. MDA en çok linoleik asit, araşidonik asit, doksahekzaenoik asit gibi ikiden fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin

peroksidasyonu ile oluşmaktadır. Bazen eikozanoidlerin enzimatik metabolizması sırasında da ortaya çıkabilmektedir.

Değişik izoformlarda bulunması pH değişikliklerine bağlıdır. Fizyolojik pH'da serbest enolat formunda bulunan MDA, amino gruplarına karşı düşük reaktivite gösterirken düşük pH'da reaktivitesinin artmasından dolayı proteinleri de olumsuz etkilemektedir.

Hücre membranlarında lipit peroksidasyonu sonucu transport sistemi etkilenir, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozular. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve proteazlar aktive olur. Bu olaylar hücre hasarında etkin bir rol oynar. Ayrıca MDA'nın DNA'nın yapısında kırılmalara ve baz değişimlerine neden olduğu da bildirilmektedir (65).

Lipit peroksidasyonunu tespit etmek için kullanılan en yaygın metot kanda ve dokuda malondialdehit (MDA) düzeyini ölçmektir (71).



Şekil 2.10. Lipit peroksidasyonu ve MDA oluşumu (72).

2.3.3. MDA ve Karsinogenez

Son yıllarda reaktif oksijen metabolit üretiminin fizyolojik sınırların üzerinde olduğu zaman ne gibi sonuçlara yol açabileceği konusunda yapılan çalışmalar pek çok hastalığın patofizyolojisinde serbest radikallerin de rolü olduğunu ortaya koymuştur. Serbest radikallerin kanser, inflamasyon hasarı, yaşlanma ve kimyasal toksisite gibi olayların gelişmesinde rol aldığı bilinmektedir.

Serbest radikallerin direkt olarak DNA hasarı yaparak çeşitli mutasyonlara neden olduğu (p53 tümör süpresör geninde olduğu gibi) ve bunun da akciğer kanseri etiopatogenezinde rol aldığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (73).

Oksidanlar lehine bir oksidan / antioksidan dengesizliği, havayolu epitel hücrelerinde direkt hasara yol açabilir. Ayrıca bu tip bir hasar anti proteazların oksidatif inaktivasyonu yoluyla dolaylı olarak da proteolitik etkide bir artış sonucu gelişebilecek akciğer bağ dokusu hasarıyla sonuçlanabilir (74).

Alataş ve arkadaşları bronş kanserli ve malign plevral mezotelyomalı hastalarda plazma lipid peroksit düzeylerini kontrol olgularına göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (75). Başka çalışmalar da akciğer kanserli hastaların MDA düzeylerini kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek saptamışlardır (76).

Gencer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, akciğer kanserli hastalarda oksidatif stresin arttığı ve bu artışın prognozu daha kötü olan küçük hücreli kanserlerde daha fazla olduğu saptanmıştır (77).

Plevra hastalıklarında ise serbest radikallerin rolü henüz tam olarak bilinmemektedir. İnflamatuvar süreçte artmış lipit peroksidasyonunun plevra boşluğunda sıvı eksudasyonundan sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Hayvan modeli plörezilerde lipit peroksidasyonu ürünlerinin akut faz cevabı ile korele olduğu gösterilmiştir. Plevra sıvısındaki MDA'nın iki kaynaktan oluştuğu ileri sürülmektedir. İlk kaynak inflame kapiller yoluyla plevral boşluk içine artmış oranda kaçan plazma ve plazma proteinleridir. İkinci kaynak ise inflamatuvar hücrelerde artmış lipit peroksidasyon yolu ile oluşan lokal üretilimdir (9, 78).

Hammouda ve arkadaşları 63'ü eksüda ve 37'si transüda olmak üzere 100 hastada plevra sıvısı MDA düzeyini çalışmışlar ve eksüdatif sıvılarda, transüdatif sıvılara göre belirgin farklı bulmuşlardır (78).

2.4. Plevranın Yapı ve İşlevi

Plevra, akciğerler, mediasten, perikard, göğüs duvarı ve diyaframı kaplayan seröz bir zardır. Akciğer parankimini örten parça visseral plevra, hemitoraksı iç yüzden örten parça ise pariyetal plevradır. Pariyetal ve visseral plevra arasında kalan boşluğa plevral boşluk denir. Plevra yaprakları hilusta birleşirler ve normal şartlar altında bu yapraklar arasında yapışıklığı önleyecek az miktarda sıvı bulunur. Bu sıvı yaklaşık olarak 0,1-0,3 mL/kg kadardır ve renksiz görünümündedir. Plevral sıvı serumun ultrafiltratıdır ve seruma göre çok daha az protein ve lenfosit, monosit, makrofaj ve mezotel gibi çeşitli hücreler içerir (79, 80).

Potansiyel bir boşluk özelliği taşıyan ve içinde 20 mL civarında sıvı bulunduran plevral aralığın üç önemli işlevi vardır: Torasik organların hacimlerinin belirlenmesine katkıda bulunur; akciğerin kollabe olmaya eğilimi ile göğüs duvarının dışı doğru çekilme eğilimi plevral aralığın negatif basıncı ile dengelenir. Plevral aralıktaki az miktardaki sıvı sayesinde, karşılıklı duran mezotel hücrelerinin yapısal çıkıntıları, solunum hareketleri sırasında, göğüs duvarı ile akciğer arasında kaymayı sağlar. Ayrıca plevral boşluğun parankime gelen fazla sıvının drenajı için de alan oluşturma gibi bir faydası da vardır (8).

2.4.1. Plevral Sıvı Dinamiği

Normal şartlarda plevra sıvısının büyük kısmı pariyetal plevranın sistemik damarlarından salınır. Boşlukta biriken sıvı yine pariyetal plevradan drene edilir. Pariyetal plevrada doğrudan lenfatiklere açılan ağızlar (stoma) vardır. Plevral sıvı drenajının %75'i bu ağızlar ile olur. Plevra sıvısı kapillerler ve plevral boşluk arasındaki onkotik/hidrostatik basınç gradiyentine göre salınır ve emilir (81, 82).

Tablo 2.5. Plevral efüzyon oluşum mekanizmaları (83).

Kapiller Geçirgenlikte Artış	Pnömoni Tümör implantları
Hidrostatik Basınçta Artış	Konjestif kalp yetmezliği
Onkotik Basınçta Azalma	Hipoalbüminemi (Siroz, Nefrotik Sendrom vs)
Negatif İntraplevral Basınçta Artma	Atelektazi
Lenfatik Drenajda Azalma	Tümör ile lenfatik obstrüksiyon Radyasyona bağlı fibrozis Yaygın lenfatik metastaz

Plevral boşlukta normalden fazla sıvı birikiminin iki temel nedeni vardır: artmış sıvı oluşumu ya da azalmış sıvı emilimi. Artmış plevral sıvının patogenezi şöyledir. Akciğerin interstisyel alanında artmış sıvı, plevral intravasküler hidrostatik basınçta artma, plevral aralıkta artmış protein konsantrasyonu, intraplevral basınç negatifliğinde artma, peritoneal kavitede fazla sıvı birikimi. Plevral sıvı emiliminde azalma ise plevral lenfatik drenajın azalması, lenfatik akım obstrüksiyonu veya sistemik vasküler basınçta artma nedeni ile oluşur. Plevral aralıkta fazla sıvı toplanması plevra, akciğer veya lenfatikler sağlamken, sadece hidrostatik ve/veya onkotik basınç değişikliklerine bağlı olarak serumdan fazla ultrafiltrasyon nedeniyle oluşabileceği gibi, doğrudan plevra, akciğerler ya da lenfatik akımda patolojik değişiklikler sonucu da oluşabilir. Birinci grupta toplanan sıvı serumun bir ultrafiltratıdır yani normal fizyolojik plevral sıvı ile aynı protein ve hücre özelliklerini taşır, bu tip sıvılara transüda nitelikli sıvılar denir. İkinci durumda ise plevral sıvı fizyolojik sıvıya göre daha yüksek konsantrasyonda protein ve hücresel eleman içerir. Bu tip sıvılara da eksüda nitelikli sıvılar denir (84, 85).

2.4.2. Plevral Sıvının Transüda/Eksüda Ayrımı

Plevral efüzyonu olan bir hastada torasentezle alınan sıvının değerlendirilmesinde yapılacak ilk iş transüda eksüda ayrımıdır. Bu ayrım Light kriterleri olarak adlandırılan üç kriter ile yapılmaktadır.

Plevral sıvı proteini/ serum proteini $> 0,5$ olması,

Plevral sıvı LDH/ serum LDH $> 0,6$ olması,

Plevral sıvı LDH > 200 IU olması. Bu üç kriterden bir ya da fazlası varsa sıvı eksüda niteliğindedir. Hiç biri yoksa transüdadır (81, 86, 87).

Tablo 2.6. Plevral sıvı transüda/eksüda ayrımı (83).

	Normal Plevral Sıvı	Transüda	Eksüda
Protein (plevral/serum)	0.1-0.3	<0.5	>0.5
LDH (plevral/serum)	<0.5	<0.6	$>0.6-0.7$
Albümin	0.5-0.7	<0.7	>0.7
pH	>7.6	>7.2	<7.2
Hücre/mm ³	<1000	<5000	$>10\ 000$
Glukoz mg/dL	Plazma ile aynı	Plazma ile aynı	<40
LDH: Laktik Asit Dehidrogenaz			

Light kriterlerinin duyarlılığı oldukça yüksek, özgüllüğü ise kısmen daha düşük, %75-80 arasındadır. Yani transüdalı olguların yaklaşık %20-25'i yanlışlıkla eksüda tanısı alabilir. Son zamanlarda sıvının transüda/eksüda ayrımını Light kriterlerine göre daha yüksek özgüllükte yapabileceği öngörülen parametreler çalışılmıştır. Örneğin; kolesterol, alkalen fosfataz, bilirubin, ürik asit gibi. Fakat bunların hiçbiri Light kriterlerine göre daha yüksek özgüllük verememiştir (86), (88).

