

283815

Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyokimya Bölümü

**ASIATIKOZİD'İN BİYOKİMYASAL ETKİ MEKANİZMASI ÜZERİNDE
BİR ARAŞTIRMA**

Ecz. Aysen Karan

Doktora tezi

1971

Hacettepe Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Biyokimya Bölümü

ASİATİKOZİD'İN BİYOKİMYASAL ETKİ
MEKANİZMASI ÜZERİNDE
BİR ARAŞTIRMA

Ecz. Aysen Karan

Doktora Tezi

1971

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
MATERYAL ve METOD	3
SONUÇLAR	13
TARTIŞMA	26
ÖZET	43
REFERANSLAR	44

GİRİŞ

Asiatik asidin bir glikozidi olan asiaticozid
(O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)
-O- β -D-glucopyranose-1-asiaticat), asit fast organizmalara
karşı bakterisidik etki ettiği ve yaraları sikatrizasyona
yol açarak iyileştirdiği gerekçesi ile kullanılmaktadır.⁽¹⁾
Asiaticozid'in belirtilen bu etkileri genellikle farmakolojik
olarak incelenmiştir. Steroid hormonlarla yapı benzerliği
gösterdiğinden steroid etkide olup olmadığı araştırılmış,⁽²⁾
tatminkâr sonuçlar alınamamıştır. Asiaticozid'in yara ve
yanıklarda biostimulan bir etkide bulunduğu farmakolojik
gözlemlere dayanarak ileri sürülmüştür. Araştırmacılar
bazıları asiaticozid uygulamasını müteakip ciltte sülfüdril
gruplarının azaldığını ve lösinaminopeptidaz aktivitesinin
arttığını bildirirlerken⁽³⁾ diğer bir grup araştırmacı da
ciltte ve deri kültüründe aktivatör etkide olduğunu ileri
sürmüşlerdir.⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾

Genel olarak, asiaticozid'in yara iyileştirici etkisi
retikuloendotelial (RES) sistemin proliferasyonuna
hızlandırıcı katkıda bulunması ile açıklanmağa çalışılmış-
tır.⁽⁷⁾ Ancak bu alanda yapılmış biyokimyasal bir çalışma
yoktur.

Bütün bu bilgiler göz önüne alınarak asiatikozid'in biyokimyasal etki mekanizmasının incelendiği bu çalışmada RES sistemi elemanı olan lökositler kullanılmıştır.

Lökositlerin fagositoz görevi ile ilgili en önemli biyokimyasal özellikleri, çeşitli etkenler altında heksoz mono fosfat (HMP) şantının aktivasyonudur. Bu sebepten, G-I-¹⁴C den veya G-U-¹⁴C den ¹⁴CO₂ teşekkülünün stimülasyonu; lökosit biyokimyasının en fazla incelenen yönünü teşkil etmiştir. (8)(9) Asiatikozid'in ¹⁴CO₂ teşekkülünü hızlandırdığı bu çalışmada gösterilmiştir. Bu etkiye, asiatikozid'in kimyasal yapısı bakımından saponine benzemesi sebebi ile ortaya çıkan bir bulgu gözü ile bakmanın mümkün olabileceği kanısına varılmıştır. Saponinin yüzey aktive edici etkisi sebebi ile lökositte ¹⁴CO₂ teşekkülünü stimüle ettiği isbat edilmiş bir bulgudur. (10)(11) Bu çalışma da asiatikozid'in saponine benzer bir yapıya sahip olduğu için⁽¹⁾ etkili olduğu kanısını destekler.

MATERYAL ve METOD

Çalışmalarda ionsuz su ve C.P. kalitesinde kimyasal maddeler kullanılmıştır. Lökosit ile temas eden bütün malzeme eğer cam ise silikonlanmış veya plâstik olarak seçilmiştir. Asiatikozid, Laroche Navarron firmasının Türkiye temsilcisi olan Bilim İlâç Sanayii ve Ticaret A.Ş. den sağlanmıştır.

İnsan Lökositlerinin Temin Edilişi:

Normal, sıhhatli ve periferik yaymaları normal dağılımda olan kan bankası donörlerinden sağlanan 60 ml. kan, bir plâstik tüp içindeki (0.1 M EDTA, pH 7.7 , 500 ml. + %6 Dekstran (%0.9 Sodium Klorür içinde) 200 ml. + Glukoz 15 gr) karışımından alınan 21 ml. kan alma solüsyonu⁽¹²⁾ üzerine kondu. Ayrıca, homolog serum elde etmek için aynı donörden 15-20 ml. daha kan alınarak serumu ayrıldı.⁽¹³⁾ Bu şartlar altında lökositler uzun bir süre yaşarlılığını muhafaza ettiklerinden⁽¹⁴⁾ oda ısısında, 90 dak. bekletildikten sonra plâstik bir şırınga ile lökositçe zengin üst kısım çekildi ve plâstik bir tübe aktarıldı, 300 g'de 10 dak. santrifügasyon ile lökositler çöktürüldü, üst kısım atıldı. Bir miktar eritrosit taşıyan

lökosit çökeleğindeki bu eritrositler distille su ile 20 san. osmotik şoka tâbi tutularak parçalandı⁽¹⁵⁾ ve osmolarite derhal düzeltildi. Bu metod ile eritrosit kontaminasyonu en fazla %2-4'dür.⁽¹⁶⁾

Osmotik şok ile eritrositleri parçalanan ve osmolaritesi ayarlanan süspansiyon üzerine Modifie Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)⁽¹²⁾ dan 40-50 ml. ilâve edilerek lökositler yıkandı ve santrifügasyon ile toplandı. Toplanan lökosit çökeleği ml. de $10-20 \times 10^6$ lökosit taşıyacak şekilde modifie HBSS ile sulandırıldı; deneyde bu lökosit süspansiyonu kullanıldı. Glukoz eksikliğinde lökositlerin bazen kümeleşmesi gözleendiğinden bütün lökosit saflaştırma işlemleri süresince ortamda glukoz bulunmasına dikkat edildi.⁽¹⁷⁾ İnsan lökositleri, stimülasyona lüzum göstermeden, fizyolojik durumda da yeterli miktarda toplanabildiğinden deney hayvanlarından peritoneal stimulus sonucunda toplanan lökositlere göre daha fizyolojik anlamlı deneylerin yapılmasına inkân sağlar.⁽¹⁸⁾ Çalışmalar esnasında bakteri kullanılmadığından ve uzun süren inkübasyonlar uygulanmadığından depirogenizasyonlar yapılmamıştır.⁽¹⁴⁾

