

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİMDALI

**ŞANLIURFA AKÇAKALE MÜLTECİ KAMPINDAKİ SURİYELİLER
ARASINDA BULUNAN LEİSHMANİASİS HASTALARINDA TGF- β 1
SEVİYESİ İLE OKSİTADİF STRES İNDEKSİ ARASINDAKİ
KORELASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HÜMEYRA PALA

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. NURTEN AKSOY

ŞANLIURFA
MAYIS 2016

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Hümeyra PALA' nın hazırladığı “Şanlıurfa Akçakale Mülteci Kampındaki Suriyeliler Arasında Bulunan Leishmaniasis Hastalarında Tgf-B1 Seviyesi İle Oksitadif Stres İndeksi Arasındaki Korelasyonun Değerlendirilmesi”, konulu çalışma, 24/08/2015 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Biyokimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

BASKAN

Danışman :**Prof. Dr. Nurten AKSOY**
Harran Ün. Biyokimya A.B

ÜYE

Yrd. Doç. Hatice SEZEN
Harran Ün. Biyokimya A.B

ÜYE

Prof. Dr. Seyithan TAYSI
Gaziantep Ün. Biyokimya A.B

22.10.2016

ONAY

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Nurten AKSOY

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, iki yıl boyunca değerli bilgilerini bizlerle paylaşan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım saygıdeğer danışman hocam;Prof.Dr.Nurten AKSOY'a, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen diğer hocalarıma ve çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan kıymetli arkadaşım Emine GÜLER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	İ
TEŞEKKÜR.....	İİ
İÇİNDEKİLER.....	İİİ
TABLO VE GRAFİKLER	Vİİ
ŞEKİLLER	Vİİİ
KISALTMALAR.....	İX
ÖZET	Xİ
ABSTRACT	Xİİ
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. <i>Leishmania</i> 'nın Tarihçesi	5
2.2. <i>Leishmania</i> Taksonomisi.....	6
2.3. <i>Leishmania</i> 'nın Morfolojisi	7
2.3.1. Amastigot	7
2.3.2. Promastigot	8
2.4. <i>Leishmania</i> 'nın Yaşam Döngüsü.....	9
2.5. <i>Leishmania</i> 'nın Moleküler Yapısı.....	11
2.6. Leishmaniasisde Vektörler ve Rezervuarlar	11
2.7.Leishmaniasis'in Klinik Formu.....	13
2.7.1. Visseral Leishmaniasis	13
2.7.2. Kutanöz Leishmaniasis	14
2.7.3. Mukokutanöz Leishmaniasis.....	15
2.7.4. Diffüz Kutanöz Leishmaniasis	15
2.7.5. Kala-azar Sonrası Deri Leishmaniasisi	16

2.7.6. Canin Leishmaniasis	16
2.8. Leishmaniasis ve Immunolojisi	17
2.8.1.Patogenez.....	17
2.8.1.1. Invazif Determinantlar	17
2.8.1.2. Pato-antijenik Determinantlar	18
2.8.2.Parazit Etkisi ve Bunu Belirleyen Faktörler.....	19
2.8.3.Konak Cevabı	19
2.8.4. İmmun Yanıt.....	19
2.8.4.1.Humoral İmmun Yanıt	21
2.8.4.2.Hücreyel İmmun Yanıt.....	21
2.8.5.Parazit-Memeli Konak İlişkisi ve İmmünopatogenez.....	23
2.8.5.1. Doğal İmmün Yanıtın Aşılması.....	23
2.8.5.2. Adaptif İmmün Yanıtın Aşılması.....	24
2.9. Leishmaniasis'in Tanı Yöntemleri.....	25
2.9.1. Direkt Tanı.....	25
2.9.2. İndirekt Tanı.....	25
2.9.2.1. ELISA	25
2.9.2.2. IFA	26
2.9.2.2.1. Doğrudan Floresan Antikor Tekniği (DFAT)	26
2.9.2.2.2. İndirekt Floresan Antikor Tekniği (IFAT).....	26
2.9.2.3. Western Blotting.....	27
2.9.2.4. Direkt Aglütinasyon Testi (DAT).....	27
2.9.2.5. İmmunokromatografik Testler (Hızlı Tanı Testleri)	27
2.9.3. Moleküler Biyolojik Yöntemler	27
2.9.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	27

2.10. Leishmaniasis'in Tedavisi.....	28
2.11. <i>Leishmania</i> 'nın Sağlık Açısından Önemi	30
2.12. <i>Leishmania</i> ile Mücadele ve Kontrol	33
3. BÜYÜME FAKTÖRÜ (GROWING FACTOR).....	34
3.1. Büyüme Faktörlerinin Sınıflandırılması.....	36
3.2. Yara İyileşmesinde Rol Oynayan Büyüme Faktörleri.....	37
3.3. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (Transforming Growth Factor-Beta).....	37
3.3.1. TGF- β ' nın Özellikleri	38
3.3.2. TGF-B' nın Etki Mekanizması.....	40
3.3.3. Yara İyileşmesinde TGF- B' nın Rolü.....	41
4. OKSİDATİF STRES.....	42
4.1. Oksidatif Stresin Makromoleküller Üzerine Olan Etkisi	42
4.1.1. Oksidatif Stresin Lipitler Üzerine Olan Etkisi	42
4.1.2. Oksidatif Stresin Proteinler Üzerine Olan Etkisi.....	44
4.1.2.1. İleri Oksitlenmiş Protein Ürünleri.....	45
4.1.2.2. Siyalik Asit	45
4.1.3. Oksidatif Stresin Nükleik Asitler Üzerine Olan Etkisi	48
4.1.4. Oksidatif Stresin Hücreler Üzerine Olan Etkisi.....	49
4.1.4.1. Apoptoz	49
4.1.4.1.1. Apoptozda Mitokondrinin Önemi	50
4.2. Oksidatif Stres ve Hastalıklar	51
5. GEREÇ VE YÖNTEM	52
5.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	52
5.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	52
5.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler, Kitler ve Sarf Malzemeler	53

5.4 Toplam Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü.....	53
5.5. Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü.....	54
5.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Ölçümü	54
5.7. TGF-β1 Düzeyinin Ölçümü	54
5.8. Yapılan İstatistiksel Analizler	55
6.BULGULAR	56
7.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	61
8. KAYNAKLAR.....	68



TABLO VE GRAFİKLER

Tablo 1.1.Akdeniz ülkelerde tahmin edilen VL sıklığı	2
Tablo 1.2.İnsanlarda enfeksiyona sebep olan önemli Leishmania türleri.....	3
Tablo 2.1.Leishmania türleri ve major rezervuarları.....	12
Tablo 5.1.Hasta ve kontrol grubunun tgf-β1 düzeyi ve oksidatif stres parametrelerinin karşılaştırılması.....	56
Tablo 5.2.Hasta grubunda testler arasındaki korelasyon analizi.....	56
Tablo 5.3.Kontrol grubunda testler arasındaki korelasyon analizi.....	57
Tablo 5.4.Hasta ve Kontrol grubundaki testler arasındaki korelasyon analizi.....	57
Gafik 5.1.TGF-β1 ile OSI düzeyinin korelasyon analizi.....	58
Grafik 5.2.Hasta ve kontrol gruplarının TGF-β1 düzeylerinin arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	58
Grafik 5.3.Hasta ve kontrol gruplarının TAS düzeylerinin arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	59
Grafik 5.4.Hasta ve kontrol gruplarının TOS düzeylerinin arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	59
Grafik 5.5.Hasta ve kontrol gruplarının OSI düzeylerinin arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	60