2.4.3. Eksüdatif Plevral Efüzyona Sebep Olan Hastalıklar

1- Neoplastik hastalıklar

- Metastatik hastalık (akciğer, meme)
- Mezotelyoma, Lenfoma

2- İnfeksiyöz hastalıklar

- Bakteriyel infeksiyonlar (parapnömonik)
- Tüberküloz
- Fungal (Aspergillozis, blastomikozis, kriptokozis, histoplazmoz)
- Viral, Paraziter (kist hidatik, amebiazis, askariazis, paragonimiyazis)
- Diğer (aktinomikozis, nokardiyozis, abdominal abseler)

3- Kardiyovasküler hastalıklar

- Koroner arter bypass cerrahisi
- Postkardiak injuri sendromu
- Perikardial hastalık

4- Gastrointestinal hastalıklar

- Pankreas hastalıkları (pankreatit, pankreas psödokisti)
- Özefagus perforasyonu
- Abdominal cerrahi, diyafram hernisi

5- Kollajen vasküler hastalıklar

- Romatoid plörezi
- Sistemik Lupus Plörezi
- İlaça bağlı lupus
- Sjögren Sendromu
- Churg-Straus Sendromu
- Wegener Granulomatozu
- Ailevi Akdeniz Ateşi
- İmmunoblastik Lenfadenopati

6- Kadın Hastalıkları ve Doğum

- Overin Hiperstümlasyon Sendromu
- Postpartum plevral efüzyon
- Endometriazis
- Fetal plevral efüzyon

7- Lenfatik Sistem Hastalıkları

- Şilotoraks
- Lenfanjiomiyomatozis

8- İlaçlara Bağlı Plevra Hastalıkları

- Nitrofurantoin, Dantrolen, Metiserjit, Amiodaron, Metotreksat, Prokarbazin, Ergot Alkaloidleri, Mitomisin, Bleomisin, Bromokriptin, Klozapin

9- Diğer Hastalıklar

- Asbeste maruz kalma
- Akciğer Transplantasyonu
- Kemik iliği Transplantasyonu
- Radyasyona maruz kalma
- ARDS
- Sarkoidoz
- Üremi
- Amiloidoz
- Whipple Hastalığı
- Torakotomi

2.4.4. Transüdatif Plevral Efüzyona Sebep Olan Hastalıklar

- 1- Konjestif kalp yetmezliği
- 2- Siroz
- 3- Nefrotik sendrom
- 4- Glomerulonefrit
- 5- Periton diyalizi

- 6- Böbrek yetmezliği
- 7- Ürinotoraks
- 8- Miksödem
- 9- Pulmoner emboli
- 10- Atelektazi
- 11- Sarkoidoz
- 12- Vena Cava Superior Sendromu 1
- 13- Meigs sendromu
- 14- Konstriktif perikardit
- 15- Hipoalbuminemi
- 16- Plevraya Serebrospinal sıvı sızması

2.4.5. Konjestif Kalp Yetmezliğinde Plevral Sıvı

Konjestif kalp yetmezliğinde (KKY) pleural sıvı olguların yaklaşık yarısında eşlik eder. Tüm pleural sıvıların %35-40'ı, transüda nitelikli sıvıların %70'i KKY'ye bağlıdır (81), (89).

Kalp yetmezliğinde artan pulmoner venöz basınç nedeniyle kapillerlerden akciğer interstisyumuna sıvı sızar, bu sıvı oradan da pleural boşluğa geçer.

KKY'ye bağlı klinik tabloya, akciğer grafisinde kalp gölge büyümesi ve damarsal görünüm artışları ile birlikte bilateral veya az miktarda tek taraflı sıvı eşlik ediyorsa KKY nedenli sıvı tanısı koymak için yeterlidir. Fakat yine de konjestif kalp yetmezliğinde tanı klinik, radyolojik ve pleural sıvının biyokimyasal analizi sonucuna göre konur.

Tedavi için etkili bir diürez gereklidir. Çok miktarda sıvısı olanlarda belirgin nefes darlığı da varsa, torasentezle 500-1000 mL sıvı boşaltılması erken iyilik sağlayabilir.

2.4.6. Malign Plevral Sıvı

Malign plevral sıvı, malign bir hastalığın doğrudan ya da dolaylı olarak plevrayı etkilemesi sonucu oluşur. Eksüdatif sıvılar içinde en sık saptanan ikinci nedendir. Malign sıvıların %75-80'inden sorumlu olan üç malign hastalık vardır: akciğer kanseri, meme kanseri, lenfoma (82), (90).

Malign bir patolojide plevral sıvı oluşma mekanizmaları şöyledir:

Plevranın doğrudan tutumu; böylece, kan damarlarının tümoral etkilenimi ile geçirgenliklerinin artışı.

Plevrayı tutan tümör dokusunun salgısı: Plevra yüzeyinin tutulumu ya da lenfatik drenaj alanının tutulumu ile lenfatik drenajın engellenmesi.

Şilotoraks

Malign efüzyonların görünümü seröz, seröanjinoz veya hemorajik olabilir. Seröz sıvı lenfatik obstrüksiyona veya bronşial lezyonun atelettazisine bağlı olabilirken, hemorajik sıvı genellikle tümörün plevral tutulumuna bağlıdır. Malign efüzyonlar çoğunlukla eksüda karakterindedir ancak % 5 -10 kadarı transüda niteliğinde olabilir. Bunun nedeni, lenfatik obstrüksiyonun erken dönemi, bronşiyal obstrüksiyona bağlı atelettazi veya malignitenin yanında hastada ek konjestif kalp yetmezliğinin olması olabilir (91).

Malign plevral efüzyon tanısı genellikle plevral sıvı sitolojisi veya plevral doku biyopsisinde malign hücrelerin görülmesi ile konulur. Tümör hücrelerinin malign sıvıda gösterilmesi malign efüzyon tanısı koydurur. Ancak alınan negatif sonuç tümör olasılığını ekarte ettirmez. Plevral maligniteye bağlı efüzyonlarda ilk sitolojik incelemede %60'a varan malign hücre görülebilir. Eğer üç ayrı sıvı örneği gönderildiyse tanı şansı %90'a kadar çıkabilir. Plevral sitolojilerde primer veya metastatik tümörler için belirlenen sitolojik kriterler olmakla beraber, reaktif mezotel hücreleri tanıda yanılgılara sebep olabilir. Çapları ve nükleusları büyüyen hücreler hem malign mezotelyoma hem de metastatik tümörleri taklit edebilir. Plevra biyopsisi ayırıcı tanıda yararlıdır. Ancak yine de tanı konulamayan durumlarda

sitolojik preparatlar histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak PAS, müsikarmen, keratin, CEA, CD15 ile boyanarak ayırıcı tanıya gidilmelidir (92).

Tablo 2.7. Malign plevral efüzyonun en sık görülen nedenleri (83).

<i>Erkek Hastalar</i>	<i>Kadın Hastalar</i>
Akciğer Kanseri (%50)	Meme Kanseri (%40)
Lenfoma/Lösemi (%20)	Genital Sistem Tümörleri (%20)
Gastrointestinal Sistem Tümörleri	Akciğer Kanseri (%15)
Genitoüriner Sistem Tümörleri	Lenfoma/Lösemi
Melanom	Gastrointestinal Sistem Tümörleri

2.4.7. Parapnömonik Plörezi

Pnömoni, abse gibi bir akciğer enfeksiyonu geçirirken aynı tarafta eksüda niteliğinde plevral sıvı toplanmasına parapnömonik plörezi denir. Tüm plevral sıvıların yaklaşık üçte biri bu gruptadır. Pnömoni nedeniyle hastaneye yatırılan hastaların %20-40'ında parapnömonik sıvı gelişirken, bunların yaklaşık %5-10'unda sıvı rezorbe olmayarak ampiyeme ilerler (93). Tanı etkenin plevral sıvıda, balgamda üretilmesi gibi mikrobiyolojik tetkikler ile konur.

Normalde plevral aralıkta 3-7 ml kadar transüda vasfında sıvı vardır (94). Pnömoni vakalarında pnömonik alana komşu plevrada mezotelyal hücrelerde permeabilite değişerek proteinden zengin eksüda vasfında sıvı hızlı bir şekilde toplanmaya başlar. Nötrofiller submezotelyal kapillerlerden ve mezotelyal tabakadan geçerek plevral sıvıya geçer ve plevral aralıkta bakteriyel invazyona engel olmaya çalışır. Mezotelyal hücreler bakterileri fagosite ederek ve bakterisidal konsantrasyonlarda toksik oksijen metabolitleri ve nitrik oksit salıvererek bakteriyel yayımı sınırlamaya çalışır (95).

Komplike olmayan parapnömonik efüzyonlar enfekte değildir, pH normal ve LDH 1000 IU'den azdır. Eksüda niteliğindeki bu sıvı başlangıçta serözanjinöz bir görüntü verir. Sorun ilerledikçe artan PMNL'ler nedeni ile sıvı görünümü bulanıklaşır. Plevra boşluğunun enfekte olduğu sıvılar komplike parapnömonik efüzyonlar olarak

değerlendirilir ve bu durumda metabolizmanın artmasına bağlı glukoz ve pH düşer, LDH yükselir. Eğer plevral sıvının mikrobiyolojik yaymasında mikroorganizma görülürse ampiyem olarak değerlendirilir. Tedavinin temeli antibiyotik uygulamasıdır. Erken dönemde drenaj gerekmez ancak ilerleyen dönemlerde önem kazanabilir (96).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gönüllü Seçimi

Çalışmamız için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 28 Şubat 2011 tarihinde 25-487 sayılı etik kurul izni alınmıştır. Araştırmaya katılan tüm gönüllülerin aydınlatılmış onamları alınmıştır. Çalışmamızda kullandığımız numuneler 1 Mart 2011 tarihinden itibaren Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları Ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Ve Araştırma Hastanesi'ndeki hastalardan toplanmıştır. Bu çalışma için hastalara ek bir işlem uygulanmamış olup tanı ve/veya tedavi amaçlı yapılan torasentez sonucu hastalardan alınmak zorunda olan plevral sıvıdan bir tüp de bizim çalışmamız için ayrılmıştır. Yeterli sayıya ulaştığımız 15 Temmuz 2012 tarihine kadar alınan plevral sıvı örnekleri çalışma gününe kadar -80 °C de biriktirilmiştir. Çalışma grupları oluşturulduktan sonra Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Prof. Dr. Zuhal Yurtaslanı Araştırma Laboratuvarında MDA, NO, NOS ve Arginaz ölçümleri yapılmıştır.

Üç çalışma grubu düşünülmüştür. Birinci grup hastalar göğüs hastalıkları kliniğinde pnömoni tanısı almış olup akciğerlerinde biriken sıvı light kriterleri ile değerlendirilmiş eksüda olduğu tespit edilmiş, sitopatolojik incelenmesinde iltihap hücreleri görülmüş ve parapnömonik sıvı olarak adlandırılmıştır. Ve bu grupta toplam 28 hasta çalışılmıştır. Gruptaki hastaların yaşlarının aritmetik ortalaması 56'dır ve hastaların 7'si kadın, 21'i erkektir.