Inkübasyon Karışımının Hazırlanması ve Inkübasyonu:

Inkübasyon, silikonlanmış 25 ml. lik "Warburg" erlenlerinde yapıldı ve inkübasyon karışımı modifie HBSS içinde, ml. de $5-10 \times 10^6$ lökosit ihtiva eden, total 2 ml. lik bir karışım halinde hazırlandı. Ortama daima %10 oranında homolog serum ilâve edildi. Etken maddelerin ortama

ilâvesini müteakip, oda ısısında, 10 dak. lık bir pre-inkübasyon uygulandı. Etken olarak ortama katılan asiatikozid ancak dimetilformamid (DMFA) içinde çözünür olduğundan bütün kontrol ve etken madde deneyleri %0.15 DMFA içinde yapıldı. Gaz fazı hava idi. Orta kuyuya 0.45 ml. %20 NaOH çözeltisi kondu. İnkübasyon karışımının hazırlanmasında, ortamda nihâî 5×10^{-3} M konsantrasyonu sağlamak üzere total olarak 2 μ c glukoz-üniform- ^{14}C (G-U- ^{14}C) son olarak ilâve edildi. Eğer lökositler stimüle edilerek çalışılacak ise, bu durumda, nihâî olarak ml. de 1.25×10^9 partikül (1.25 mg/ml) verecek şekilde, 0.714 μ çapında "polystyrene latex" (lateks) partikülü ilâve edildi. Bu miktar lateks, optimum stimülasyon vermektedir.⁽¹⁹⁾ İnkübasyon, "Dubnoff" metabolik karıştırıcıda, 37° de, 40-60 çalkalama/dakika olarak ve 30 dak. süre ile uygulandı. Bu sürenin sonunda ortama 1 ml. 0.5 N H_2SO_4 ilâve edilerek CO_2 nun serbest hale geçişi sağlandı. Tekrar 30 dak. çalkalamaya devam ederek ortaya çıkan CO_2 'nun orta kuyudaki NaOH tarafından tutulmasına imkân verildi.⁽²⁰⁾

Radyoaktif Sayım Nümenesinin Hazırlanışı ve Sayımı:

İnkübasyonu müteakip sülfürik asit ilâvesi ile serbest hâle geçen CO_2 'nun orta kuyudaki NaOH tarafından tutulması sona erdikten sonra, orta kuyudan 0.15 ml. lik nümuneler alındı. Bu nümunelerin üzerine (4 gm. 2,5-difenilokzazol) (PPO) + 80 gm. Naftalen + 400 ml. absolu alkol + 600 ml. toluen) karışımından 10 ml. ilâve edilerek sayıma hazırlandı.

Sayım işlemi, AAA ile ekipe ve ^{14}C 'ü en maksimum randımanla sayabilecek tarzda ayarlanmış "Packard 3380 Model 544 Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Absolute Activity Analyzer" da, sayım hatası %1.5 Standart hata altında olmak üzere yapıldı.

Bu metod ile saptanan insan lökositleri HMP şanti glukoz kullanılış değerleri ve lateks stimülasyonu sonuçları literatürde bildirilen bulgulara uygundur. (10)(13)(14)(21)

Kontrol Deneyleri:

Lökosit süspansiyonunun hazırlanışında çeşitli metodlar teklif edilmiştir. Bu metodlar arasında, deney hayvanlarına kazeinat solüsyonu enjekte ederek husule getirilen steril periton absesinin lökosit kaynağı olarak kullanılışı da vardır. Bu yolla ve çeşitli teknikler uygulanarak polimorfonükleer (PMN) ve monosit (MC) lerin izolasyonu mümkündür. (22) Ancak bu lökositler, toplanış esnasında stimüle edilmişlerdir. Bu sebeple deneylerimizde stimülasyona lüzum göstermeden toplanabilen normal insan lökositleri kullanılmıştır.

Toplanan lökositlerin eritrosit ve kısmen eritrositlerle beraber çökebilen lenfositlerden ayrılması, ağırlık ve viskozite farkına dayanan metodlar aracılığı ile başarılır. Bu gaye ile dekstran veya fibrinojen kullanılabilir. Her iki yolla elde edilen hücrelerin metabolizmalarının birbirinden farklı olmadığı gösterilmiştir. (22) Deneylerimizde dekstran ve EDTA ihtiva eden bir solüsyon; normal insan lökositlerini elde etmek üzere kullanılmıştır. Lökositlerin yaşar vaziyette tutulması için gerekli ortam, modifie HBSS kullanılarak sağlanmıştır.