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.Leishmaniasisin Dünyadaki dağılımı.....	4
Şekil 2.1.Leishmania amastigot şeklinin ince yapısı.....	8
Şekil 2.2.Leishmania promastigot şeklinin ince yapısı.....	9
Şekil 2.3.Dişi Phlebotomus (Tatarcık).....	10
Şekil 2.4.Leishmania'nın yaşam döngüsü.....	10
Şekil 2.5.VL olgusunda hepatosplenomegali.....	14
Şekil 2.6.Sağ üst kol lateralında KL lezyonu.....	15
Şekil 2.7.Yüzde görülen DiffüzKutanözLeishmaniasis.....	16
Şekil 2.8.İmmun yanıt.....	22
Şekil 3.1.(A) Rekombinant insan TGF- β 1'in NuclearMagneticResonance (NMR) yöntemi ile çıkarılan üç boyutlu seması (B) TGF- β 1' in heteronükleer NMR yöntemi ile homodimer ayna görüntüsünün sematize edilmesi.....	39
Şekil 3.2.TGF- β 'nın sinyalizasyon yolu.....	41
Şekil 4.1.Lipit peroksidasyonunun aşamaları.....	43
Şekil 4.2.N-Asetilnöraminik asit.....	45
Şekil 4.3.N-Asetilnöraminik asitinaglikon kökü ve glikozid bağın konumu.....	46
Şekil 4.4.Hücre membranındasiyalik asit.....	47
Şekil4.5.Apoptoz.....	50
Şekil 4.6.Apoptotik süreçte mitokondrinin rolü.....	51

KISALTMALAR

VL	VisseralLeishmaniasis
KL	KutanözLeishmaniasis
MKL	MukokütanözLeishmaniasis
DKL	DiffüzKutanözLeishmaniasis
AKL	AntroponotikKutanözLeishmaniasis
ZKL	ZoonotikKutanözLeishmaniasis
ZVL	ZoonotikVisseralLeishmaniasis
AIDS	EdinilmişBağışık Yetersizliği Hastalığı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
DNA	DeoksiriboNükleik Asit
NNN	Novy-MacNeal ve Nicole
kDNA	KinetoplastDeoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	MesajcıRibonükleik Asit
Rrna	RibozomalRibonükleik Asit
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
GPI	Glikozilfosfatidilinositol
GIPL	Glikozil-fosfolipid
LPG	Lipofosfo-glikan
PG	Fosfoglikan
PPG	Proteo-fosfoglikanlar
CPs	SisteinProteaz
MCP	MakrofajKemotaktik Protein
DC	DentritikHücreler
İFAT	İndirektFluoresan Antikor Testi

ELİSA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
DAT	Direkt Aglütinasyon Testi
C	Kompleman
ICAM	Hücre İçi Adhezyon Molekülü
VCAM	Vasküler Hücre Yapışma Molekülü
HTT	Hızlı Tanı Testi
EKG	Elektrokardiografi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
JAKs	Janus Tirozin Kinazları
STAT	Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
PDGF	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
SOD	Süperoksit Dismutaz
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
MIS	Kemik Morfogenetik Proteinleri
MNSF	Monoklonal Nonspesifik Süpresör Faktör
PCO	Protein Karbonil Ürünleri
NT	Nitrotirozin
AOPP	İleri Oksitlenmiş Protein Ürünleri
NANA	N-Asetilnöraminik Asit
AİF	Apoptoz İndükleyici Faktör

ÖZET

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü Tropikal Hastalıkları Araştırma Merkezi'nin önemli kabul görmüş altı hastalıktan birisidir. Bu hastalıkta; Visseral Leishmaniasis (VL), Kutanöz Leishmaniasis (KL) ve Mukokütanöz Leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç farklı klinik tablo şeklinde ortaya çıkmaktadır. Leishmaniasis ülkemizde özellikle Güneydoğu Anadolu bölgesinde yaygın olarak görülmektedir. Yıllar için de azalma gösteren vaka sayısı iç savaştan dolayı Suriye'den gelen sığınmacılar nedeniyle yeniden artmaya başlamıştır. Bu hastalıkta IL-8, IL-10,TFN- α gibi çeşitli sitokin düzeylerinde anlamlı değişiklikler tespit edilmiştir.Bu çalışmada TGF- β 1 seviyesi ve oksitativ stres arasındaki ilişki incelenecektir.

Büyüme faktörlerinden TGF- β neredeyse bütün hücrelerde sentez edilebilen önemli bir polipeptit olup,TGF- β , memelilerdeki yara iyileşmesi sürecinde ekstrasellüler matriksin yeniden düzenlenmesinin, epitelyum oluşumunun, inflamasyonun ve kan pıhtı oluşumunun bir anahtar düzenleyicisidir.

Çalışmamızda TGF- β 1 seviyesi ELISA yöntemi ile oksidan-antioksidan parametreler ise spektrofotometrik yöntem ile çalışılmış ve çalışılan tüm parametrelerin birbirleriyle korelasyonlarının istatistiksel analizi yapılarak TGF- β 1'in Leishmaniasis ile ilişkisi araştırılmıştır.

TGF- β 1 seviyesi hasta grubunda düşük oksidatif stres parametreleri ise yüksek bulunmuştur. Umulanın aksine, TGF- β 1'nin düşük bulunması bize bu hastalarda görülen granülomatöz lezyonların oldukça dejeneratif hasarlar oluşturduğunu, harap olan ekstrasellüler matriksin kemotaksis ile buraya göç eden makrofaj tipi hücrelerinde, TGF- β 1 gibi sitokinlerin normale göre daha az üretilmesine neden olabileceğini göstermektedir. Buna göre bu hastalarda oksidatif stresle mücadele etmenin sadece oksidatif hasarı önlemekle kalmayıp TGF- β 1 üretimini de artırarak kalıcı skarlar oluşturan leishmanial lezyonların daha kolay iyileşmesinide sağlayabileceği kaanatine varmaktayız. Fakat sonuçlarımızın daha geniş hasta popülasyonunda yapılacak daha detaylı ve uzun süreli çalışmalarla teyit edilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler ; Leishmaniasis ,TGF- β 1 ,Oksitativstres,ELISA

ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the six diseases accepted to be important by World Health Organization Tropical Diseases Research Centre. Visceral Leishmaniasis (VL), Cutaneous Leishmaniasis (KL) and Mucocutaneous Leishmaniasis (MKL) present themselves as three different clinical pictures in this disease. Leishmaniasis is commonly seen in especially Southeast Anatolian Region in our country. The number of the cases showing decrease over the years has begun to increase again due to the refugees coming from Syria because of civil war. Significant changes were detected in various cytokine levels such as IL-8, IL-10, TFN- α in this disease. In this study, the relationship between TGF- β 1 level and oxidative stress was explored.

TGF- β 1, one of the growth factors, is an important polypeptide which can be synthesised in almost all cells, and TGF- β 1 is a key regulator in rearrangement of the extracellular matrix, formation of epithelium, inflammation and blood clot in wound healing process in mammals.

In this research, TGF- β 1 level was studied using ELISA method and oxidant-antioxidant parameters using spectrophotometric method, and correlations of all these parameters were statistically analysed and the relationship of TGF- β 1 with Leishmaniasis was examined.

TGF- β 1 level was found to be low while oxidative stress parameters were high in patient population. Contrary to what was expected, low TGF- β 1 level indicates that granulomatous lesions seen in these patients led to severe degenerative damages, and damaged extracellular matrix can cause the cytokines such as TGF- β 1 to be produced less than normal in macrophage cells migrating here through chemotaxis. Therefore, we have reached the conclusion that fighting against oxidative stress in these patients can not only prevent oxidative damage but also help leishmanial lesions that cause permanent scars to heal more easily by increasing the TGF- β 1 production. However, our findings need to be confirmed through more detailed and long-term studies to be conducted in wider patient population.