İkinci hasta grubumuz ise yine 28 kişiden oluşmaktadır ve bu hastalarımız malign grup olarak adlandırılmıştır. Çünkü bu gruptaki hastalarımızın hepsi - farklı alt grupları olabilmekle birlikte - akciğer kanseri tanısı almışlardır. Akciğerlerinde biriken sıvılarda yapılan analizlerde eksüda niteliği taşıdığı ortaya çıkmış olup sitopatolojik incelemelerinin sonucu ise 'malign tümöral hücre içeren plevra sıvısı' olarak gelmiştir. Hastaların yaşlarının aritmetik ortalaması 62'dir ve grupta 8 kadın, 20 erkek hasta bulunmaktadır.

Üçüncü grup hastalarımız 24 kişiden oluşmaktadır. Yaşlarının ortalaması 70'tir ve 4 kadın 20 erkek hasta bulunmaktadır. Bu hastalara yapılan eko (ekokardiyografi) sonucu EF (ejeksiyon fraksiyonu) < %40 bulunmuş ve kalp yetmezliği tanısı koyulmuştur. Bu gruptaki hastalarımızın akciğerlerinde de masif sıvı birikimi vardır ve bu sıvılardan yapılan incelemelerde transüda tarzı sıvı olduğu ve bunun KKY (konjestif kalp yetmezliği)'ye bağlı olduğu gösterilmiştir.

3.2. Gereçler

3.2.1. Cihazlar

Sanyo Ultra Low MDF-U4086S marka derin dondurucu (-80 C°)

Altus AL380 marka buzdolabı (+4 C°)

Arçelik marka buzdolabı (+4 C°)

Hassas elektronik terazi (Sartorius Basic marka)

Sabit /ayarlanabilir pipetler (Axygen, Socorex ve Brand marka)

Spektrofotometre (Helios- α , Unicam marka)

Sorvall RMC 14 marka santrifüj

Harrier 18/80 marka soğutmalı santrifüj

Heraus Labofur 200 marka soğutmalı santrifüj

Whirlmix 20 W vorteks

Agitador vorteks

Grant Ins marka su banyosu

Jelotech BW-20H su banyosu

Çeşitli boyutlarda cam ve polipropilen deney tüpleri

3.2.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan tüm kimyasal maddeler (triklor asetik asit, tiyobarbitürik asit, $MnCl_2$, arginin, ninhidrin, ornitin, HCl, sülfanilik asit, naftilendiamin) Sigma-Aldrich ve Merck Kimya şirketlerinden sağlanmıştır.

3.3. MDA Düzeyinin Belirlenmesi

MDA lipid peroksidasyonunun son ürünü olduğundan dolayı oksidatif stresin göstergesi olarak çok sık kullanılmaktadır. MDA tayini, Tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın reaksiyon vererek 532 nm dalga boyunda ölçülebilen renkli bir bileşik vermesi esasına dayanmaktadır (97). Tetraetoksipropan standart olarak kullanılır. Sonuçlar nmol/ml olarak tanımlanır. Bu yöntemde tiyobarbitürik asitle reaksiyon veren maddeler ölçülür ve literatürde TBARS olarak adlandırılır (98).

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM): 2,13 g Na_2HPO_4 ve 11,56 g KH_2PO_4 tartılarak distile suda çözüldükten sonra hacim distile suyla 1 L'ye tamamlanır.

Trikloroasetik asit (TCA; % 20 w/v): 500 mL 0,6 N HCl içinde 100 g katı TCA çözülerek hazırlanır.

TBA çözeltisi (% 2 w/v): 200 mg katı TBA 10 mL distile suda çözülür.

Etil alkol (% 95; v/v).

Tablo 3.1. MDA ölçüm yöntemine ait protokol.

	NUMUNE	KÖR
SÜPERNATAN	100 µl	100 µl
ETİL ALKOL	1 ml	1 ml
FOSFAT TAMPONU	1 ml	1 ml
TCA	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	-

30 dakika boyunca kaynar suda inkübe edilen deney tüpleri 4000 devirde 20 dk süreyle santrifüj edilir. Spektrofotometrik ölçüm sırasında kör tüplerine 1 ml TBA çözeltisi konulur. 532 nm dalga boyunda numune ve kör tüplerindeki çözeltilerin absorbansları distile suya karşı spektrofotometrik olarak ölçülür.

Bu ölçümde MDA standardı olarak tetraetoksipropan (TEP) kullanılır (% 96; d=0,92; MA= 220,3).

TEP molaritesinin hesaplanması:

$$0,92 \times 1000 = 920 \text{ g (TEP çözeltisinin 1 litresinin ağırlığı)}$$

$$920: 100 \times 96 = 883,2 \text{ g (1 litre çözeltideki TEP miktarı)}$$

$883,2: 220,3 = 4 \text{ mol TEP}$ (1 litre çözeltide 4 mol TEP olduğu için, çözeltideki TEP'in konsantrasyonu 4 molar (M)'dir.

4 M'lık çözelti etil alkolle 400.000 kat dilüe edilerek, 10 µM'lık standart çözelti elde edilir. Aynı deney protokolü standart ve standart körü için de uygulanır ve spektrofotometrede absorbanslar okunur. Buna göre 'Faktör' değeri aşağıda görüldüğü şekilde 161,3 olarak hesaplanır.

$$\text{Standartın optik dansitesi (ODs)} = 0,152$$

$$\text{Standart körünün optik dansitesi} = 0,090$$

$$\Delta OD_S = 0,062$$

$$\begin{aligned} \text{MDA konsantrasyonu (nmol/ml)} &= \Delta OD_N \times \text{Standardın konsantrasyonu} / \Delta OD_S \\ &= \Delta OD_N \times 10 \mu\text{M} / 0,062 \\ &= \Delta OD_N \times 161,3 \end{aligned}$$

Çalışmamızda süpernatantlar 100 µl yerine 200 µl olarak alınmıştır. Buna göre hesaplama aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

$$\text{MDA (nmol/ml)} = \Delta OD \times 161,3 \times (1/2)$$

$$= \boxed{\Delta OD \times 80,65}$$

3.4. Nitrik Oksit (NO^{*}) Miktarı Ölçüm Yöntemi

Deneyin prensibi; NO^{*}'nun asidik ortamda, sülfanilik asiti diazotizasyonu ve ardından naftiletilediamin ile reaksiyona girmesi esasına dayanmaktadır. Sonuçta ortaya çıkan renkli bileşiğin absorbanı, spektrofotometrede 540 nm'de okunur. Ölçülen değer NO^{*} konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (99).

Kullanılan reaktifler:

Sülfanilik asit çözeltisi: 10 ml distile suda 180 mg sülfanilik asit çözülür.

Naftiletilediamin çözeltisi: 10 ml distile suda 162 mg naftiletilediamin çözülür.

Hidroklorik asit (HCl): 10 ml distile suda 50 µl %37'lik HCl çözülür.

200 µl numuneye % 20'lik 20 µl TCA eklenir, 5 dakika süreyle inkübe edilir. Daha sonra 200 µl distile su ilave edilir. 5 dakika süreyle 5000 devirde santrifüj edildikten sonra süpernatant alınır ve içine kadmiyum (Cd) metali konulur. 24 saat bekletildikten sonra aşağıdaki protokol uygulanır.

Tablo 3.2. NO• ölçüm yöntemine ait protokol

	KÖR	NUMUNE
SÜZÜNTÜ	100 µl	100 µl
HCl	250 µl	250 µl
SÜLFANİLİK ASİT	250 µl	250 µl
NAFTİETİLENDİAMİN	-	250 µl
DİSTİLE SU	250 µl	-

Son işlemden sonra tüpler 10 dk oda sıcaklığında bekletilir ve daha sonra spektrofotometrede, 540 nm'de distile suya karşı okunur. NO• konsantrasyonu, hazırlanan standartla elde edilen OD değerinden yararlanılarak hesaplanır.

Standardın konsantrasyonu 25 mM, OD'si ise 0,1 çıkmıştır.

Buna göre bulunan 'Faktör' değeri 250'dir.

$$\text{NO}^\bullet \text{ konsantrasyonu (mM)} = (\text{OD}_N - \text{OD}_{\text{Kör}}) \times 250$$

3.5. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Nitrik oksit, L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla oluşmaktadır. Bu deneyin prensibi, L-argininden oluşan NO•'nun asidik ortamda sülfanilik asiti diazotizasyonu ve naftietilendiamin ile reaksiyona girmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyonda oluşan renkli çözeltinin absorbanı spektrofotometrede, 540 nm dalga boyunda okunur. Bulunan değer NO• konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Birim zamanda oluşan NO• miktarı üzerinden NOS aktivitesi hesaplanır (100).

Bu ölçüm yönteminde kullanılan reaktifler:

Sülfanilik asit çözeltisi: 10 ml distile suda 180 mg sülfanilik asit çözülür.

Naftietilendiamin çözeltisi: 10 ml distile suda 162 mg naftietilendiamin çözülür.

HCl: 10 ml distile suda 50 µl HCl çözülür.

Substrat çözeltisi: 10 ml distile suda 700 mg arginin çözülür.

Tablo 3.3. NOS enzim aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol

	KÖR	NUMUNE	STANDART KÖRÜ	STANDART
STANDART	-	-	-	100 µl
NUMUNE	100 µl	100 µl	-	-
ARGİNİN	-	100 µl	-	-
DİSTİLE SU	100 µl	-	200 µl	100 µl

Tüpler oda sıcaklığında 1 saat bekletilir.

%20 TCA	20µl	20µl	20µl	20µl
ARGİNİN	100 µl	-	100 µl	100 µl
SU	-	100 µl	-	-

Tüpler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir ve 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilir. Daha sonra süpernatantlar alınır ve içine kadmiyum (Cd) konulan tüpler 24 saat bekletilir ve Cd'lar çıkartıldıktan sonra çalışmaya aşağıdaki şekilde devam edilir.

SÜZÜNTÜ	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
HCL	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
SÜLFANİLİK ASİT	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
NAFTİLENDİAMİN	-	250 µl	250 µl	250 µl
DİSTİLE SU	250 µl	-	-	-

Bu aşamalar da yapıldıktan sonra tüpler oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilir. Daha sonra spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbanlar okunur. Standart olarak sodyum nitroprusid kullanılır. NOS aktivitesi standardın optik dansite değerinden yararlanılarak hesaplanır. Buna göre 'Faktör' değeri 37,5 olarak bulunur.

$$\text{NOS aktivitesi (IU/ml)} = (\Delta\text{ODN} - \Delta\text{ODKör}) \times 37,5$$

3.6. Arginaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Yöntemin prensibi argininden arginaz enziminin hidroliziyle açığa çıkan ornitinin 515 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Oluşan ornitin miktarı arginaz aktivitesiyle doğru orantılıdır (101).