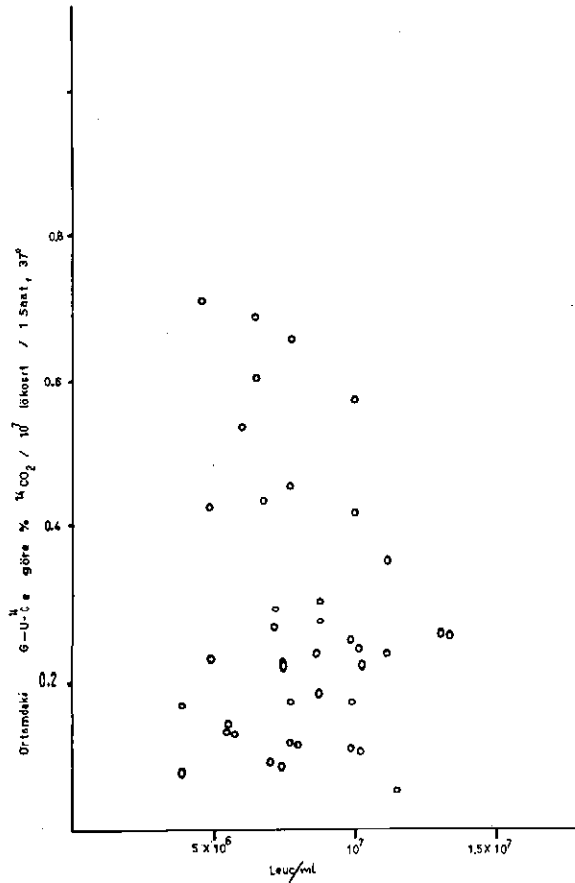
Lökosit süspansiyonunun hazırlanış tarzı, lökositlerin deney erlenlerine nisbeten homojen bir şekilde ilâvelerine imkân sağlamasına rağmen, yapılan müteaddit deneylerde, ortamdaki G-U- ^{14}C 'ün $^{14}\text{CO}_2$ 'ye dönüşme yüzdesi ile ortamın ml. sinde mevcut lökosit sayısı arasında bir bağıntı kurulamamıştır. (Şekil 1) (Şekil 2). Yapılan istatistik analiz, tek veya çok grubun bulunup bulunmadığı hakkında bir fikir vermemiş ve korrelasyon kat sayıları her iki grup için de değersiz olarak saptanmıştır ($r_{xy} < 0.5$). Bu bulgu, literatürde rastladığımız çalışmalarla da teyid edilmekte ve hem deney hayvanlarından, hem de insanlardan elde edilen lökositler ile yapılan çalışmalarda gözlenmektedir. (10)(13)(14)(21)

Bazal şartlarda çalışıldığında, glukozun HMP şantından geçen miktarı, şahıstan şahısa büyük bir varyasyon göstermektedir. Aynı şekilde, lökositlerin sentetik bir araç, lateks partikülü ile stimülasyonu dahi homojen bir sonuç vermemektedir; bu değerler insan lökositleri için en düşük 2.08 den en yüksek 38.5 katına kadardır. (10)(13)(14)(21) Herne kadar, partikülle stimüle edilmiş lökositler, stimüle edilmemişlere nisbetle daha üniform bir $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülü göstermekteyseler de, gene de $^{14}\text{CO}_2$ ye çevrilen glukoz yüzdesi ile ml. deki lökosit konsantrasyonu arasında bir korrelasyon bulunamamıştır. Buna mukabil aynı lökosit süspansiyonu kullanılarak, aynı gün içinde, bir kaç defa tekrarlanan deneyler yapıldığında, deneyin tekrar edilebilirliği iyi bulunmuştur (stimüle edilmemiş lökositlerde tekrar edilebilirliğe ait ortalama ve standart hatâ 100 ± 5.4 , $n=20$; lateks ile stimüle edilmiş lökositlerde ise 100 ± 1.4 , $n=22$ olarak saptanmıştır).

ŞEKİL I

İstirahat halindeki lökosit konsantrasyonu ile $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülü arasındaki bağıntı

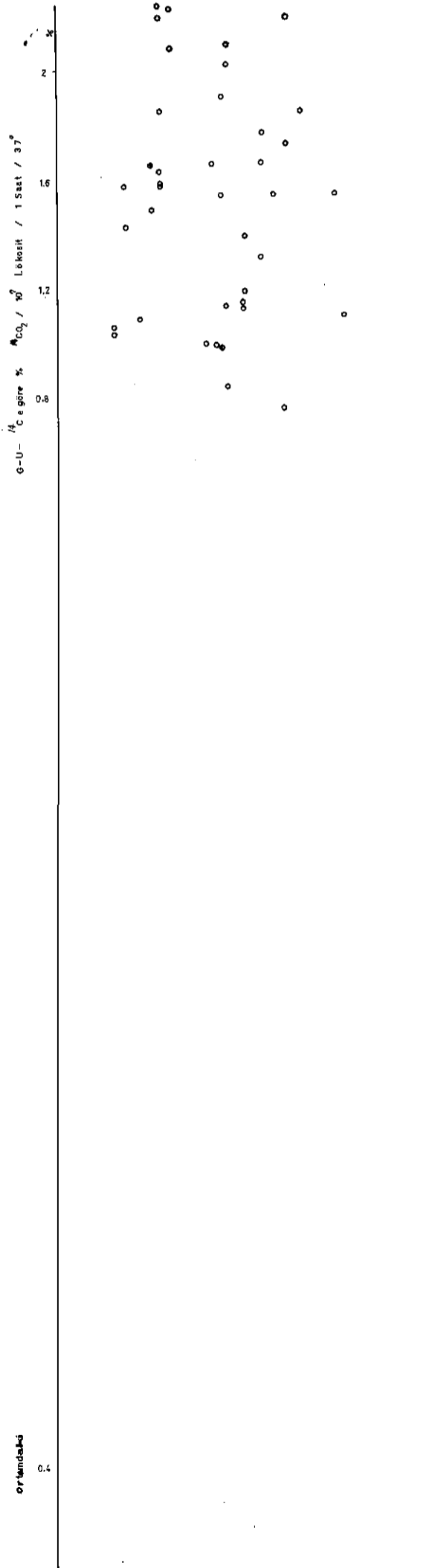
İnkübasyon şartları ve deneyin yapılışı metodolojide belirtildiği gibidir. Absiste ortamdaki lökosit miktarı ml. de, ordinatta 10^7 lökositin, 1 saatte, 37°C de ortam G-U- ^{14}C 'ünün % kaçını $^{14}\text{CO}_2$ 'ye çevirdiği gösterilmiştir. Her nokta bir deneyi temsil etmektedir.