Keywords ; Leishmaniasis, TGF- β 1, Oxidativestress, ELISA

1.GİRİŞ

Leishmania türleri evrimlerini omurgalı ve omurgasız olmak üzere iki konakta geçirirler.Omurgalı konak insan veya diğer memeliler, omurgasız konak ise tatarcıklardır. Omurgalılarda *Leishmania* amastigot kamçısız hareketsiz formunda,omurgasızlarda ise promastigot deniler hareketli kamçılı formu vektörün bağırsağında bulunur (1,2).

İnsan ve diğer memelilerde *Leishmania* parazitleri özellikle retikuloendotelial sistem hücrelerinin içerisinde amastigot formunda bulunmaktadır. Enfekte bir konağı ısırın Phlebotomus'lar (tatarcık,kum sinekleri) kan emerken amastigotları almakta ve orta barsağında bu parazitlerin kamçılı formu olan promastigotlar meydana gelmektedir. Bu süreç yaklaşık bir hafta almaktadır. Promastigot şekli ise mekik veya iğ biçiminde kamçılı ve de hareketlidir.

10-15 um boyutlarındaki kamçılı promastigotlar 22-25 °C 'lik ısının sağlandığı çeşitli besiyerlerinde de in vitro olarak da üretilebilmektedirler. Amastigot şekli 2-3 µm boyutlarında yuvarlak-oval bir şekile sahip olup kamçısı yoktur ve hareketsizdir. Giemsa veya Wright boyası ile yapılan boyama sonrasında büyük bir nükleus yanında sitoplazma içerisinde nukleustan daha küçük bir çubuk şeklinde kinetoplast bulunmaktadır (3).

Leishmania türleri muko-kutanöz ve sistemik ajanlar ve ölümcül hastalıklara neden olan farklı protozoon parazitlerden oluşur (4).

Leishmania parazitinin bilinen 30'den fazla türü vardır. Bunların 12 türü insanları enfekte eder (1).

Zoonotik bir enfeksiyon olan leishmaniasis, köpek ve diğer kemiricilerde de ortaya çıkar. Hastalığın klinik seyri, parazitin bulaşması, tropizmi ve patogenezi ile konağın immun sistemi arasındaki kompleks etkileşimlere bağlıdır. Klinik belirtileri; asemptomatik şekilden visseral leishmaniasis (VL) gibi ağır tablolarla seyreden değişik şekillerde olabilir (5).

Türkiye'de, *L.donovani*, *L.infantum*, *L.tropica*, *L.major* türleri ile enfeksiyonlara sıklıkla rastlanmaktadır. Bunlardan ilk iki tür insanlarda retikuloendotelial sistem hücrelerine yerleşerek iç organ leishmaniasis (VL)' ine neden olurlar. *L.tropica* ve *L.major* türleri ise deriye yerleşerek kutanöz leishmaniasise sebep olurlar (6,7).

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü Tropikal Hastalıkları Araştırma Merkezi'nin önemli kabul ettiği 6 hastalıktan birisidir. Bu hastalıkta; Visseral Leishmaniasis (VL), Kutanöz Leishmaniasis (KL) ve Mukokütanöz Leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç farklı klinik tablo ortaya çıkmaktadır.

Ayrıca son zamanlarda bunlara Diffüz Kutanöz Leishmaniasis (DKL) eklenmiştir. Akdeniz bölgesinde de geniş bir yayılım gösteren leishmaniasis, eko-epidemiolojik açıdan Antroponotik Kutanöz Leishmaniasis (AKL), Zoonotik Kutanöz Leishmaniasis (ZKL) ve Zoonotik Visseral Leishmaniasis (ZVL) olarak ayrılabilir (5,7-11).

WHO tarafından 1994 yılında AIDS sıklığındaki artışa paralel olarak VL olgularında da artış olduğu bildirilmiştir (12,13).

Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı (Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence) raporunda her yıl yaklaşık 0.2 - 0.4 milyon VL ile 0.7-1.2 milyon KL vakası rapor edilmektedir. VL vakalarının %90'dan fazlası altı ülkede görünmektedir; Hindistan, Etiyopya, Brezilya, Bangladeş, Sudan ve Güney Sudan. KL daha yaygın olup vakaların üçte biri Amerika, Akdeniz havzası Batı, Orta Doğu ve Asya merkezine doğru ortaya çıkmaktadır. KL'in en sık görüldüğü ülkeler ise Afganistan, Cezayir, Kolombiya, Brezilya, İran, Suriye, Etiyopya, Kuzey Sudan, Kosta Rika ve Perudur. Hastalık nedeniyle VL vakalarının %10 ölümüne sebep olmakta, tahmini olarak yılda 20.000 -40.000 VL nedeniyle kişi hayatını yitirdiği bildirilmektedir(14). (Tablo 1.1)

Tablo 1.1. Akdeniz ülkelerinde tahmin edilen VL sıklığı (18)

Ülkeler	VL vakaları /yıllar	VLtahmini yıllık sıklığı
Arnavut	114 /2004–2008	140-201 ¹
Cezayir	111 /2004–2008	130-200 ¹
Bosna-Hersek	2/ 2002–2005	2-3 ¹
Bulgaristan	7/ 2004–2008	8-12 ¹
Hırvatistan	5/ 2004–2008	6-8 ¹
Kıbrıs	2/ 2008	1-4 ¹
Mısır	1/ 2008	1-2 ¹
Fransa	18/ 2004–2008	20-30 ¹
Yunanistan	42/ 2004–2008	50-80 ¹
İsrail	2 /2003–2007	3-4 ¹
İtalya	134/ 2003–2007	160-240 ¹
Ürdün	0 /2004–2008	0-0

Lübnan	0 /2004–2008	0-0
Libya	3/ 2004–2008	5-10 ²
Makedonya	7/ 2005–2009	9-13 ¹
Malta	2/ 2002–2005	3-4 ¹
Monaco	Bilgi yok	
Karadağ	3/ 2004–2008	4-5 ¹
Fas	152/ 2004–2008	300-610 ²
Filistin	5/ 2004–2008	10-20 ²
Portekiz	15 /2003–2007	20-30 ¹
Slovenya	Bilgi yok	
İspanya	117/ 2004–2008	140-210 ¹
Suriye	14/ 2004–2008	30-60 ²
Tunus	89/ 2004–2008	110-160 ¹
Türkiye	29/2003–2007	60-120 ²

(Bu tahminlerden 2-4 katan daha fazla olduğu bildirilmiştir)

Leishmaniasis; tedavi ve kontrolünde yaşanan zorluklar nedeniyle, paraziter hastalıklar içinde sıtmadan sonra ikincil önemli hastalık olarak anılmaktadır (9).