Hesaplama da kullanılan reaktifler şunlardır:

100 mM ninhidrin çözeltisi: 2,5 gr ninhidrin 60 ml derişik glasiyel asetik asitte çözülür. Üzerine 23,9 ml distile su ile 16,1 ml ortofosforik asit koyulur tamamı 100 ml olur.

10 mM MnCl₂ çözeltisi: 1,26 gr MnCl₂ 1 lt suda çözülür.

Karbonat tamponu (75 mM; pH:9,8) hazırlanır. 3,5 gr Na₂CO₃ ve 3,53 gr NaHCO₃ 1 litrede çözülür.

25 mM arginin çözeltisi karbonat tamponunda hazırlanır.174,2 mg arginin 40 ml karbonat tamponunda çözülür.

Standart çözeltisi: 2,5 mg ornitin tartılır 10 ml karbonat tamponunda 1,5 mM olarak taze hazırlanır.

Tablo 3.4. Arginaz aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol.

	KÖR 1	NUMUNE	St KÖR	STANDART
NUMUNE	-	50 µl	-	-
MnCl ₂ ÇÖZELTİSİ	-	50 µl	-	-

20 dakika 55 °C’de inkübe edilir

ARGİNİN ÇÖZELTİSİ	-	0,4 ml	-	-
-------------------	---	--------	---	---

15 dakika 37 °C’de inkübe edilir.

ARGİNİN ÇÖZELTİSİ	0,4 ml	-	-	-
MnCl ₂ ÇÖZELTİSİ	50 µl	-	50 µl	50 µl
ASETİK ASİT	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
NİNHİDRİN ÇÖZELTİSİ	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
NUMUNE	50 µl	-	-	-
ST ÇÖZELTİSİ	-	-	-	50 µl
KARBONAT TAMPONU	-	-	450 µl	400 µl

Tüm bu aşamalardan sonra tüm tüpler 30 dakika su banyosunda kaynatılır ve hepsi 515 nm dalga boyunda distile suya karşı spektrofotometrede ölçülür. Elde edilen optik dansiteler aşağıdaki formülde yerine konularak arginaz aktivitesi hesaplanır. Arginaz enzim aktivitesi (IU/L); 1 dakikada 37°C’de 1 µmol ornitin açığa çıkaran enzim miktarı olarak ifade edilir.

Standart körü 0,004 standart ise 0,487 olarak hesaplanmıştır.

Arginaz enzim aktivitesi (IU/L) = [(OD_N - OD_{Kör}) / (OD_{st}-OD_{stkör})] x St kons x 1/15

$$= [(OD_N - OD_{Kör}) / (OD_{st} - OD_{stkör})] \times 1500 \mu\text{mol/L} \times 1/15$$

$$= [(OD_N - OD_{Kör}) / (OD_{st} - OD_{stkör})] \times 100$$

Bizim çalışmamızda numuneler 10 kat sulandırılarak çalışıldığı için formüle ayrıca x10 u da ekliyoruz dolayısıyla son hali şöyle oluyor.

$$\text{IU/L} = [(OD_N - OD_{Kör}) / (OD_{st} - OD_{stkör})] \times 100 \times 10$$

3.7. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS Windows 15 paket programında yapılmıştır. Gruplardaki değerler normal dağılım göstermemiştir. Bu yüzden non-parametrik test kullanılmıştır. Üç grubun birbiri arasındaki farklılığını değerlendirmek amacıyla *Kruskal- Wallis* varyans analizi uygulanmıştır. p<0,05 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda pnömoni, KKY (konjestif kalp yetmezliği) ve malignitesi olan hastalardan oluşan üç grup bulunmaktadır. Bu gruplarda hastalardan alınan plevra sıvılarında NO, NOS, MDA ve arginaz ölçümleri yapılmıştır. Gruplar kendi içlerinde normal dağılım göstermediğinden, gruplar arasında ortanca değerler açısından farkların önemliliği non-parametrik test olan *Kruskal-Wallis* varyans analizi ile incelenmiş, sonuçlar ortalama±SEM ve medyan olarak verilmiştir. Üç grup arasında anlamlı fark olduğu görülünce, post hoc çoklu karşılaştırma testi ile de farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığı incelenmiştir.

Tablo 4.1. Gruplar arası NO ve MDA düzeyleri ile NOS ve Arginaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması

GRUPLAR	Arginaz (IU/L)	NO (mM)	NOS (IU/ml)	MDA (nmol/ml)
	Ort±SEM Medyan (Min-maks)	Ort±SEM Medyan (Min-maks)	Ort±SEM Medyan (Min-maks)	Ort±SEM Medyan (Min-maks)
Pnömoni (n=28)	198,6±65,8 53,83 (16,5-1643)	15,85±1,58 14,75 (8,7-56,7)	6,95±0,18 6,31 (5,4-9,1)	2,51±0,3 1,93 (1,2-8,1)
Malign (n=28)	78,45±2 78,67 (57,9-95)	45,5±2,22 48,25 (23,7-61,7)	10,94±0,33 10,93 (5,5-14,1)	1,49±0,23 1,08 (0,5-5)
KKY (n=24)	90,75±36,9 16,56 (2-848)	14,52±1,24 13 (8,7-39,7)	5,99±0,41 6,54 (2,9-9,6)	1,37±0,2 1,25 (0,4-5,4)
ANLAMLILIK (p*)	0,003	0,000	0,000	0,000
Pnömoni-malign	1,000	0,000	0,000	0,000
Pnömoni-KKY	0,027	1,000	1,000	0,000
Malign-KKY	0,003	0,000	0,000	1,000

p* <0,05 olan değerler anlamlı farklılık göstermektedir. SEM: Ortalamanın standart hatası

* Kruskal-Wallis Varyans Analizi

Min: Minimum, Maks: Maksimum

Arginaz enzim aktivitesi açısından değerlendirdiğimizde üç grup arasında anlamlı fark çıkmıştır ($p=0,003$). Gruplar arasında çoklu karşılaştırma testi yaptığımızda ise KKY grubunun ortanca değerinin, hem pnömoni hem de malign gruptan anlamlı derecede düşük olduğunu, pnömoni ve malign grupların ise arginaz açısından birbirinden farklı olmadıklarını görmekteyiz.

Nitrik oksit (NO) düzeyleri açısından grupları karşılaştırdığımızda üçü arasında anlamlı farklılık çıkmıştır ($p=0,000$). Çoklu karşılaştırma yapıldığında ise malign grubun NO ortanca değeri, hem pnömoni hem de KKY grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Pnömoni ve KKY grupları arasında ise anlamlı bir fark görülmemiştir.

Nitrik oksit sentaz (NOS) enzim aktivitesi açısından grupları karşılaştırdığımızda üç grup arasında anlamlı fark çıkmıştır ($p=0,000$). Çoklu karşılaştırmada da sonuçlar NO ile benzer bulunmuş, malign grup hem pnömoni hem de KKY grubundan anlamlı derecede yüksek çıkarken, pnömoni ve KKY grupları arasında ise anlamlı bir fark görülmemiştir.

Malondialdehit (MDA) düzeylerini karşılaştırdığımızda üç grup arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p=0,000$). Gruplar arası çoklu karşılaştırmada ise pnömoni grubu, hem malign hem de KKY grubundan anlamlı derecede yüksek çıkmış, KKY ve malign gruplar arasında ise anlamlı bir fark görülmemiştir.

Ayrıca çalışmaya katılan üç grup için de ayrı ayrı Spearman korelasyon analizi yapılmış gruplar içerisinde incelenen parametrelerin birbiri ile olası ilişkisi araştırılmıştır. Yapılan bu analize göre yalnızca pnömoni grubunda arginaz ve MDA düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır ($p=0,002$).

Hastaların başvurdukları hastanede, tanı konması ve transuda/eksuda ayrımının yapılması amacıyla, plevra sıvıları ve serumlarında glukoz, total protein, albümin, LDH (laktat dehidrogenaz) ve ADA (adenozin deaminaz) düzeyleri otoanalizörde ölçülmüş; bu değerler Light kriterleri çerçevesinde yorumlanarak plevra sıvılarının transüda veya eksüda oldukları belirlenmiştir. Buna göre pnömoni ve malign gruplar plevral sıvı proteini/serum proteini $> 0,5$ olması, plevral sıvı LDH/serum LDH $> 0,6$

olması nedeniyle eksüda, KKY grubundaki hastaların plevra sıvısı ise Light kriterlerine uymadığı için transüda olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca bu biyokimyasal parametreler istatistiksel olarak incelendiğinde, gruplar arasında normal dağılım görülmediği için non-parametrik test olan *Kruskal- Wallis* varyans analizi ile ortanca değerler yönünden farkların önemliliği değerlendirilerek aşağıdaki tablo hazırlanmıştır.

Tablo 4.2. Serumda ve plevral sıvıda gruplar arası ADA, total protein, albümin, LDH ve glukoz değerlerinin karşılaştırılması.

	Pnömoni (n=28)	Malign (n=28)	KKY (n=24)	
	Medyan (Min-maks)	Medyan (Min-maks)	Medyan (Min-maks)	p*
PLEVRA				
ADA	19 (4-90)	11 (2-107)	14 (2-66)	0,116
Protein	4,5 (2,5-5,7)	4,4 (2,1-5,8)	1,9 (1-3,8)	0,000
Albümin	2,6 (1,5-3,5)	2,75 (1,4-3,8)	1,25 (1-2,5)	0,000
LDH	295 (84-1877)	244 (58-1182)	82,5 (38-176)	0,000
Glukoz	100 (36-286)	108 (8-317)	132 (75-246)	0,001
SERUM				
ADA	18,5 (9-50)	15 (5-48)	28 (6-56)	0,019
Protein	6,6 (2,6-7,8)	6,8 (5-7,9)	5,95 (4,1-7,5)	0,001
Albümin	3,25 (2,4-4,1)	3,35 (1,9-4,8)	3,2 (1,5-4)	0,167
LDH	171 (91-366)	185 (121-1021)	177 (111-452)	0,286
Glukoz	107 (79-255)	116 (69-375)	128 (78-256)	0,175

p* <0,05 olan değerler anlamlı farklılık göstermektedir. **Min:** Minimum, **Maks:** Maksimum

Hastalardan alınan plevral sıvılarda ölçülen ADA enzim aktivitesi düzeyleri üç grup arasında anlamlı bir fark sergilemezken, protein, albümin, LDH ve glukoz düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermiştir.