SEKİL 2

Lateks partikülü ile stimüle edilmiş lökosit konsantrasyonu ile $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülü arasındaki bağıntı

İnkubasyon şartları ve deneyin yapılışı metodolojide belirtildiği gibidir. Absiste ortamdaki lökosit miktarı ml. de, ordinatta 10^7 lökositin 1 saatte, 37° de ortam G-U- ^{14}C 'ünün % kaçını $^{14}\text{CO}_2$ 'ye çevirdiği gösterilmiştir. Her nokta bir deneyi temsil etmektedir.



Bu sebepten deney sonuçları, G-U-¹⁴C'ün yüzde kaçının ¹⁴CO₂ ye dönüştüğü şeklinde değil de, kontrola göre yüzde etki üzerinden bildirilmiştir. Gene aynı düşünceyle, etkisi araştırılan bileşik ve kontrol deneyleri, her biri minimum üçlü olmak üzere, aynı gün , aynı lökosit süspansiyonu kullanılarak yapılmıştır. Deney sonuçlarının bildirilmesinde, deney gruplarında elde edilen yüzde etkilerin ortalamaları alınmış ve bunlar istatistik olarak değerlendirilmiştir. Böylece, kişiden kişiye büyük varyasyon gösteren lökosit davranışına, etkenlerin tesiri en anlamlı bir şekilde ifade edilebilmiştir.

Sayım işleminden deney sonuçlarına ihmal edilebilecek kadar az hatâ girmektedir. Çünkü, kullandığımız AAA ile donatılmış sayaç, mutlak aktiviteyi vermekte ve hacim farkı, renk, solvent etkisi gibi çeşitli hatâ kaynaklarından gelebilecek etkileri, düzeltme işleminden geçirerek kaydetmektedir. Ayrıca, sayımdan gelebilecek istatistik hatanın %1.5'un üstüne çıkmasına dikkat edilmiş ve gerektiğinde sayım süresi ve adedi arttırılmıştır.

Lökositler "Haemocytometer" kullanarak mikroskop altında sayıldıktan sonra deneye sokulmuştur. Lökosit sayımı işleminden gelebilecek hatâyı minimuma indirmek gayesi ile lökosit sayım preparatında bütün odacıklar sayılmış ve işlem en az dört defa tekrar edilmiştir.

$G-U-^{14}C \longrightarrow ^{14}CO_2$ dönüşmesi, $G-1-^{14}C \longrightarrow ^{14}CO_2$ dönüşme değeri kadar kıymetli olarak HMP şantı işleyişi hakkında fikir verir. (8)(9)

Bu sebepten deneylerimizde kullandığımız G-U-¹⁴C; HMP şantının işleyişini göstermektedir.

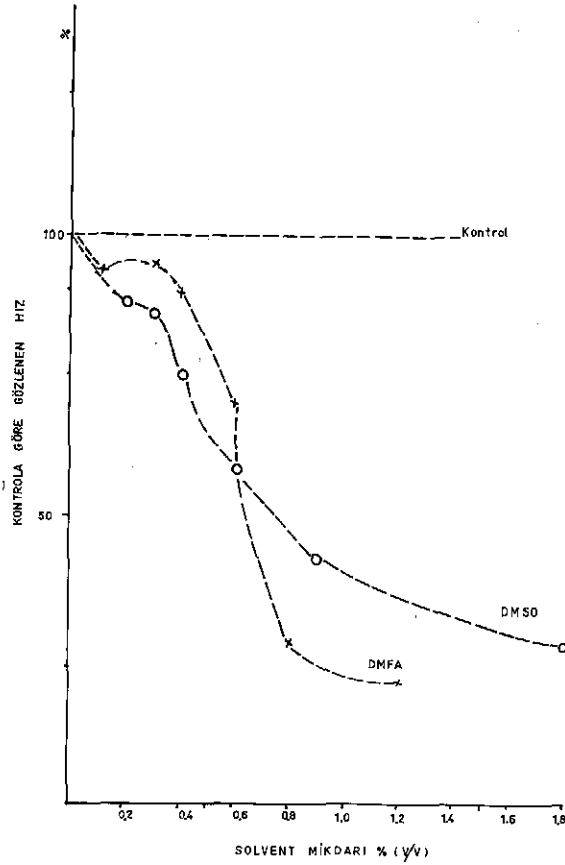
Asiatikozid suda çözünmeyen bir bileşiktir. Bu bileşiği çözerek su fazına taşıyabilecek ve aynı zamanda lökosit metabolizmasını etkilemeyecek veya az etkileyecek bir solvent taşıyıcı araştırılmıştır. Gayemize uygun bir bileşik, dimetilsülfoksit (DMSO) ve dimetilformamid (DMFA) bulunmuş ve ön deneyler yapılarak incelenmiştir. Ancak, bu bileşiklerden DMSO içinde çözünen asiatikozid, sulu faza geçince çökmüş ve fazdan ayrılmıştır. Buna mukabil, DMFA'de kullandığımız konsantrasyonlarda bu gözlenmemiştir. DMSO ve DMFA'nın $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülüne etkisi dört deneyin ortalaması olarak (Şekil 3) de gösterilmiştir. Bu şekilde de görüldüğü üzere, her iki solvent de artan konsantrasyonlarında, lökosit metabolizması üzerine inhibitör etkide bulunurlar. Bu sebepten, ancak düşük konsantrasyonlarda DMFA (ortamdaki nihai konsantrasyon %0.15) kullanılmıştır. Bu konsantrasyondaki solventin çözebileceği asiatikozid miktarı da sınırlı olacağından, maddemizin etkisi de nisbeten düşük konsantrasyonlarda incelenebilmiştir. Gerek DMSO, gerekse DMFA bu tip çalışmalarda, taşıyıcı solvent olarak kullanılan, nisbeten inert bileşikler olarak bilinirler. (23)(24)

Bu çalışmada hidrokortizon (HC) un suda çözünür preparatı olan hidrokortizon süksinat(Solu-Cortef) kullanılmıştır.