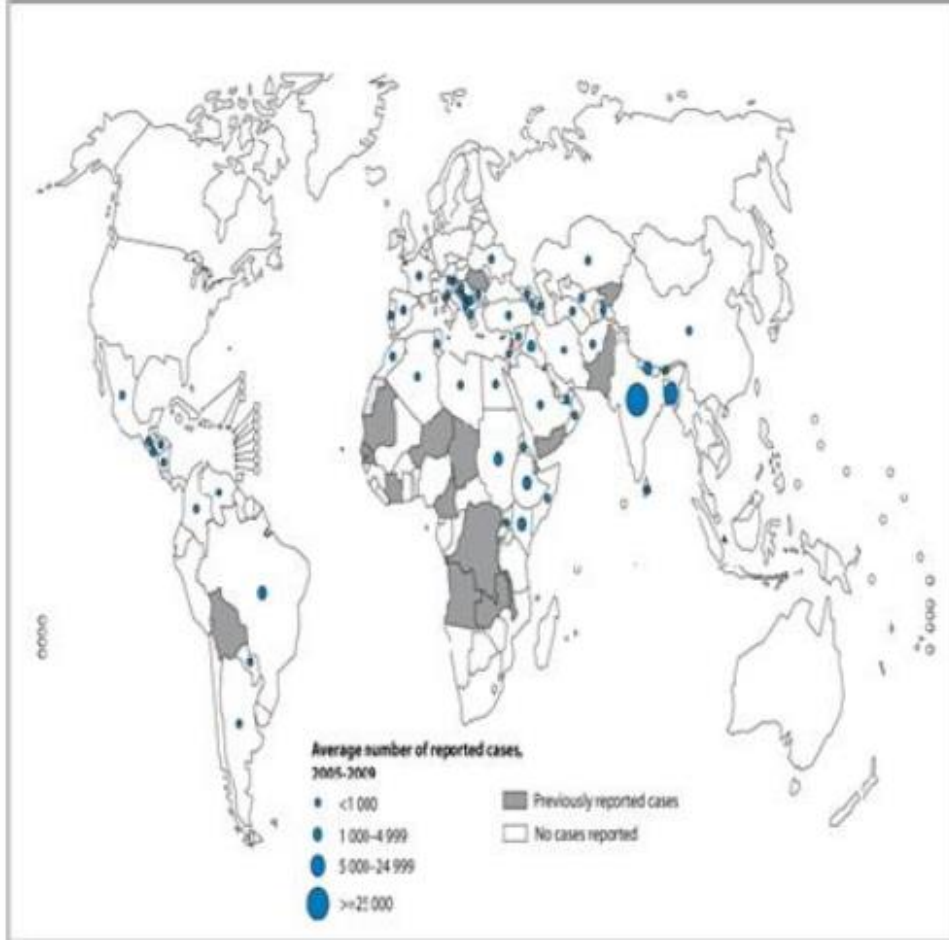
Leishmania türlerinin insanlarda sebep oldukları klinik sendromlar ve bunların dünyadaki dağılımları Tablo 1.2’de gösterilmektedir (15).

Tablo 1.2. İnsanlarda enfeksiyona sebep olan önemli *Leishmania* türleri

Türler	Klinik Tablo	Coğrafik Lokalizasyon
<i>*L.(L.)donavani</i>	VL, PKDL	Hindistan, kuzey ve doğu Çin,
<i>*L.(L.)infantum</i>	Visseral leishmaniasis	Nepal Akdeniz havzası, Orta Doğu, Balkanlar,Asya, Kuzeybatı Çin ,Kuzey ve Sahra altı Afrika
<i>L.(L.)chagasi</i>	VL, KL (nadir)	Latin Amerika
<i>L.(L.)archibaldi</i>	VL,KL	Sudan, Kenya, Etiyopya
<i>L.(L.)majör</i>	KL	Orta Doğu, Kuzeybatı Çin, Kuzeybatı Hindistan,Pakistan, Afrika
<i>*L.(L.) tropica</i>	VL, KL	Akdeniz havası, Orta Doğu,Batı Asya , Hindistan
<i>L.(L.) aethiopica</i>	KL, DKL	Kenya, Etiyopya, Yemen
<i>L.(L.) mexicana</i>	KL , Mukozal Leishmaniasis (nadir)	Meksika ,Orta Amerika ,Teksas
<i>L.(L.) amazonensis</i>	VL, KL, DKL(nadir)	Amazon havzası,Brezilya
<i>L.(L.) pifanoi</i>	KL,DKL	Venezuela

<i>L.(L.) granhami</i>	KL	Venezuela
<i>L.(L.) venezuelensis</i>	KL	Venezuela
<i>L.(V.) braziliensis</i>	KL, Mukozal Leishmaniasis	Latin Amerika
<i>L.(V.) guyanensis</i>	KL	Amazon havası
<i>L.(V.) peruviana</i>	KL	Peru, Arjantin
<i>L.(V.) panamensis</i>	KL	Panama, Costa Pica

*Türkiye’de görülen *Leishmania* türleri



Şekil 1.1. Leishmaniasisin Dünyadaki dağılımı

VL’de, *Leishmania* parazitiyi görerek tanı koymak için, kemik iliği, dalak, karaciğer ve lenf bezi aspirasyonu yapılabilenkte veya alınan perifer kan örneğinden santrifüj yardımıyla ayrılan çekirdekli hücreler incelenmektedir. KL’de ise lezyon kenarından alınan aspirasyon, kabuk veya punch biyopsi örnekleri kullanılmaktadır. Her iki klinik formda da örnekler alındıktan sonraki tanı koyma amaçlı yapılan işlemler büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (16).

2.GENEL BİLGİLER

2.1. *Leishmania*'nın Tarihçesi

M.Ö. 7. Yüzyıla ait Kral Ashurbanipal kütüphanesinde leishmaniasise ait göze çarpan lezyonların açıklamalarının bulunduğu tabletler bulunmuştur. Bunlardan bir kısmının MÖ 1500-2500 yıllarına ait metinlerden elde edildiği düşünülmektedir. 10. yüzyılda İbn-i Sina'nın da dâhil olduğu Arap doktorlar tarafından kuzey Afganistanda Balkh yarısı diye adlandırılan KL dair ayrıntılı açıklamalar bulunmaktadır (17,18).

Hastalık VL, KL ve MKL olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Kala Azar veya Kara Ateş olarak adlandırılan VL Çin ve Bengal'de görülmüş, fakat 3 yıl içinde 750 bin kişinin ölümüne yol açan ilk salgın Hindistan'ın Jessore bölgesinde tanımlanmıştır. Dünya'da ilk kez Hindistan Kalküta'da çalışan Dr Twining tarafından “ bataklıklardan çıkan kokulara maruz tropikal memleketlerin endemik kaşeksisi ” olarak adlandırılan hastalığın VL ile aynı olduğu 1908 yılında anlaşılmıştır. 1900 yılında William B. Leishman, Hindistan'da Kalküta yakınlarında çalışan Dum-Dum şehrinde dizanteriye yakalanarak İngiltere'ye gönderilen ve 7 ay sonra ölen bir askerin dalak yayma preparatında gördüğü ufak, oval cisimleri Trypanosomaların yozlaşmış şekilleri olabileceği yönündeki bulgularını 1903 yılında yayınlamıştır. Aynı yıl içinde Sir Charles Donovan yine Hindistan'ın Madras kentinde hastaların dalağından yaptığı preparatlarda aynı paraziti görmüş ve bunların Trypanosoma olmadığını 1903 yılında yayınlayarak belirtmiştir.

Parazite ilk olarak “Piroplazma donovani” adı verilmiş, daha sonra Dr. Ronald Ross'un “Leishmania” cinsini tanımlamasıyla kala azar etkeni “Leishmania donovani” adını almıştır. Günümüzde ise amastigot olarak adlandırılan parazitin memelilerde bulunan formu, bir süre “Leishman Donovan” cisimciği olarak adlandırılmıştır (19).