Hastalardan plevral sıvı örnekleriyle eş zamanlı alınan, transüda-eksüda ayrımı için değerlendirilen serumlarda ölçülen parametreler istatistiki olarak değerlendirildiğinde, serum ADA ve protein düzeyleri üç grup arasında anlamlı fark göstermiş fakat, albümin, LDH ve glukoz düzeyleri gruplar arasında anlamlı bir fark göstermemiştir.

5. TARTIŞMA

Nitrik oksitin, üzerinde yük taşımaması ve eşleşmemiş elektron bulundurması, kendisinin hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır. Nitrik oksit, taşıdığı eşleşmemiş elektron nedeniyle bir radikal molekül olarak isimlendirilebilir. Serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken, nitrik oksit düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz nitrik oksit sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. Nitrik oksit, bu özellikleri ile çok ideal bir fizyolojik haberci molekül özelliği kazanmaktadır (46, 48).

Plevral efüzyon transüda veya eksüda niteliğinde olabilir. Plevral efüzyon etyolojisinde; pnömoni, malignite, kalp yetmezliği, kollajen doku hastalığı gibi birçok neden olabilir. Plevra hastalıklarında rol oynayan immünolojik ve moleküler mekanizmalar ile ilgili bilgilerimiz oldukça azdır. Belirli hastalıklarda, belirli hücrelerle infiltrasyon ön plandadır. İnflamasyonda mezotel hücreleri tarafından salınan çok sayıda mediatör ve protein rol oynar. Bu mediatörlerden birisi de NO'dur (11). Yapılan deneysel çalışmalarda plevral mezotel hücrelerinin sitokin ve lipopolisakkarid indüksiyonu ile NO sentezini arttırdıkları gösterilmiştir. Bu proinflamatuvar sitokinler ile nitrit/nitrat üretimi artmaktadır (102).

NO, homeostatik olaylarda ve konakçı savunma mekanizmasında önemli bir mediatördür. İnflamatuvar olaylar; sitokin, proinflamatuvar faktörler ve bakteri endotoksinlerinin uyarısı ile iNOS'u arttırarak, NO sentezinin ve dolayısıyla metabolitleri olan nitrit ve nitratın artmasına neden olur. Endotelde, eNOS enzimi ile L-argininden oluşan NO düz kasta cGMP aracılığı ile vazodilatasyona neden olur.

Hayvan deneylerinde, normal farelere carrageenin enjeksiyonu ile oluşturulan eksüdatif plörezilerde nitrit/nitrat değerleri yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada iNOS gen kaybı olan farelerde, normal farelere göre oluşan plöreziye inflamatuvar yanıtın azaldığı izlenmiştir. Yine iNOS gen kaybı olan farelerin plevra sıvılarında nitrit/nitrat daha düşük seviyelerde izlenmiştir (103). Genellikle hayvan

deneylerinde oluşturulan eksüdatif plörezilerde NO yüksek bulunmaktadır veya NOS inhibitörleri verilmesiyle oluşan eksüdata inflamatuvar reaksiyonun azaldığı gözlenmektedir (104). Bunu kanıtlar şekilde Regnault ve arkadaşları, inflamatuvar reaksiyonla oluşan eksüda özelliğindeki plevra sıvılarında nitrik oksit üretiminin normalden yüksek olduğunu bildirmişlerdir (105). Bu bulgular ışığında NO'nun, eksüda gelişiminde rol oynayan bir mediatör olduğu söylenebilir.

Bizim çalışmamızda da NO için tüm gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$). Malign grupta NO ortalama ve ortanca değerleri, hem KKY grubu hem de pnömoni grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Maligniteye bağlı gelişen plevral sıvı eksüda niteliğindedir. Ve malign hücre infiltrasyonu ve buna karşı gelişen immün yanıt sonucu NO değerleri yüksek bulunmuş olabilir. Çünkü NO, inflamasyonun birçok evresinde görev almaktadır (106). Vasküler permeabiliteyi ve lokal kan akımını etkilemektedir (102). Yara iyileşmesi sırasında rejenerasyonun başlamasını indükler ve inflamasyonun tipi ve evresi ile kendi lokal konsantrasyonuna bağlı hem inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar etki oluşturur (107). Parapnömonik efüzyon da eksüda vasfındadır. Çalışmamızda pnömoni grubunun NO düzeyleri ortalaması, transüda tarzı sıvıya sahip olan KKY grubundan kısmen yüksek olsa da anlamlı derecede farklı bulunamamıştır. Bu, hastaların pnömoninin hangi evresinde, inflamasyonun ne aşamada olduğuyla veya hastaların gördüğü tedavi süreciyle de ilgili olabilir.

Çalışmamızda NOS için de benzer sonuçlar çıkmıştır. Malign grup diğer iki gruptan hem miktarca yüksek NOS enzim aktivitesi göstermiş hem de anlamlı bir fark oluşturmuştur ($p<0,001$). Bu sonuçla uyumlu olarak malign grupta NO düzeyi de yüksek bulunmuştur. NOS, argininden NO üretimini sağlayan enzim olduğuna göre, yüksek NOS aktivitesinin yüksek NO düzeyinin nedeni olabileceği düşünülmüştür. Pnömoni grubu KKY grubundan hafif yüksek NO ve NOS değerleri gösterse de anlamlı fark bulunmamıştır.

Arginaz, arginini üre ve ornitine çeviren hidrolitik bir enzimdir. Başlıca karaciğerde bulunan arginaz, üre siklusunun 5. enzimidir. Ekstrahepatik dokularda da bulunabilir ve üre siklusu dışında birçok reaksiyonda da önemli rol oynar (108). Güçlü bir immün

sistem inhibitörü olup, lenfosit proliferasyonunda inhibitör etkiye sahiptir (109).

Arginazın substratı olan L-arginin aynı zamanda NOS tarafından NO sentezi için de kullanılmaktadır (108). Arginazın en önemli görevlerinden birinin de; hücre içi arginin konsantrasyonunu ayarlamak, NOS'un kullanması için daha az arginini uygun hale getirmek ve NO üretimini azaltmaya çalışmak olduğu bilinmektedir (110). Arginaza zıt olarak NO, konak savunma mekanizmasında birçok mikrobiyal patojene karşı çok önemli rol oynayan reaktif bir moleküldür (108).

Şimdiye kadar değişik birçok hastalıkta ve hasta gruplarında serum veya plevral sıvıda arginaz aktivite düzeyleri araştırılmıştır. Elgün ve arkadaşları tüberküloz, pnömoni, akciğer kanseri ve konjestif kalp yetmezliğine bağlı gelişmiş plevral efüzyonlarda nitrik oksit-arginaz ilişkisini araştırmışlar; tüberküloz hastalarında plevral arginaz aktivitesini diğer gruplara göre anlamlı düşük, NO seviyesini ise yüksek bulmuşlardır (108). Biz de çalışmamızdaki hastaların plevral sıvı arginaz aktivitelerinin gruplara bağlı değişimini ve bunun NO ve NOS'la ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda arginaz enzim aktivitesi bakımından üç grup arasında anlamlı fark çıkmıştır ($p=0,003$). Malign grup en düşük arginaz ortalamasına sahip grup bulunmuştur. NOS enzim aktivitesi ortalaması ise malign grupta en yüksek bulunmuştu. Bu durum ortak substrat olan argininin, malign plevral efüzyon durumunda NOS tarafından kullanıldığını düşündürmektedir. Aksine pnömoni ve KKY gruplarındaki arginaz ortalama değerleri malign gruba göre daha yüksek iken, NOS ve NO değerleri de nispeten düşük bulunmuştur.

Serbest radikaller ve peroksitler çeşitli inflamatuvar ve malign hastalıkların patogeneğinde rol almaktadır. Plazma membranı, organlar ve hücre membranları gibi lipit içeren biyolojik sistemlerin birçoğunda oksidatif stresin sonucu olarak lipit hasarının değerlendirilmesinde malondialdehit (MDA) miktarının ölçümünden yararlanılmaktadır (111).

Plevra hastalıklarında da serbest radikallerin önemini ortaya çıkarmak için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Hammouda ve arkadaşlarının plevra sıvısı MDA

düzenini ölçtükleri bir çalışmada, eksüdatif sıvılarda transüdatif sıvılara göre belirgin derecede yükselmiş MDA düzeyinin olduğunu rapor etmişlerdir. Plevral sıvıdaki MDA için iki kaynak düşünmüşlerdir. Birincisi inflame plevra bölgesindeki kapillerlerden sızan plazma ve plazma proteinleri. İkinci kaynak ise inflamatuvar hücrelerde lipid peroksidasyonunun lokal olarak artmış olmasıdır. (78). Kostikas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da eksüdatif plevral efüzyonda oksidatif stres yüksek bulunmuştur (112).

Oksidatif stresin kanser, inflamasyon, radyasyon hasarı, yaşlanma ve kimyasal toksisite gibi olayların gelişmesinde rol aldığı artık bilinmektedir. Karsinogenezde önemli rol oynadığı gösterilen oksidanlar yalnızca tümör başlatıcılarına hizmet etmekle kalmaz, aynı zamanda tümörü ilerletir ve gen ekspresyonunu da artırır. Bu hem akciğer kanserinde hem de diğer malignitelerde gösterilmiştir (113). Alataş ve arkadaşları bronş kanserli ve malign plevral mezotelyomalı hastalarda plazma lipid peroksit düzeylerini kontrol olgularına göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (114).

Biz de çalışmamızda oksidan stres göstergesi olarak üç grup hastanın plevra sıvısı MDA düzeylerini karşılaştırdık. Üç grup arasında anlamlı fark olduğunu gördük ($p<0,001$). Pnömoni grubu diğer iki gruba göre anlamlı derecede yüksek MDA değerleri vermiştir. Pnömoni grubundaki bu yükseklik diğer çalışmaları destekler niteliktedir. KKY gibi hastalıklarda gelişen transüda tarzı plevral efüzyon ise herhangi bir plevral patolojiye bağlı gelişmediği, bir inflamasyon veya infiltrasyon oluşturmadığı için bu grupta MDA düşük bulunmuş olabilir. Çünkü KKY'deki efüzyon sadece onkotik ve hidrostatik basınç farkındaki dengesizlik sonucu gelişmektedir. Malign grupta MDA değerleri ortalaması KKY grubuna göre hafif yüksek çıkmış fakat anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Hastalardaki malignitelerin alt tipleri, evresi veya tedavi süreçleri bu sonuçları etkilemiş olabilir.