ŞEKİL 3

Ortamdaki solvent konsantrasyonunun $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülüne etkisi

Absiste ortamdaki nihai DMFA veya DMSO konsantrasyonu gösterilmiştir. Solventsiz deneye (kontrol) göre gözlenen hızlar % olarak ordinatta belirtilmiştir. Her nokta üç deneyin ortalamasını temsil etmektedir.



SONUÇLAR

Asiatikozid'in Etkisi:

Asiatikozid lökositte, (Şekil 4) de görüldüğü gibi, inkubasyon ortamına konan G-U- ^{14}C 'ün $^{14}\text{CO}_2$ vermesini hızlandırmaktadır. Bu etki istirahat halindeki lökositlerde gözleendiği gibi, lateks ile stimüle edilen lökositlerde de gözlenmektedir. Yüksek asiatikozid konsantrasyonunu temsil eden her üç değerde de $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülünün stimülasyonu, kontrol lökositine göre istatistik olarak kıymetli bir tarzda hızlanmış olarak saptanmıştır. Materyal ve Metod kısmında da belirtildiği gibi, farklı şahıslara ait lökositlerin farklı davranış göstermeleri sebebi ile, istirahat haline ait deney sonuçlarında, kontrol da dahil olmak üzere, bulgulara ait standart hatâ büyüktür.

Bu dağılım, lateks ile stimüle lökositler için daha da farklı bulunmuştur. Bu sebepten stimüle edilmiş lökositlerde $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülünün asiatikozid tarafından arttırılması fazla olmamakla beraber, gene de istatistik bakımdan kıymetli tesbit edilmiştir.

SEKİL 4

Asiatikozid'in $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülüne etkisi

Absiste nihaî asiatikozid konsantrasyonlarının logaritması belirtilmiştir. Ordinatta, bu konsantrasyonlarda gözlenen hız; ortamda yalnız %0.15 DMFA varken (kontrol) gözlenen hızlara göre % olarak ifade edilmiştir.

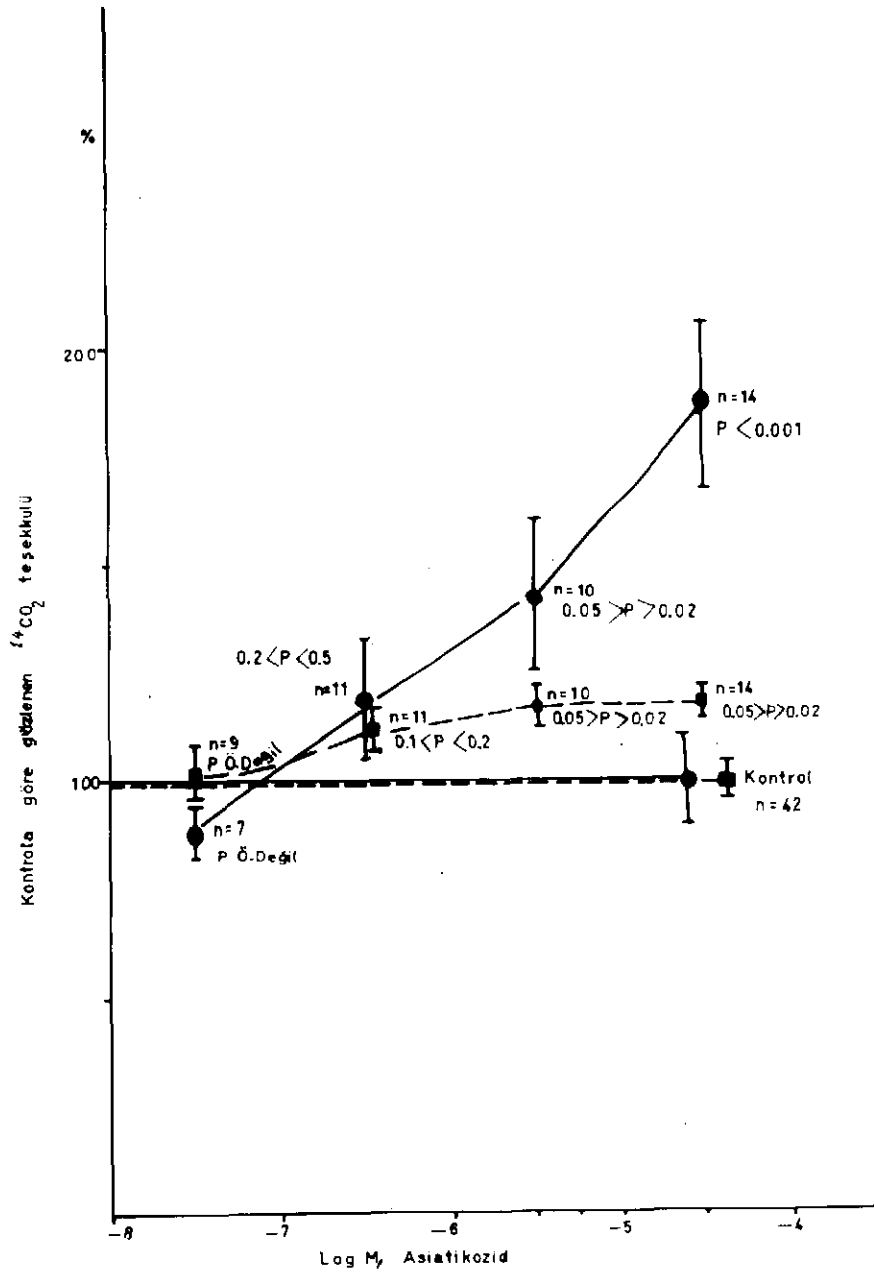
○ - ○ : İstirahat halindeki lökosit sonuçlarını,

□ - □ : Lateks ile stimüle edilmiş lökosit sonuçlarını,

⊥ : \bar{x} Standart Hatayı,

n : Deney adedini belirtmektedir.

Ayrıca, kontrola göre önem derecesini belirten (P) değerleri her deney sonucunun yanında belirtilmiştir.