G. C. Chatterjee ve Roggers, Kalkuta'da yaptıkları kültürde, parazitin promastigot şekiller oluşturduğunu görmüşlerdir. Bu bulguyu Roggers 1904 yılında yayınlamıştır. S.R. Cristophers 1904 yılında kala-azarın patolojisini tarif etmiş ve parazitin dalak, karaciğer ve kemik iliğinde hemen hemen benzer yoğunlukta olduğunu göstermiştir. Catoire 1904 yılında, Pionese 1905 yılında Akdeniz Bölgesi'nde dalak anemisine yakalanan çocuklarda etkeni bulmuşlardır.Ch. Nicolle, Novy ve W.J. Mac Neal (N.N.N.) 'in 1904 yılında tarif ettikleri besiyerine benzer bir besiyerinde paraziti üretmiş, köpeklere ve maymunlara aşılama ve Akdeniz alt bölgesinde VL'nin rezervuarının köpek olacağı hipotezini öne sürmüştür. 1908

yılında Tunus'ta Nicolle ve Compte köpekte leishmania etkenini bulmuşlardır. Bu parazite 1908 yılında Ch. Nicolle tarafından *Leishmania infantum* adı verilmiştir. Ülkemizde ise leishmaniasis ile ilgili ilk bilgiler; Dr. Vefik Vassaf'a göre kala-azarın varlığını yazan ilk doktor Kristamonas'tır. Bu doktor Trabzon'da kala-azar tespit ettiğini açıklamıştır. General Ord. Prof. Dr. Abdülkadir Noyan 1916 yılında dalak ve karaciğer ponksiyonu yaptıkları hastalardan 11'inde *Leishmania donovani* saptamışlardır (20). Dr. Hafert Kaller 1918 yılında İzmir ve çevresinde kala-azar'a rastladığını bildirmiştir (20). İbrahim Osman 1931 yılında bir kala-azar vakası yayınlamıştır. Dr. Akil Muhtar Özden 1936 yılında birkaç tane kala azar olgusu yayınlamıştır (20).

2.2. *Leishmania* Taksonomisi

Leishmaniasis'in sistematikteki yeri şöyle özetlenebilir (21).

Kingdom: Protista

Subkingdom: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Class: Zoomastigophora

Order: Kinetoplastida

Family: Trypanosomatidae

Genus: *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*

Phytomonas

Genus: *Leishmania*

Subgenus: *Leishmania*

Species: *Leishmania donovani*

Leishmania infantum

Leishmania chagasi

Leishmania cropica

Leishmania major

Leishmania aethiopica

Leishmania mexicana (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*,

L. pifanoi, *L. enrietti*)

Subgenus: Viannia

Species: *Leishmania braziliensis* kompleksi (*L. braziliensis*, *L. colombiensis*, *L. equatorensis*, *L. peruviana*),

Leishmania guyanensis (*L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. shawi*),

Leishmania lainsoni,

Leishmania naifi

2.3. *Leishmania*'nın Morfolojisi

Leishmania cinsine ait olan türlerde memeli konakta görülen “amastigot” ve vektörlerde görülen “promastigot” form olmak üzere morfolojik olarak 2 formda görülmektedir. Parazit farklı canlılarda, değişik 2 şekilde bulunur, fakat her iki evrede de birbirine benzer temel yapıda; nükleus yuvarlak ya da oval şekilde, parazitin bulunduğu gruba özgü olan kinetoplast ise nükleuse göre daha koyu boyanmış, yuvarlak, oval veya çubuk şeklinde görülebilmektedir. Her iki form bölünerek çoğalır ve sırasıyla, nükleus, sitoplazma ve son olarak hücre zarının ayrılmasıyla *Leishmania* paraziti ikiye bölünür (22).

2.3.1. Amastigot

Yuvarlak veya oval şekilli, 2.5-6.8 µm büyüklüğünde hareketsiz olup, lökositler, monositler veya endotel hücreleri içerisinde tek tek veya gruplar halinde de bulunabilirler. Sitoplazmada uca yakın büyük bir nükleus ve nükleusa bitişik kinetoplast bulunmaktadır.

Kinetoplastta da nükleusdakinden farklı bir DNA bulunmaktadır. DNA'nın dizilimi türlere göre farklılık gösterdiğinden dolayı tür ayırımında yardımcı olmaktadır. Bütün Leishmania türlerinde sitoplazmada tek bir mitokondrium vardır. Sitoplamasında bulunan golgi aygıtı ve lizozomlar çeşitli enzim aktivitelerinden ve parazitin beslenmesinden sorumludurlar. Amastigotlar kamçı cebi içinde bir kamçıya sahip olmakla beraber kamçı hücre dışına çıkmamaktadır (23).



Şekil 2.1. *Leishmania* amastigot şeklinin ince yapısı

2.3.2. Promastigot

Promastigot, 15-20 μm boyunda, 1.5-5 μm genişliğinde mekik şeklinde, kamçılı bir formdur. Vektör olan *Phlebotomus*'ta 27°C'de uzunlamasına bölünerek çoğalmaktadır. *Phlebotomus* bağırsaklarında ve amastigot formlarının uygun besiyerlerinde bir süre sonra şekil değiştirmesinden sonra görülebilen bir formdur. Ön uçtan çıkan 18-20 μm uzunluğunda serbest bir kamçısı ve aynı zamanda kamçı köküne yerleşmiş olan dokuz çift periferik ve bir çift merkezi liften oluşmuş bir aksonemi bulunmaktadır. Kamçının bağlantı noktasında bir çukurluk görülmektedir ve bu çukurluğa "kamçı paketi" adı verilmektedir. Kinetoplastın ön kısmında ve kamçının dip kısmında bleforablast, sitoplazma içinde golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum bulunmaktadır (24).