Çalışmamızda hastalardaki plevral sıvıların light kriterleri ile transüda-eksüda ayırımı yapabilmek için serum ve plevralarındaki ADA, total protein, albümin, LDH ve glukoz değerleri karşılaştırılmıştı. Biz de bu değerlerin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterip göstermediklerini araştırdık.

Light ölçütlerine göre sıvı proteini/serum proteini $>0,5$ ya da LDH değeri >200 IU ya da sıvının LDH'sı/serum LDH'sı $>0,6$ olması (bunlardan birisinin pozitif olması) durumunda sıvı eksüda olarak sınıflandırılır (115). Bizdeki pnömoni grubu ve malign gruptaki hastaların ortanca değerlerine baktığımızda eksüda tarzı özelliklere sahip olduğunu, KKY grubunun ise transüda karakterini yansıttığını görüyoruz.

Her ne kadar plevra sıvısı LDH düzeyi transüda-eksüda ayırımında kullanılsa da eksüda karakterindeki sıvıların ayırıcı tanısında pek yardımcı değildir. Bu çalışmada da gruplar arası plevral sıvı LDH düzeyleri anlamlı farklı çıksa da pnömoni ve malign grupta ortanca değerler birbirine yakın bulunmuştur. Eksüda tarzı plevral sıvılarda artan LDH konsantrasyonlarının serumdan filtrasyona bağlı değil hücrel kaynaklı olduğu düşünülmektedir (116). Bunu kanıtlar nitelikte bizim çalışmamızda da gruplar arası serum LDH konsantrasyonları arasında anlamlı fark yokken, plevral sıvılardaki LDH düzeyleri arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Pnömoni ve malign grubun plevra sıvısı LDH düzey ortancaları KKY grubuna göre oldukça yüksek çıkmıştır.

Artan vasküler permeabiliteye bağlı serum proteinleri plevral aralığa sızmakta ve plevra sıvısı protein konsantrasyonu eksüdatif sıvılarda yüksek bulunmaktadır. Bizim gruplarımızda da plevral sıvı protein konsantrasyon değerlerine bakıldığında gruplar arası anlamlı fark olduğunu ve pnömoni ve malign grubun KKY grubuna göre yüksek değerlere sahip olduğunu görmekteyiz.

Normalde plevra sıvısının glukoz konsantrasyonu serum değerlerini yansıtır (117). Bakteriyel enfeksiyonlar, tüberküloz ve maligniteye bağlı gelişen plevral sıvılarda glukoz düzeyi hücrel ve bakteriyel metabolizmanın tüketimine bağlı olarak serumdan daha düşük bulunur. Bizim çalışmamızda da gruplardaki plevral sıvı glukoz düzeyi ortancaları serum glukoz değerlerinden düşük çıkmıştır.

Adenozin deaminaz (ADA) adenozinin inozine dönüşümünü katalizler ve aktif lenfositlerden salınır. Plevra sıvısının ADA düzeyi > 70 U/l ya da plevra sıvısı ADA/serum ADA >2 ise tüberküloz en olası tanıdır. Lenfomalar, ampiyem ve romatoid artrit ile daha nadiren lenfoma dışı maligniteler ve intrasellüler enfeksiyonlarda da ADA düzeyi hafifçe artma eğilimindedir (118). Bizim hasta

gruplarımızda tüberküloz olmadığından serum ve plevra ADA düzeyi ortalamaları hep 50'nin altında çıkmıştır.

Tüm bu sonuçların ışığında arginin-NO metabolizmasının, çeşitli akciğer hastalıklarında gelişebilen plevral efüzyonun etyopatogenezinde rolü olabileceği gruplar arasında gösterilen anlamlı farklılıklar ile desteklenmiştir. Daha önceden birçok hastalığın patofizyolojisinin açıklanması konusunda önemi bilinen MDA'nın, plevral efüzyonda da hastalık grupları arasında fark gösterdiği tespit edilmiştir.

6. SONUÇLAR

1. Karşılaştırdığımız üç grup arasında plevral sıvı arginaz enzim aktivitesi açısından anlamlı fark çıkmıştır. KKY grubunun arginaz ortanca değerinin diğer iki gruba göre anlamlı derecede düşük olduğu, pnömoni ve malign grupların ise birbirinden farklı olmadıkları görülmüştür.
2. NO düzeyleri ve NOS enzim aktivitesi açısından karşılaştırma yapıldığında sonuçların benzer olduğu; malign grubun ortanca değerlerinin pnömoni ve KKY gruplarından anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. NOS, argininden NO üretimini sağlayan enzim olduğuna göre, yüksek NOS aktivitesinin yüksek NO düzeyinin nedeni olabileceği düşünülmüştür.
3. Malondialdehit düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında üç grup arasında anlamlı fark olduğu, pnömoni grubunun diğer gruplardan anlamlı düzeyde yüksek sonuçlar verdiği görülmüştür. Bunun pnömonideki ağır inflamatuvar sürece bir yanıt olarak gelişmiş olabileceği düşünülmüştür.
4. Hastalardan alınmış olan serum ve plevral sıvılarda gruplar arası ADA, total protein, albümin, LDH ve glukoz değerleri karşılaştırılmıştır. Plevral sıvılarda ölçülen ADA enzim aktivitesi düzeyleri üç grup arasında anlamlı bir fark sergilemezken, protein, albümin, LDH ve glukoz düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermiştir.
5. Hastaların serumlarında ölçülen parametreler istatistiki olarak değerlendirildiğinde, serum ADA ve protein düzeyleri üç grup arasında anlamlı fark göstermiş fakat, albümin, LDH ve glukoz düzeyleri gruplar arasında anlamlı bir fark göstermemiştir.
6. Plevral efüzyon birçok farklı hastalığa yandaş olarak çok sık gelişen ve yaşam kalitesini olumsuz etkileyen önemli bir patolojidir. Hastalığın etyopatogenezinin anlaşılması için yapılacak çalışmalar önem arz etmektedir. Plevral hastalıklarda arjinin- NO metabolizması ile ilgili literatürde bazı çalışmalar olsa da bu

Çalışmadaki tüm hasta gruplarını ve incelenen parametreleri içeren başka bir çalışma bulunmamaktadır. Bu alışma sonucunda elde edilen bilgiler hastalığın patogenezinin anlaşılmasında fayda sağlayacak ve yeni çalışmalara yol gösterici olacaktır.

ÖZET

Malign ve Parapnömonik Plevral Efüzyonlarda Nitrik Oksit Metabolizması ve Oksidan Stres Göstergesi Olarak Malondialdehit Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Amaç: Bu çalışmada, malignite, pnömoni veya konjestif kalp yetmezliği (KKY) tanısı almış hastaların plevral sıvılarında arginaz ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzim aktiviteleri ile nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçülmüştür. Çalışmanın amacı bu değişkenler ile plevra sıvılarının oluşum mekanizmaları arasındaki olası ilişkiyi araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Pnömoni (n=28), malignite (n=28) ve KKY (n=24) tanısı alan hastalar ile çalışma grupları oluşturulmuştur. MDA ve NO düzeyleri ile NOS ve arginaz aktivite ölçümleri spektrofotometrik yöntemlerle yapılmıştır. Sonuçlar ort ± SEM olarak verilmiştir. Verilerin analizi SPSS Windows 15 paket programında yapılmıştır. P<0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Arginaz değerleri KKY grubunda anlamlı derecede düşük, NO ve NOS değerleri ise malign grupta anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. MDA ise pnömoni grubunda diğer gruplara göre anlamlı yüksek çıkmıştır.

Sonuçlar: Arginin-NO metabolizması ve MDA oluşumunun plevral efüzyonların patogeneğinde rolü olabileceği gruplar arasında gösterilen anlamlı farklılıklar ile desteklenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Arginaz, MDA, NO, NOS, plevral efüzyon.

SUMMARY

Evaluation of Nitric Oxide Metabolism and Malondialdehyde Levels As An Indicator of Oxidant Stress in Malign and Parapneumonic Pleural Effusion

Aim: In this study, pleural fluid arginase and nitric oxide synthase activities as well as nitric oxide and malondialdehyde levels of patients with malignancy, pneumonia and congestive heart failure (CHF) were determined. The aim of the study was to investigate the possible relationship between these parameters and the mechanism of pleural fluid accumulation.

Materials and methods: Study groups consisted of patients with pneumonia (n=28), malignancy (n=28) and CHF (n=24). NO and MDA level with arginase and NOS activity were determined spectrophotometrically. Results were expressed as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using SPSS pocket programme. Values of p lower than 0,05 were considered statistically significant.

Results: Pleural fluid arginase activity in CHF patients was found to be significantly lower than in the malignancy and pneumonia groups. The pleural NO level and NOS activity were higher in the malignancy group than in the other groups. In the pneumonia group MDA level was significantly increased compared to other groups.

Conclusions: In the light of the results presented here, it may be concluded that the arginase- NO metabolism and MDA formation seem to be involved in the pathogenesis of pleural effusions.

Key Words: Arginase, MDA, NO, NOS, pleural effusion.

KAYNAKLAR

1. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2007;34 (9):906-11.
2. Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2003;6 (2):223-8.
3. Hart CM. Nitric oxide in adult lung disease. *Chest*. 1999;115 (5):1407-17.
4. Kayaalp S. *Tıbbi Farmakoloji*.2005: 1276-78.
5. Wang S, Paton JF, Kasparov S. The challenge of real-time measurements of nitric oxide release in the brain. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*. 2006;126-127:59-67.
6. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Pres; 1999: 73-122.
7. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1990;4 (9):2587-97.
8. Metintaş M. Plevra hastalıkları. Özlü T, Ardiç S (editörler). *Akciğer Hastalıkları Temel Bilgiler*. Ankara: Türk Toraks Derneği Okulu Kitabı 2008: 127-83.
9. Kinnula VL, Everitt JI, Mangum JB, Chang LY, Crapo JD. Antioxidant defense mechanisms in cultured pleural mesothelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1992;7 (1):95-103.
10. Wood LG, Garg ML, Simpson JL, Mori TA, Croft KD, Wark PA, et al. Induced sputum 8-isoprostane concentrations in inflammatory airway diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171 (5):426-30.
11. Kroegel C, Antony VB. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *The European respiratory journal*. 1997;10 (10):2411-8.

12. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1995;9 (13):1319-30.
13. Appleton J. Arginine: Clinical potential of a semi-essential amino acid. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*. 2002;7 (6):512-22.
14. Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;275 (3):715-9.
15. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in neurobiology*. 2001;64 (4):365-91.
16. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical journal*. 1998;336 (Pt 1):1-17.
17. Leu SY, Wang SR. Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer*. 1992;70 (4):733-6.
18. Ikemoto M, Ishida A, Tsunekawa S, Ozawa K, Kasai Y, Totani M, et al. Enzyme immunoassay of liver-type arginase and its potential clinical application. *Clinical chemistry*. 1993;39 (5):794-9.
19. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of immunological methods*. 1994;174 (1-2):231-5.
20. Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology*. 1996;114 (1):107-32.
21. Ash DE, Scolnick LR, Kanyo ZF, Vockley JG, Cederbaum SD, Christianson DW. Molecular basis of hyperargininemia: structure-function consequences of mutations in human liver arginase. *Molecular genetics and metabolism*. 1998;64 (4):243-9.

22. Spector EB, Rice SC, Moedjono S, Bernard B, Cederbaum SD. Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochemical medicine*. 1982;28 (2):165-75.
23. İlhan N, Gülen Ş. Tiroid arginaz enzim aktivitesinin farklı metal iyonları varlığında ısıya karşı stabilitesi. *Biyokimya dergisi*. 1993;18.
24. Mora A, del Ara Rangel M, Fuentes JM, Soler G, Centeno F. Implications of the S-shaped domain in the quaternary structure of human arginase. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1476 (2):181-90.
25. Nikumb SK, Santhanam K, Rao MV. Hepatic and serum arginase and ornithine transcarbamylase activities of rats maintained on diets of different protein quality. *Annals of nutrition & metabolism*. 1987;31 (6):387-94.
26. Kuhn NJ, Talbot J, Ward S. pH-sensitive control of arginase by Mn (II) ions at submicromolar concentrations. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1991;286 (1):217-21.
27. Ozan S, Gülen Ş. Sığır tükürüğünde arginaz enzimi ve özelliklerinin tükürük bezleri, eritrosit ve karaciğer arginazları ile karşılaştırılması. *Doğa Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi* 1989;13:154-63.
28. Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, Kern RM, Yoo P, Iyer RK. Arginases I and II: do their functions overlap? *Molecular genetics and metabolism*. 2004;81 Suppl 1:S38-44.
29. Iyer R, Jenkinson CP, Vockley JG, Kern RM, Grody WW, Cederbaum S. The human arginases and arginase deficiency. *Journal of inherited metabolic disease*. 1998;21 Suppl 1:86-100.
30. Tong BC, Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2004;4 (8):823-32.
31. Grillo MA, Colombatto S. Arginine revisited: minireview article. *Amino acids*. 2004;26 (4):345-51.

32. Straus B, Cepelak I, Festa G. Arginase, a new marker of mammary carcinoma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1992;210 (1-2):5-12.
33. Wu CW, Chi CW, Lin EC, Lui WY, P'Eng F K, Wang SR. Serum arginase level in patients with gastric cancer. *Journal of clinical gastroenterology*. 1994;18 (1):84-5.
34. Konarska L, Kolasa T, Albrecht P, Regula A. Can arginase be a marker of the large bowel neoplasia? *Acta biochimica Polonica*. 1993;40 (1):164-6.
35. Fidancı Ş. Nitrik Oksit Ölçüm Yöntemleri. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2011;4 (3):1-8.
36. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288 (5789):373-6.
37. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochemical pharmacology*. 1989;38 (11):1709-15.
38. Morris SM, Jr., Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *The American journal of physiology*. 1994;266 (6 Pt 1):E829-39.
39. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*. 1997;15:323-50.
40. Lincoln J, Burnstock G. *Nitric oxide in health and disease*: Cambridge University Press; 1997.
41. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*. 2001;357 (Pt 3):593-615.
42. Bivalacqua TJ, Champion HC, Hellstrom WJ. Implications of nitric oxide synthase isoforms in the pathophysiology of Peyronie's disease. *International journal of impotence research*. 2002;14 (5):345-52.

43. Erkan E, Müslümanoğlu A. Nitrik oksit sentaz ve genetik polimorfizmleri. *Erkek cinsel sağlığı*. 2004;19:277-81.
44. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik oksit: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Ankara: Palme yayıncılık; 2003.
45. Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS letters*. 1994;356 (2-3):295-8.
46. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333 (6174):664-6.
47. Saini HK, Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS. Pharmacological basis of different targets for the treatment of atherosclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9 (4):818-39.
48. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of internal medicine*. 1994;120 (3):227-37.
49. Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89 (20):9382-5.
50. Croen KD. Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *The Journal of clinical investigation*. 1993;91 (6):2446-52.
51. Garcia X, Stein F. Nitric oxide. *Seminars in pediatric infectious diseases*. 2006;17 (2):55-7.
52. Liew FY, Li Y, Millott S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*. 1990;71 (4):556-9.
53. Özkan M, Yüksekol İ. *Türk Toraks Dergisi Nitrik oksit ve akciğerler*. 2003;4 (1):88-94.
54. Jang AS, Choi IS, Lee S, Seo JP, Yang SW, Park KO, et al. Nitric oxide metabolites in induced sputum: a marker of airway inflammation in asthmatic

- subjects. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1999;29 (8):1136-42.
55. Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, Kaneko F, Hutte R, Stuehr DJ, et al. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101 (3):660-6.
 56. al-Ali MK, Howarth PH. Nitric oxide and the respiratory system in health and disease. *Respiratory medicine*. 1998;92 (5):701-15.
 57. Kanazawa H, Shoji S, Yamada M, Fujii T, Kawaguchi T, Kudoh S, et al. Increased levels of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1997;99 (5):624-9.
 58. Yucel D, Aydogdu S, Cehreli S, Saydam G, Canatan H, Senes M, et al. Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clinical chemistry*. 1998;44 (1):148-54.
 59. Ellis JL, Udem BJ. Inhibition by L-NG-nitro-L-arginine of nonadrenergic-noncholinergic-mediated relaxations of human isolated central and peripheral airway. *The American review of respiratory disease*. 1992;146 (6):1543-7.
 60. Tutluoğlu B, Gümüştaş B, Müsellim G. Bronşiyal astımda nazal lavajda nitrik oksit metabolitleri.. *Turk Arch Otolaryngol*. 2000;38 (1): 42–50.
 61. Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155 (5):1763-9.
 62. Fujimoto H, Ando Y, Yamashita T, Terazaki H, Tanaka Y, Sasaki J, et al. Nitric oxide synthase activity in human lung cancer. *Japanese journal of cancer research: Gann*. 1997;88 (12):1190-8.
 63. Maeda H, Noguchi Y, Sato K, Akaike T. Enhanced vascular permeability in solid tumor is mediated by nitric oxide and inhibited by both new nitric oxide scavenger and nitric oxide synthase inhibitor. *Japanese journal of cancer research: Gann*. 1994;85 (4):331-4.

64. Fujimoto H, Sasaki J, Matsumoto M, Suga M, Ando Y, Iggo R, et al. Significant correlation of nitric oxide synthase activity and p53 gene mutation in stage I lung adenocarcinoma. *Japanese journal of cancer research: Gann.* 1998;89 (7):696-702.
65. Uysal M. *Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.* İstanbul: Nobel tıp kitabevi; 2010: 647-52.
66. Rodvel VW. Harper'ın Biyokimyası Proteinlerin ve aminoasitlerin metabolizması. İstanbul.: Nobel Tıp Kitapevleri.; 2004: 307-59.
67. Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society transactions.* 2002;30 (2):280-5.
68. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md: 1985).* 1995;79 (3):675-86.
69. Ozbay B, Dulger H. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *The Tohoku journal of experimental medicine.* 2002;197 (2):119-24.
70. Cheeseman KH. Lipit peroxidation in biological systems. In: *DNA and free radicals*, edited by B. Halliwell, O. I. Avrana, Ellis Harward,. London1993: 260-73.
71. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin.* 1993;49 (3):481-93.
72. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD.* 2005;15 (4):316-28.
73. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *European journal of pharmacology.* 2001;429 (1-3):195-207.
74. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 1996;154 (4 Pt 1):1055-60.

75. Alataş F. Toraks Kitapları. İstanbul: Turgut Yayıncılık; 2003.
76. Sahin U, Tahan V, Akkaya A. Primer akciğer kanserlerinde lipid peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan enzim aktivitesi. *Tüberküloz ve Toraks*. 1999;47:31-5.
77. Gencer M. Oksidatif stres benign ve malign hastalıkların ayırıcı tanısında etkin olabilir mi? *Akciğer arşivi*. 2005;6:89-92.
78. Hammouda Ae-R, Khalil MM, Salem A. Lipid peroxidation products in pleural fluid for separation of transudates and exudates. *Clinical chemistry*. 1995;41 (9):1314-5.
79. Light RW. *Pleural Disease*: Baltimore, Williams and Wilkins; 1995: 1-35.
80. Sahn SA. State of the art. The pleura. *The American review of respiratory disease*. 1988;138 (1):184-234.
81. Light RW. Diagnostic principles in pleural disease. *The European respiratory journal*. 1997;10 (2):476-81.
82. Miserocchi G. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *The European respiratory journal*. 1997;10 (1):219-25.
83. Yüksel M. Plevral Sıvılara Cerrahi Yaklaşım. *Türk Toraks Dergisi*. 2002:13-9.
84. Dev D, Basran GS. Pleural effusion: a clinical review. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace / Fondazione clinica del lavoro, IRCCS [and] Istituto di clinica fisiologica e malattie apparato respiratorio, Università di Napoli, Secondo ateneo*. 1994;49 (1):25-35.
85. Metintaş S. Plevral sıvıların epidemiyolojisi. *Plevra hastalıkları. Toraks Kitapları- Toraks Derneği Yayınları*. Ankara2003: 16-23.
86. Gazquez I, Porcel JM, Vives M, Vicente de Vera MC, Rubio M, Rivas MC. Comparative analysis of Light's criteria and other biochemical parameters for distinguishing transudates from exudates. *Respiratory medicine*. 1998;92 (5):762-5.
87. Light RW. *Pleural Disease*. Baltimore, Williams and Wilkins1995: 1-35.