Asiatikozid'in Etkisine Diğer Etkenlerin Tesiri:

Çeşitli oksidazlar aracılığı ile NADPH'yi NADP'ye oksitliyerek HMP yolunu hızlandıran metilen mavisi (MM)⁽²¹⁾, glutatyon peroksidazın maksimum tarzda etki göstermesine yol açan siyanür (CN)⁽²⁵⁾, NADH oksidaz inhibitörü hidrokortizon (HC)⁽²⁶⁾ ve transport inhibitörü 2-deoksiglukoz (2DG)⁽²⁷⁾'un önce lökosit üzerine olan etkileri tesbit edilmiş, doz grafikleri çizilmiş, sonra asiatikozidin bu etkileri ne yöne değiştirdiği gözlenmiştir. Bu etkenlerden CN, 10^{-3} M'da metalloenzimlerin ve hemoproteinlerin inhibisyonuna yol açtığı için bu bileşiğin doz eğrisi çizilmemiştir.⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹³⁾⁽¹⁸⁾⁽²⁵⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾

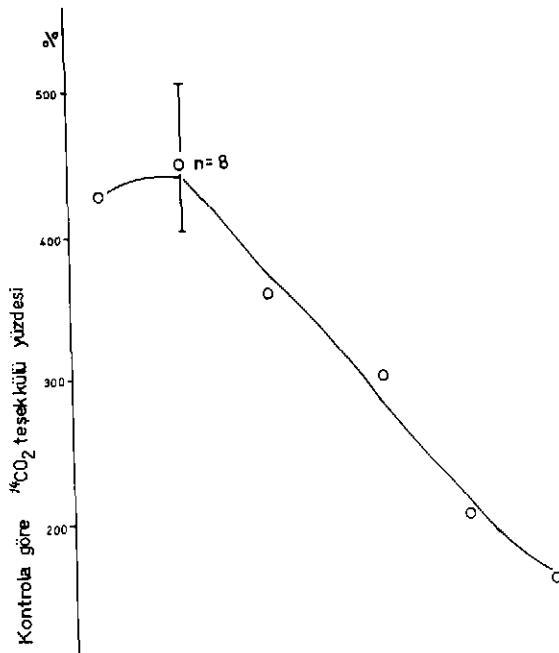
Çeşitli konsantrasyonlardaki MM'nin doz eğrisi (Şekil 5) de gösterilmiştir. Burada görüldüğü gibi, optimum aktivasyon 5×10^{-5} M metilen mavisi konsantrasyonunda gözlenmekte, daha düşük ve daha yüksek dozlar etkisiz bulunmaktadır. Stimülasyon çeşitli şahıslarda çok farklı olduğu için optimum dozda belirtilen standart hatâ yüksektir. Stimülasyon derecesi, Baehner ve Nathan'ın evvelce bildirdiği değere uygundur.⁽²¹⁾ Daha ilerde, (Şekil 8) de takdim edileceği gibi, lateks ile stimüle edilmiş lökositlerde, MM'nin stimülasyonu daha da arttırıcı etkisi yoktur.

Çeşitli konsantrasyonlardaki 2DG'un etkisi (Şekil 6) da gösterilmiştir. Şekilde de gözleendiği gibi, 2DG transport olayını kompetitif olarak inhibe eder ve buna bağlı olarak $G-U-^{14}C \longrightarrow ^{14}CO_2$ teşekkülüne mâni olur. Bu etkisi, nihâî 1mM konsantrasyonda, takriben %60 inhibisyon meydana getirebilecek kadar olup, bu konsantrasyon deney için seçilmiştir.

ŞEKİL 5

Metilen mavisinin $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülüne etkisi

Absiste, ortamdaki metilen mavisi nihai konsantrasyonunun logaritması gösterilmiştir. Ordinatta, kontrol grubu lökosite göre gözlenen $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülünün % si belirtilmiştir. Sonuçlar üç tayinin ortalamasıdır. Standart hatânın belirtildiği deney konsantrasyonu; deneyler için seçilmiştir.



Daha ilerde (Şekil 8) de, lateks ile stimüle lökositte de bu inhibisyonunun bulunduğu görülecektir. Bu inhibisyonunun yüzdesi ve patterni Kvarstein'in bildirdiği patterne uymaktadır. (19)

HC'un çeşitli konsantrasyonlardaki etkisi (Şekil 7) de gösterilmiştir. Burada gözleendiği gibi HC, lökosit preparatına ancak yüksek dozlarda (2.1 mM) inhibitör etki göstermektedir. Daha düşük konsantrasyonlarda etki etmemesi ve gösterdiği inhibisyon tarzı diğer araştırmacıların tarif ettiği değerlere uymaktadır. (26)

Asiatikozid'in lökosit metabolizması üzerinde gösterdiği etkiye CN, HC, MM, 2DG'un tesirleri (Şekil 8)de gösterilmiştir. Burada (Şekil 8A) da istirahat halindeki lökositte, (Şekil 8B) de lateks partikülü ile stimüle edilen lökositte gözlenen kontrol hızları belirtilmiştir.

Sonuçlar şu şekilde takdim edilebilir:

İstirahat halindeki lökositte MM ilâve edildiğinde $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülü istatistik olarak önemli şekilde artmakta ve asiatikozid, bu artmayı etkilememektedir. HC ilâvesi, MM'nin stimulan etkisini ortadan kaldırmaktadır. Bu, MM redüksiyonundan sorumlu oksidazın da HC'a hassas olduğunu gösterir. Asiatikozid ilâvesi bu son bulguyu değiştirmemektedir. MM'nin bu etkisi evvelce tarif edilmiştir. (21) Ortama CN ilâvesi ile bulgular değişmez, çünkü, HMP yolu metalloproteine, hemoproteine dayanmayan bir sistem kullanmaktadır. Ancak, Reed'in glutatyon peroksidaz sistemi için tarif ettiği üzere, ortama CN ilâvesi ile glutatyon peroksidaz sistemi etkilenmemekte ve $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülünde, sebebi tam açıklanamıyan bir artma gözlenmektedir. (25) Asiatikozid ilâvesi, bu stimülasyonu daha da