Şekil 2.2. *Leishmania* promastigot şeklinin ince yapısı

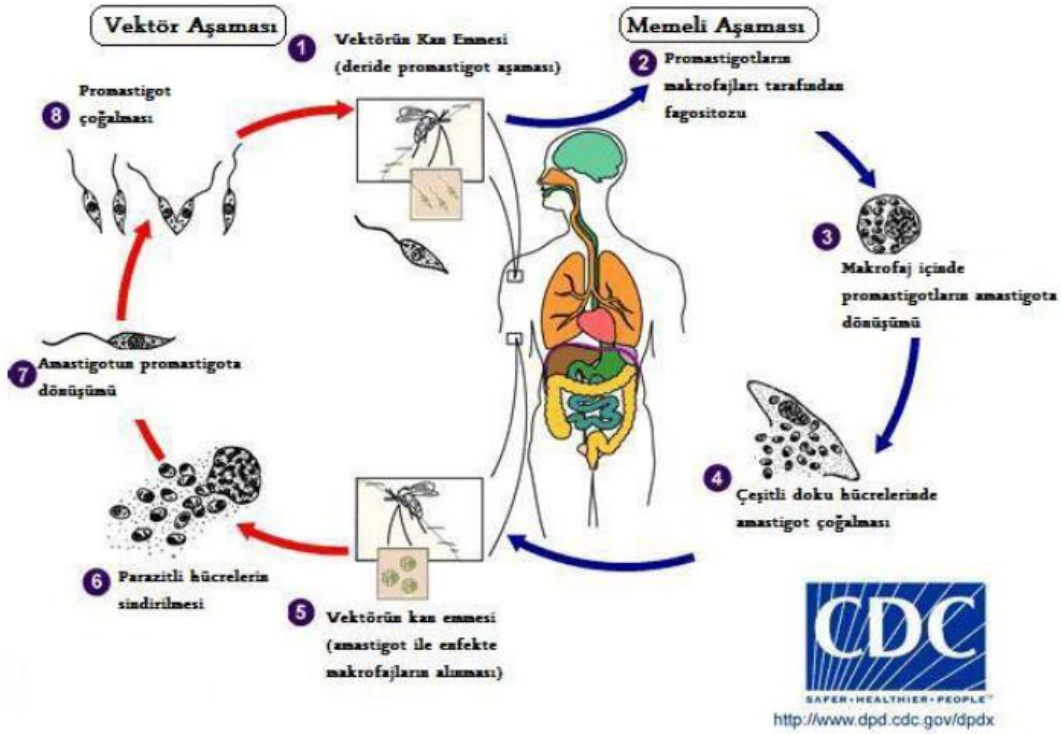
2.4. *Leishmania*'nın Yaşam Döngüsü

Leishmania türleri vektörü olan *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi tatarcıklar, leishmaniasisli bir omurgalı konaktan kan emerken makrofajlar içinde bulunan parazitin amastigot şeklini almaktadırlar (Şekil 2.4). Emilen kan, orta midede “peritrofik membran” adı verilen bir membran ile sarılmakta ve sineğin sindirim enzimleri ile bu membran içine salgılanmaktadır. *Leishmania*'ların bir kısmı makrofajların lizis olması esnasında sindirilirken kalanların vücudu uzamakta ve kamçı gelişerek enfektif olmayan promastigot şekline dönüşüp bölünerek çoğalmaya başlar durumdadır.

Enfektif promastigotları barındıran vektör tatarcık, kan emmek için bir omurgalı konağı soktuğu zaman belli bir miktardaki promastigotları da gidiş yönü kan akımının aksine olduğu halde inoküle etmemekte ve deriden vücuda giren promastigotlar ilk saatlerde serumdaki kompleman tarafından opsonize edilmekte ve uygun hücreler tarafından fagosite edilmektedir. Fagosite edilen promastigotlar kamçısını kaybederek amastigot şekline dönüşmektedir. Enfeksiyonun bundan sonraki seyrini *Leishmania*'nın türü belirlemektedir. Enfeksiyon deride sınırlı kalabilmekte (*L.tropica*) veya iç organlara göç edebilmektedir (*L.infantum*). Enfekte makrofaj kan yoluyla deriden öncelikle dalak, karaciğer ve kemik iliği olmak üzere diğer dokulara doğru hareket etmekte ve bu organlarda çeşitli patolojilere neden olmaktadır (10,16) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Dişi *Phlebotomus* (Tatarcık)



Şekil 2.4. *Leishmania*'nın yaşam döngüsü

2.5. *Leishmania*'nın Moleküler Yapısı

Leishmania çekirdekte bulunan DNA'nın yanı sıra kinetoplast DNA (kDNA) olarak bilinen mitokondrial DNA'ya sahiptir. kDNA, minicircle ve maxicircle olmak üzere iki kısımdan oluşmuş bir DNA modeli içermektedir. Maxicircle, 20-35 kb büyüklüğünde ve homojen, minicircle ise 0,5-1,5 kb kalınlığında olan heterojen dairesel DNA molekülüdür (25,26).

Leishmania genomlarında ardı ardına dizilmiş tekrarlanan genler bulunmakta ve olgun mRNA'ların polisistronik prekürsörleri olarak RNA'ya dönüşmektedirler. Bu mRNA'ların işleme yöntemlerinin en özgünlerinin "trans-splincing" ve mitokondrial mRNA'ların "post-transkripsiyonel editing" ile işlenmesi olduğu düşünülmektedir (27).

Tüm *Leishmania* türlerinde yüksek derecede korunan genler 1 Mb'dan büyük kromozom şeklinde bulunmaktadır. *Leishmania*'nın asıl gerekli olan genleri büyük kromozomlarda bulunurken, diğer kromozomlar özel adaptasyonlar için ya da çok özel fonksiyonlarda (yüzey proteazları, antijenler, sekresyon faktörleri vs.) yardımcı gen kopyalarını taşımaktadır (28).

Leishmania genomunda 8300 protein kodlayan ve 900 RNA bulunmaktadır. Protein kodlayan genlerin yaklaşık %40'ı 2 ile 500 arasında üyesi bulunan mevcutta 662 ailede yer almaktadır (29).

Leishmania türleri yüksek derecede esnek bir kromozom organizasyonuna sahiptir ve tür içinde bile kromozom büyüklüğü ve sayısında değişiklikleri görülmektedir. Asya, Avrupa, Afrika suşlarında toplamda haploid genom için 35 Mb büyüklüğünde, 0,3 Mb ile 3 Mb arasında değişen 36 heterolog kromozom tanımlanmıştır (30,31).

2.6. *Leishmaniasis*de Vektörler ve Rezervuarlar

Leishmaniasis'in vektörsüz bulaşması nadir olarak görülmektedir (32). Tatarcık sineklerinin yaklaşık 30 türünün bulaşmada vektör olduğu kanıtlanmıştır. Kırtan fazla türün bulaşmada rol oynadığı tahmin edilmektedir (33).

Tatarcıkların erişkinleri 2-5 mm boyutlarında, vücutları fazla tüylü ve donuk sarımsı renktedir. Erişkinlerin başları vücutları ile yaklaşık 45 derecelik bir açı yapar. Baş vücuda

oranla küçük olup ve bal peteği görünümündeki gözler geniş yer tutar. Antenler ince uzun tesbih gibidir. Tatarcıkların ağız boşluğunun, karın plağındaki ve ayrıca farinks plaklarındaki dişlerin şekil ve sıralarının cinslerin ve de türlerin tanınmasında önemi vardır (34).

Tatarcıkların erkekleri hiç gıda almazlar veya son aldıkları larva gıdasıyla yetinirler. Tatarcıkların dişileri ise kan emerek hayatta kalırlar. Tatarcıklar kısa ömürlüdürler. Erkekleri 4 gün, dişileri ise 12-30 gün kadar yaşamaktadır. Çoğunlukla dişiler yumurtalarının gelişmesi için kan emmeye ihtiyaç duyar. Kan emme sırasında saliva üretirler ve bu işlem esnasında konakçıya injekte ederler. Bu salivanın son zamanlarda peptid yapıda olduğu ve güçlü bir vazodilatör etkiyle beraber konakçıda leishmania'ların gelişimini sağladığı tespit edilmiştir (35).

Ülkemizde Şanlıurfa'da yapılan çalışmalarda 16 kum sineği türü tespit edilmiştir. En sık olarak *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti* ve *Phlebotomus perfiliewi*'ye rastlanmıştır (36).

Mayıs-Ekim ayları arasındaki sıcak dönemde kum sineği türlerinin popülasyonlarının en fazla sayıya ulaştığı ve de soğuk kış aylarında aktif olmadıkları gözlenmiştir (37-39).

Leishmaniasis normalde geniş bir memeli rezervuar yelpazesinde zoonotik bir hastalıktır; fakat özellikle Sudan, Afganistan ve Hindistan'da kentsel çevrelerde ve epidemilerde antroponotik de olabilir (40). Ana rezervuar ise insandır (33).

Tablo 2.1. Leishmania türleri ve major rezervuarları

Leishmania türü	Rezervuarlar
<i>L. major</i>	Kemiriciler
<i>L. tropica</i>	İnsanlar ve Köpekler
<i>L. aethiopica</i>	Yaban fareleri
<i>L. infantum</i>	Köpekler
<i>L. chagasi</i>	Tilkiler, köpekler ve keseli sıçanlar
<i>L. mexicana</i>	Orman kemiricileri
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	Orman kemiricileri
<i>L. braziliensis</i>	Orman kemiricileri
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	Yakalı tembel hayvan
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	Köpekler
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	Yakalı tembel hayvan ve karınca yiyenler

2.7.Leismaniasis'in Klinik Formu

Leismaniasis'in ifade edilmesi hem *leishmania* türüne hemde bu türler üzerinde ifade edilen zimodeme bağlıdır. Böylece bir zimodem VL se neden olabilirken aynı türe ait diğer bir zimodem de KL se neden olabilir (41).