88. Metintaş M, Alataş Ö, Alataş F. Comparative analysis of biochemical parameters for differentiation of pleural exudates from transudates Light's criteria, cholesterol, bilirubin, albumin gradient, alkaline phosphatase, creatine kinase and uric acid. *Clinica Chimica Acta* 1997;264:149-62.
89. Light RW. *Pleural Disease* 5th edition Lippincott Williams and Wilkins. New York 2007.
90. Assi Z, Caruso JL, Herndon J, Patz EF, Jr. Cytologically proved malignant pleural effusions: distribution of transudates and exudates. *Chest*. 1998;113 (5):1302-4.
91. Metintaş M, Özlü T, Ardıç S. Akciğer Hastalıkları Temel Bilgiler Plevra hastalıkları Türk Toraks Derneği Okulu Kitabı. Ankara 2008: 127-83.
92. Gözü O. Plevra Hastalıkları Toraks Yayınları. 2003: 76-137.
93. Metintaş S, Gözü O, Köktürk O. Plevra hastalıkları. Plevral sıvıların epidemiyolojisi Toraks Kitapları- Toraks Derneği Yayınları. Ankara 2003: 16-23.
94. Heffner JE. Infection of the pleural space. *Clinics in chest medicine*. 1999;20 (3):607-22.
95. Hott JW, Sparks JA, Godbey SW, Antony VB. Mesothelial cell response to pleural injury: thrombin-induced proliferation and chemotaxis of rat pleural mesothelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1992;6 (4):421-5.
96. Halla JT, Schrohenloher RE, Volanakis JE. Immune complexes and other laboratory features of pleural effusions: a comparison of rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and other diseases. *Annals of internal medicine*. 1980;92 (6):748-52.
97. Dahle LK, Hill EG, Holman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1962;98:253-61.

98. Eken A. Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri journal of Clinical and Analytical Medicine 2014:69-73.
99. Durak İ, Burak Ç, Kacmaz M, Goren D, Öztürk HS. Aspirin induces erythrocyte nitric oxide synthase activity in vivo. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2001; 314:265-7.
100. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1987;84 (24):9265-9.
101. Chinard FP. Photometric estimation of proline and ornithine. The Journal of biological chemistry. 1952;199 (1):91-5.
102. Owens MW, Grisham MB. Nitric oxide synthesis by rat pleural mesothelial cells: induction by cytokines and lipopolysaccharide. The American journal of physiology. 1993;265 (2 Pt 1):L110-6.
103. Cuzzocrea S, Mazzon E, Calabro G, Dugo L, De Sarro A, van De LF, et al. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. American journal of respiratory and critical care medicine. 2000;162 (5):1859-66.
104. Ialenti A, Iannaro A, Maffia P, Sautebin L, Di Rosa M. Nitric oxide inhibits leucocyte migration in carrageenin-induced rat pleurisy. Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society [et al]. 2000;49 (8):411-7.
105. Regnault C, Roch-Arveiller M, Florentin I, Giroud JP, Postaire E, Delaforge M. Kinetic evaluation of nitric oxide production in pleural exudate after induction of two inflammatory reactions in the rat. Inflammation. 1996;20 (6):613-22.
106. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society. 2002;7 (1):1-10.
107. Nevin BJ, Broadley KJ. Nitric oxide in respiratory diseases. Pharmacology & therapeutics. 2002;95 (3):259-93.

108. Elgun S, Kacmaz B, Durak I. A potential role for nitric oxide pathway in tuberculous pleural effusion. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2005;9 (3):339-43.
109. Schneider E, Dy M. The role of arginase in the immune response. *Immunology today*. 1985;6 (4):136-40.
110. Chang CI, Liao JC, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *The American journal of physiology*. 1998;274 (1 Pt 2):H342-8.
111. Noyan T, Onem O, Ramazan Sekeroglu M, Koseoglu B, Dulger H, Bayram I, et al. Effects of erythropoietin and pentoxifylline on the oxidant and antioxidant systems in the experimental short bowel syndrome. *Cell biochemistry and function*. 2003;21 (1):49-54.
112. Papageorgiou E, Kostikas K, Kiropoulos T, Karetsi E, Mpatavanis G, Gourgoulialis KI. Increased oxidative stress in exudative pleural effusions: a new marker for the differentiation between exudates and transudates? *Chest*. 2005;128 (5):3291-7.
113. Upham BL, Wagner JG. Toxicant-induced oxidative stress in cancer. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2001;64 (1):1-3.
114. Alataş Ö, Metintaş M, Çolak Ö, Alataş F, İnal M. Bronş kanseri ve malign plevral mezotelyomada plazma lipid peroksit düzeyleri. *Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği (TÜSAD), XXIII Ulusal Kongresi*. 1995.
115. Light RW, Macgregor MI, Luchsinger PC, Ball WC, Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Annals of internal medicine*. 1972;77 (4):507-13.
116. Joseph J, Badrinath P, Basran GS, Sahn SA. Is the pleural fluid transudate or exudate? A revisit of the diagnostic criteria. *Thorax*. 2001;56 (11):867-70.
117. Agostoni E, Zocchi L. Mechanical coupling and liquid exchanges in the pleural space. *Clinics in chest medicine*. 1998;19 (2):241-60.

118. Burgess LJ, Maritz FJ, Le Roux I, Taljaard JJ. Combined use of pleural adenosine deaminase with lymphocyte/neutrophil ratio. Increased specificity for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Chest*. 1996;109 (2):414-9.

EKLER

EK-1: Etik Kurul Kararı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KURULU DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu
AÇIK ADRES	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/Ankara
TELEFON	0312 310 30 10/227
FAKS	0312 310 63 70
E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Malign ve paraneoplastik plevral efüzyonlarda nitrik oksit metabolizmasının ve oksidan stres göstergesi olarak malondialdehit düzeyinin değerlendirilmesi		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	EUDRACT NUMARASI			
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Serenay Elgün Ütkar		
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya		
	KOORDİNATÖRÜN UNVANI/ADI/SOYADI			
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı		
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ			
	BAŞVURULAN DEĞERLENDİRME KOMİSYONUNUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu		
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ			
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input checked="" type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>	

ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>
	FAZ 2	<input type="checkbox"/>
	FAZ 3	<input type="checkbox"/>
	FAZ 4	<input type="checkbox"/>
	BE/BY	<input type="checkbox"/>
	DiĞER	<input type="checkbox"/>
	Diğer ise belirtiniz:	

ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	ILAÇ DIŞI ARAŞTIRMA <input type="checkbox"/>	Belirtilmez: <input type="checkbox"/>
	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>
	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
				Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŐURÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	01	10.02.2011	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DiĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
SİĞORTA	<input type="checkbox"/>	
HASTA KARTI/GÖNÜLLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>	
İLAN	<input type="checkbox"/>	
YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
DiĞER	<input type="checkbox"/>	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:25-487	Tarih: 28 Şubat 2011
	Prof.Dr.Serenay Elgün Ülkar'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler; araştırmanın gerekeçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

DEĞERLENDİRME KURULU BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu ve SOP
DEĞERLENDİRME KURULU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Mehmet MELLİ	
DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Kabılım **	İmza
Prof.Dr.Mehmet Mellî	Tıbbi Farmakoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>M. Mellî</i>
Prof.Dr.Cihan Yurdaydın	Gastroenteroloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>C. Yurdaydın</i>
Prof.Dr.Ahmet Demirkazık	Tıbbi Onkoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>A. Demirkazık</i>
Prof.Dr.Ajlan Tükün	Tıbbi Genetik	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>A. Tükün</i>
Prof.Dr.Tanju Özçelikay	Eczacı-Farmakolog	Ankara Üniv. Ecz. Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>T. Özçelikay</i>
Prof.Dr.Nuhan Puralı	Biyofizik	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>N. Puralı</i>
Prof.Dr.Cem Abaçoğlu	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>C. Abaçoğlu</i>
Prof.Dr.Hakan Uncu	Genel Cerrahi	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>H. Uncu</i>
Prof.Dr.H.Serdar Öztürk	Tıbbi Biyokimya	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>H. Serdar Öztürk</i>
Prof.Dr.H.Serap Sivri	Çocuk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Prof.Dr.Muharrem Özen	Avukat-Öğr.Üyesi	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	DERSTE
Prof.Dr.Banu Çakır	Halk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	YURTDIŞINDA
Öğr.Gör.Dr.Volkan Kavas	Deontoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>V. Kavas</i>
Gülsüm Aslan	Sağlık Mes. Dışı- Emekli	-----	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>G. Aslan</i>

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Değerlendirme Formu
28 Nisan 2009 Versiyon No:1



EK-2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Versiyon No: 01

Versiyon Tarihi: 10.02.2011

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Çalışmanın Adı: Malign ve Parapnömonik Plevral Efüzyonlarda Nitrik Oksit

Metabolizmasının Ve Oksidan Stres Göstergesi Olarak

Malondialdehit Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Çalışmanın Kolay Anlaşılabilir Dilde Adı: Kansere, Kalp Yetmezliğine Ve Zatürreye Bağlı Akciğer

Zarları Arasında Biriken Sıvının Nitrik Oksit Metabolizmasının Ve Malondialdehit

Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Sorumlu Araştırmacı: Dr. Pınar KOYUNCU

Prof.Dr. Serenay ELGÜN ÜLKAR (Tez Danışmanı)

Sayın

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında ' Kansere, Kalp Yetmezliğine Ve Zatürreye Bağlı Akciğer Zarları Arasında Biriken Sıvının Nitrik Oksit Metabolizması Ve Malondialdehit Düzeylerinin Değerlendirilmesi 'adlı araştırma yapılmaktadır.

Bu çalışmada sizlerden, hastalığınızın tanısı veya tedaviniz amacıyla alınmış olan sıvılardan az bir kısmı ayrılarak; hastalığın altta yatan nedenini belirlemesi ve gelecekte geliştirilecek olacak yeni tedavi yöntemlerine ışık tutması bakımından yapılacak olan bilimsel çalışmamızda kullanılacaktır.

Çalışmaya katılımınız zorunlu değildir ve katıldığınız veya katılmadığınız takdirde tedavi şekliniz değişmeyecektir. Araştırma ile siz veya sosyal güvenliğinizi sağlayan kurum herhangi bir yük altına girmeyeceksiniz. Eğer konu hakkında bu formda verileden daha farklı bilmek istediğiniz noktalar varsa bunları lütfen size formu imzalatan kişiye sorunuz. Bize ulaşabileceğiniz telefon numarası: 0555 716 2526

ONAM FORMU

Ben.....

Yukarıda okuduğum çalışma ile ilgili bilgiler bana sözlü olarak da iletildi. Çalışma ile ilgili tüm sorularıma tatmin edici cevaplar aldım. Çalışmaya kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Hasta adı soyadı: tarih imza

Doktor adı soyadı: tarih imza

Tanıklık eden kurum yetkilisi adı soyadı: tarih imza