SEKİL 7

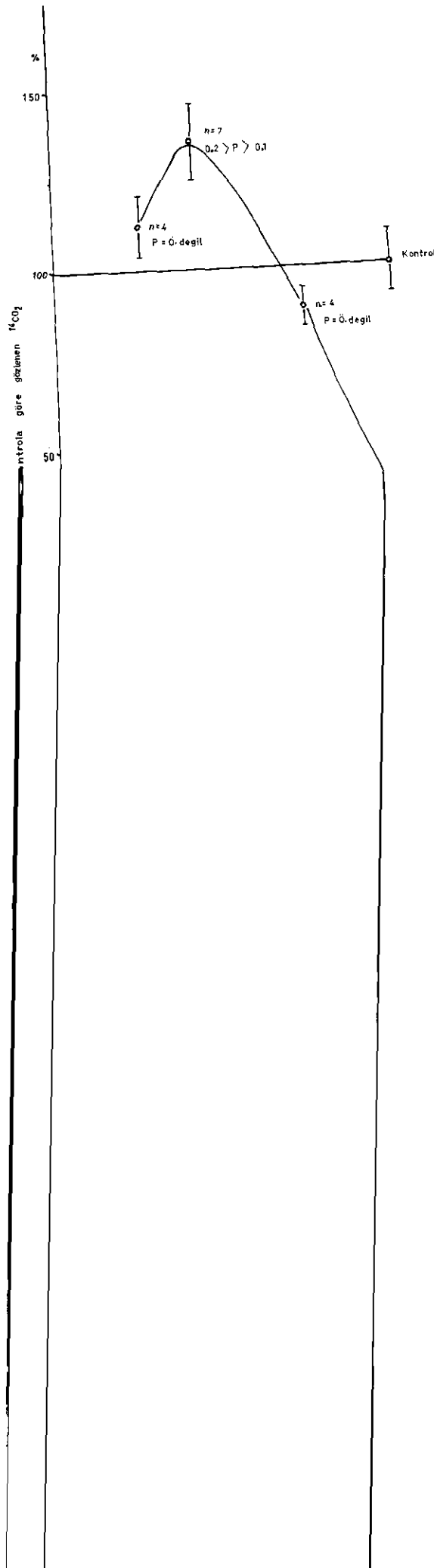
HC'un $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülüne etkisi

Absiste, ortamdaki HC nihaî konsantrasyonunun logaritması gösterilmiştir. Ordinatta, kontrol grubu lökositte göre gözlenen $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülünün % si belirtilmiştir.

n : Deney sayısını,

\bar{x} : Standart Hatâyı,

P : Önem derecesini belirtmektedir.



SEKİL 8 (A ve B)

Çeşitli bileşiklerin $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülüne etkisi ve
asiatikozid'in bu etkilere tesiri

Ordinatta, kontrol deneyine göre tesbit edilen hızlar
% olarak belirtilmiştir. Bütün bu deneylerde %0.15 konsantras-
yonunda DMFA mevcuttur.

C : Kontrolü,

MB : 5×10^{-5} M Metilen Mavisi ilâve edilen,

As : 3×10^{-5} M Asiatikozid ilâve edilen,

CN : 10^{-3} M NaCN ilâve edilen,

2DG : 10^{-3} M 2-Deoksiglukoz ilâve edilen deneyleri temsil eder.

HC : 2.1 mM Hidrokortizon ilâve edilen deneyleri temsil eder.
(Deney 8A) 'da istirahat halinde lökosit,

(Deney 8B)'de lateks ile stimüle lökosit kullanılmıştır.

n : Deney adedini,

\bar{I}
 \bar{I} : \bar{I} Standart hatâyı göstermektedir.

arttırmaktadır. Buna karşılık, MM ilâvesi, sistemi istatistikman önemli bir tarzda uyarmakta fakat asiatikozid ilâvesi daha fazla uyarıya yol açmamaktadır.

2DG ile glukoz transportu kompetitif olarak, istatistikman önemli sayılabilecek bir tarzda inhibe edildiğinde, asiatikozid ilâvesi, bu inhibisyonu azaltmakta ve bu etkisi istatistikman önemli bulunmaktadır. ($0.02 < P < 0.05$).

HC ile NADH oksidaz inhibe edildiğinde asiatikozid ilâvesi bu inhibisyonu geriye çevirmemektedir.

Lateks partikülü ile stimüle edilmiş lökositlerde $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülünü etkileyen faktörlerin büyük bir kısmının etkisi değişik bulunmaktadır (Şekil 8B). Şöyle ki, MM ile gözlenen solunum değerleri, istirahat halindeki lökositlerin solunum değerlerinden farklı değildir ve asiatikozid bunu etkilememektedir. HC, gene MM varken inhibitör etkisini göstermekte ve asiatikozid bu sonucu değiştirmemektedir.

Ortamda CN bulunması halinde solunum şiddetle aktive olmakta, bu Reed'in bulgusuna uymakta⁽²⁵⁾, asiatikozid, bu ekstra solunumu etkilememektedir.

MM ortamda mevcutken gözlenen olayın fizyolojik bir stimulus olmadığını göstermek üzere, stimüle lökosit vasatına CN'e ilâveten MM katılmış ve $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülünde elde edilen bulguların, istirahat halindeki lökosit ortamına MM ilâvesi ile bulunan değere yakın bir seviyeye indiği gözlenmiştir. Asiatikozid bu değeri etkilememiştir.

2DG mevcutken transport ve fagositoz inhibe edilmekte, asiatikozid'in ilâvesi, bu inhibisyonu bir miktar önlemektedir. ($0.02 < P < 0.05$).

Stimüle lökosit ortamına HC ilâve edildiğinde $^{14}\text{CO}_2$ teşekkülündeki stimulus, istirahat halindeki lökositteki kadar olmamakla beraber gene de azalmakta, asiatikozid ilâvesi ise HC'un daha etkili bir tarzda inhibisyon göstermesine yol açmaktadır.