2.7.1. Visseral Leishmaniasis

Leishmaniasis'in bu formu düzensiz ateş, kilo kaybı, karaciğer ,dalağın şişmesi ve anemi ile karakterizedir. Kutanöz formun aksine iç organları etkileyen bu form leishmaniasis formları içerisinde en tehlikeli olanı ve tedavi edilmediği takdirde veya sağaltıma rağmen ölümcül olabilir. VL'de belirtiler arasında ateş, halsizlik, iştahsızlık fagositoz yapan hücreler paraziti fagositoz yapması ile birlikte lenf düğümlerinde görülür. Dalak ve karaciğerde anormal büyüme ortaya çıkar. Ateş şiddetli ve aralıklı olarak seyir edilir. Hastalık ilerledikçe splenomegali karında ağrı ve şişlik görünür, kilo kaybı, hepatosplenomegali, anemi, lökopeni, hipergamaglobulinemi görülen belirtiler arasında yer almaktadır. (Şekil 2.5.)

Bu hastalık Kala-Azar olarak da adlandırılmaktadır. Bunun yanında bazı hastalarda enfeksiyon tamamen asemptomatik seyretmekte ve kendine sınırlayan bir özellik göstermektedir. Enfeksiyon özellikle küçük çocuklarda ve HIV gibi immun yetmezlik yapan bir hastalıkla birlikte görülmesi ilerleyici hastalık oluşumunu etkiler (42- 45).

Post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) ise Afrika ve Hindistan'da VL olgularının tedavisi sonrası, yaklaşık 2 yıllık bir süreçte başlayan ve deri lezyonları olarak görülen, 20 yıl kadar uzun sürelerde devam edebilen bir hastalıktır (46).

İnkubasyon periyodu 3 aydan 8 aya kadar değişebilmektedir. Deride pigmentasyon görülebilir. Tedavinin ardından hasta iyileşebildiği gibi de kronik KL gelişebilir. Ölüm genellikle hastalığın ilerlemesine bağlı olarak sekonder bakteriyel enfeksiyonlardan dolayı gerçekleşmektedir. VL için bazı olgular atipik olarak sunulmuş ve hastalığın akciğerler, plöra, oral mukoza, larinks, özefagus, mide, ince bağırsaklar, deri ve kemik iliğini etkilediği rapor edilmiştir.VL nin doğadaki kaynağını köpekler oluşturmaktadır ve köpeklerde görülen hastalığa Canin Leishmaniasis denmektedir (47,48).



Şekil 2.5. VL olgusunda hepatosplenomegali

2.7.2. Kutanöz Leishmaniasis

KL; promastigotların enjekte edildiği yerde papül olarak başlamakta ve sonrasında, makrofajlar promastigotları fagosite ederek yıkımlamaya çalışmaktadır. Promastigotlar makrofajların içerisinde amastigotlara dönüşerek çoğalır ve yayılır. Diğer fagositlerin de bölgeye gelmesi ile nodül oluşur ve ardından ülserleşir. Genellikle kendiliğinden iyileşebilen bu formun ardından iyileşme bölgelerinde yara izleri kalabilmektedir. Vakaların % 90'dan fazlasının ise iyileşmesi 3-18 ay sürebilmektedir. (41,48,49).

KL in inkübasyon süresi birkaç hafta ile birkaç ay arasında değişebilmektedir. Küçük kuru kabuklu tek bir lezyondan, geniş, derin ve skar bırakarak iyileşen birden fazla lezyona kadar değişen ülserler oluşabilmektedir. Lezyonun özellikleri ise etken *leishmania* türüne göre değişmektedir. *L.tropica* "kuru" kabuklu ,yavaş ilerleyen ve tedavi edilmeyen olgularda bir yıl kalan lezyonlara neden olabilirken, *L.major* ve *L.braziliensis* "ıslak" zemine sahip , geniş ve birkaç ayda iyileşebilen lezyonlara neden olmaktadır (9).(Şekil 2.6.)

KL,Ülkemizin Şanlıurfa bölgesinde hala ciddi bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır.Şanlıurfa da KL hastalarının daha kolay takip edilebilmesi ve tedavileri için tedavi merkezi kurulmuştur.Buna ek olarak bundan öncede hastalara eğitim faaliyetleri

başlatılmıştır.Son yıllarda tedavi merkezi ve belediye arasındaki yakın koordinasyon ile KL sıklığında büyük ölçüde bir azalma görülmüştür (50).



Şekil 2.6. Sağ üst kol lateralında KL lezyonu

2.7.3. Mukokutanöz Leishmaniasis

Güney Amerika'da —Espundia olarak da adlandırılan bu formda etken burun, ağız ve gırtlakta müköz membranlara zarar vererek yüzde bozulmalara neden olur. Bu durum önemli derecede mortaliteye sebep olan güçlüklerle yemeye ve sekonder enfeksiyon riskinin yükselmesine neden olur. İnkubasyon periyodu 1-3 ay arasında olmakla birlikte ilk kutanöz ülserlerin iyileşmesinin ardından yıllar sonrada meydana gelebilir (48,49).

2.7.4. Diffüz Kutanöz Leishmaniasis

DKL Amerikada'da yaygın olmakla birlikte Doğu Afrikada *L. aethiopica* ile meydana gelmektedir. *Leishmaniasis*'in bu formu özellikle yetersiz bir immün yanıtın sonucu olarak görülmektedir. Yeterli immün yanıtın olmaması yüksek oranda parazitin görülmesine ve amastigotların makrofajlar aracılığıyla vücudun farklı bölgelerine yayılmasına neden olarak kutanöz nodüllerin veya plakların oluşmasına sebep olabilmekte ve genellikle tedaviden sonra nüksler görülmektedir (48,49).

DKL ülserleşmeyen bir papül olarak başlayan lezyonun etrafında satellit lezyonları meydana gelir ve bu lezyonlar hastanın tüm yaşamı süresince kalabilmektedir. *L.tropica* sebep olduğu lezyonlar, İran ve Orta Asya’da yaygın olarak görülmektedirler. Çoğunlukla yüzde görünmektedir (9).(Şekil 2.7.)



Şekil 2.7.Yüzde görülen DKL

2.7.5. Kala-azar Sonrası Deri Leismanasisi

VL in iyileşmesinden sonra ortaya çıkabilecek bir formdur. PKDL gelişme aralığı değişkendir. Hastalık Afrika ve Hindistan’da hasta olanların küçük bir yüzdesinde görülmüştür. Deri lezyonları perioral bölgeden vücudun başka bölgelerine yayılmış maküler, makülopapüler veya nodüler tarz şeklindedir (48,49).