TARTIŞMA

Lökositlerin fagositoz fonksiyonu esnasında derin metabolik değişiklikler gösterdikleri bilinmektedir. Bu gün fagositozun en aşağı beş kademede cereyan ettiği kabul edilir. (19)(27)

1. Partikül ve hücre arasında yapışma,
2. Hücre zarının partikülü sarmak üzere invajinasyonu,
3. Partikülün lizozom ile kaynaşması,
4. Alınan partikülün hazmı,
5. Artıkların atılması.

Bu kademelerin hepsinin biyokimyasal nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Ancak, partikülün içinde bulunduğu fagositoz vakuolunun, lizozom ile kaynaşması sonucunda hidrolazların açığa çıktığı ve kaynaşma esnasında bol miktarda teşekkül eden H_2O_2 'nin bakterisid etkiden sorumlu olduğu kabul edilmektedir. (10)(30)

Bu kaynaşma olayı, kompleks olup 3'-5'-AMP ve 3'-5' AMP teşekkülünü hızlandıran veya parçalanmasını önleyen faktörlerin de fizyolojik etkide bulunduğu bir olaydır. (31) İsopterenol veya epinefrin lökosit histamin salınışını da önler. (31) O halde, degranülasyon esnasında fagosit vakuolüne enzim salınmasında bu bileşiklerin etkili oldukları düşünülebilir. Lizozom yapısının normal olmayıp, dev granüllerin

mevcut olduğu "Chediak-Higashi" , "Aleutian Mink-Gray Collie" sendromunda bu son bahsedilen olayın kalıtsal bozukluğu nedeni ile, in vitro ve in vivo bakterisid aktivite gözlenmez.⁽³²⁾ Diğer bir insan hastalığı olan kronik granüloamatöz hastalık (CGD)'da lökositlerin bazı bakterileri öldürememeleri söz konusudur. Bu hastalıklarda "X-linked" tipinde NADH oksidaz, "X-linked" olmayan tipde glutatyon peroksidaz⁽³⁴⁾ eksikliği söz konusudur. Bu sebeple, bakterisidik 3. ve 4. kademelerin, artmış HMP şantını gösteren 1. kademeye bağlanmasını izah eden hipotezler bu hastalığı model olarak kullanmışlardır.

H_2O_2 'nin bakterisidik aktivitenin bir cephesinden sorumlu olduğu kesindir ve bunu gösteren bulgular pek çoktur. Bunlardan birkaçı aşağıda belirtilmiştir:

A. Kobayda PMN lökositlerde fagositozla H_2O_2 muhtevası 2x artar.⁽²⁶⁾⁽³⁵⁾

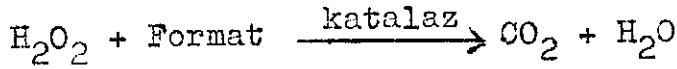
B. H_2O_2 meydana getirilmesi veya kullanılmasından sorumlu olan iki enzimde hatâ varsa, düşük bakterisid aktivite ile karakterize olan CGD tablosu ortaya çıkar.⁽²⁰⁾⁽³³⁾⁽³⁴⁾

C. CGD tablosu gösteren hastaların PMN lökositleri; laktobasillus asidofilus , streptokokus, pnömokokus gibi kendileri H_2O_2 meydana getirebilen bakterileri öldürebilir, ama kendisi H_2O_2 meydana getiremeyen stafilokok aureus'u öldürmez.⁽²⁰⁾ Eğer CGD lökositlerine, başka bir yolla H_2O_2 sentez imkânı sağlanırsa (Fenazin metasulfat verilerek), bu lökositlerin staf. aureus, senatia marcescens ve candidasidal kapasiteleri nisbeten düzelir.⁽²⁰⁾ Gene bu lökositlere, hücre içinde glukozdan H_2O_2 meydana getirmeyi sağlayacak, yabancı bir enzim dahil edilebilirse; örneğin, maya glukoz oksidazı

ile kaplı lateks partikülünü fagosite ederse, bakterisidik hatâ düzeltilebilir. (20)

D. Fizyolojik olmayan dozlarda HC kullanılarak normal lökositlerde, CGD tablosu gösterenlerin PMN lökositlerinin davranışına benzer bir biyokimyasal tablo yaratılabilir. (26) HC, H₂O₂ meydana getiremeyen bakterilerin lökosit tarafından öldürülüşünü inhibe eder. Bu etki, HC'un NADH oksidazı inhibe ederek HMP yolunun aktivasyonunu bloke etmesine bağlıdır. Bu bulguda antibakterisid etki lizozom sağlamlaştırma ile ilgili değildir. (26) Bu bulgu da bize, H₂O₂ teşekkülü ile bakterisid etki arasındaki direkt bağlantıyı göstermektedir.

E. Fagositoz esnasında H₂O₂ teşekkül ettiğini gösteren diğer bir delil de format oksidasyonudur.



Bu olay, ilk defa Iyer, Quastel ve Islam tarafından teklif edilmiştir. (9)

Bütün bu bulgulardan sonra, fagositoz esnasında fazla miktarda teşekkül eden H₂O₂ ile, gene fagositoz esnasında değişmiş olarak tesbit edilen glikolitik bulguların biyokimyasal olarak birbirine bağlanabilmeleri; fagositoz biyokimyasının en önemli problemi olarak ortaya çıkar.

Artmış H₂O₂'nin teşekkülünden iki enzim sorumlu tutulmaktadır. Bu enzimler NADH oksidaz ve NADPH oksidazdır. (10)(29) NADH oksidaz'ın insanda K_m, i 0.4 M, pH değeri 6, kofaktörü FAD'dir. (33) Hücre içinde granül lokalizasyonunda olduğu ve kolaylıkla örneğin, izotonik KCl kullanılarak solübilize edildiği söylenmiştir. (10) NADH oksidaz, HC tarafından