2.7.6. Canin Leishmaniasis

Değişken klinik bulguları içeren canin leishmaniasis multisistemik bir hastalıktır. Akdeniz havzasında insanlarda ölümcül VL se neden olan *Leishmania infantum*’un en önde gelen rezervuarını köpekler oluşturur. Enfeksiyon bulaştıktan sonra hastalığın asemptomatik, oligosemptomatik ve semptomatik gibi farklı formları gelişebilmektedir. Seropozitif köpeklerde hastalığa karakteristik vissero-kutanöz semptomlarını gösteren hastaların oranı %40-%50 arasında değişmektedir. Diğer taraftan ise hem semptomatik hem de asemptomatik

olan seropozitif köpekler kumsineklerini enfekte etmektedirler. Hastalığın oluşma süresi parazitin virulansı ve konağın genetik yatkınlığına bağlı olarak birkaç aydan birkaç yıla kadar değişebilmektedir. Sağlıklı köpeklerde deneysel olarak hastalık çalışıldığında köpekte enfeksiyon gelişmeyebilir. Bu ya köpeğin dirençli olduğu veya erken/gizli enfekte olduğu gibi anlamlara gelebilirken aynı zamanda köpeğin hastalığı yenerek seronegatif olduğu anlamına da gelebilir. Enfekte köpeklerin bazıları asemptomatik veya birkaç hafif belirti gösterirler ki bunlar oligosemptomatik olarak adlandırılır. Yıllar geçtikçe kumsineklerinin ısırıklarına daha fazla maruz kalması sebebiyle seropozitif köpeklerde görülen prevalansın yaş ile orantılı olarak yükseldiği bildirilmiştir. Köpeklerde en çok görülen semptomların başında ise dermatitler gelmektedir. Kıl örtüsü ve deride meydana gelen bozukluklar göz, burun, kulak etrafı gibi lokal kalabilirken tüm vücutta da görülebilir. Canin leishmaniasiste oküler lezyonlar, burun kanaması, poliuri, polidipsi, topallık, kusma, ishal ve mukoz membranlarda sarılık gibi klinik semptomlar görülebilmektedir (51-55).

2.8. Leishmaniasis ve Immunolojisi

2.8.1. Patogenez

Leishmania türleri muko-kutanöz ve sistemik ajanlara ve ölümcül hastalıklara neden olan farklı protozoon parazitlerden oluşur (4). Parazite ait faktörler ve konağın savunma mekanizmaları patogenezini direk olarak şekillendirmektedirler. Immünopatogenezde, memeli konağın genetik alt yapısı doğrultusunda meydana getirdiği immün yanıt ile vektörün çevresel ve genetik faktörleri rol alıyor olsa bile; pek çok mikroorganizma ile enfeksiyon sırasında olduğu gibi başlangıç ve anahtar görevi gören elemanlar *Leishmania* türlerinin moleküler determinantlarıdır. Bu determinantlar; enfeksiyon için gerekli invazif determinantlar ve immünopatolojiden sorumlu determinantlar şeklinde ikiye ayrılabilir (56,57).

2.8.1.1. Invazif Determinantlar

Parazit için birincil konak hücre olan makrofajların enfekte edilmesi, fagolizozomlar veya parazitofor vakuollerde başarılı hücre içi yaşamda ihtiyaç duyulan virülans faktörleri ile gerçekleşir. Bunlar arasında; glikozilfosfatidilinositol (GPI), glikozil-fosfolipid (GIPL), lipofosfo-glikan (LPG), fosfoglikan (PG), proteo-fosfoglikanlar (PPG), leishmanolizin (gp63)

ve sistein proteaz (CPs) sayılabilir. Enfeksiyonda gerekli olduğu saptanan bu faktörler immünopatolojide rol oynamadıkları belirtilmektedir.

2.8.1.2. Pato-antijenik Determinantlar

Enfekte hücreden köken almış bazı parazite özgül antijenler, konak immün yanıtı ile olumsuz yönde etkileşerek, immünopatoloji olarak gözlenen klinik semptomlara sebep olduğu düşünülmektedir (56-58).

VL'li hastalarda, enfekte makrofajların konaktaki başka elemanlarla (immün sistem hücreleri gibi) da etkileşime girmesi sonucunda ortaya çıkan bu antijenik epitoplara karşı, çok yüksek miktarda *Leishmania*'ya özgü ancak koruyucu olmayan antikolar saptanmaktadır. Klinik semptomlarada sebep olduğu düşünülen bu antijenlerin immünopatogeneizde rol oynadığı kabul edilmektedir (56).

Bu determinantlar; hücre iskeleti proteinleri (kinesin=rK39, tübülün), şaperonlar, ısı şok proteinleri (HSP 60, 70, 83, LmSti1), ribozomal proteinler (eIF, LiPO, Lip2a, Lip2b) nükleozomlar, histon proteinleri ve glikozomlar (TPI, TSA, LACK, LeIF gibi antijenler) gibi protein komplekslerinin içinde bulunan sitoplazmik olarak özgün epitoplardır (56,57).

Tüm determinantlar leishmaniasis oluşturabilmek için immün sistemin belirli kompartmanları ile etkileşime girerler. İnvazif determinantlar, yani virülan fenotipe indirek olarak katkıda bulunan virülans faktörleri, *Leishmania*'nın immün ve immün olmayan engelleri aşarak intraselüler enfeksiyon oluşturmaya olanak sağlamaktadır. Devam eden kronik süreçte, bazı intraselüler amastigotlar ölür veya lizise uğrar sonrasında amastigotların bir takım sitoplazmik molekülleri (pato-antijenik determinantlar) ortaya saçılır. Bu özgün epitoplara karşı gelişen konak immün yanıtı, *Leishmania*'ya karşı immünite sağlamakta yetersiz kalmasıyla leishmaniasiste gözlenen klinik semptomlara neden olur (56).

Leishmaniasis immünopatogenezi üç ayrı aşamayı içine alan bir etkileşim zinciri olarak da ele alınabilir. Hastalık patogenezinde en çok role sahip olan “parazit-memeli konak ilişkisi ” aşamasıdır (59).

Başlangıçta makrofaj içersine giren promastigot, amastigot formuna dönüştükten sonra hızlı bir çoğalma sürecine girmektedir. Aynı anda konağın doğuştan edinilmiş cevabı ve antijene spesifik immun cevapları (hücresel ,geç tip hipersensitivite) devreye girerek

asemptomatik veya kendiliğinden iyileşen ya da iyileşmeyen bir enfeksiyon olmak üzere değişik görüntülerde klinik tabloları meydana getirmektedir. En uygun şartlarda makrofajların aktive olmasıyla tetiklenen leishmanisidal aktivite, Th1 hücrelerine bağımlı olarak dentirik hücreler (DC), CD4+ T hücreleri ve sentezlenen proinflamatuvar sitokinler (IL-12,IFN- γ ve TNF α) tarafından denetlenmektedirler (60).

2.8.2.Parazit Etkisi ve Bunu Belirleyen Faktörler

Leishmania parazitleri, makrofaj ve DC mekanizmaları, hücre içersindeki mevcut yapıları bozarak öncelikle humoral immün cevabının kaçış yollarını bulmaktadırlar. Makrofaj içersinde gen eksresyonlarını, kinaz ve fosfatazların fonksiyonlarını bozarak makrofaj cevabını ve sitokin sentezini, yüzey moleküllerinin oluşumunu, reaktif, oksijen ürünlerinin salınımını engellemektedirler. DC'lerin göçünü inhibe ettikleri gibi bunların T hücreleri aktive etmesini de engellemektedirler. Özellikle yüzey membran metaloproteazı olan gp63, komplemana bağımlı hücre lizisini engelleyip makrofaj içersinde girmeyi sağlamaktadır. *Leishmania*'da homoloğu bulunan aktive C kinaz reseptörü (LACK) ise baskılıyıcı Th2 CD4+ hücre cevabını oluşturmaktadır. Sonuç olarak amastigotlar makrofaj içersindeki fagolizozomun asidik ortama uyum sağlayarak hayatta kalmayı başarmaktadırlar (60).

2.8.3.Konak Cevabı

Enfeksiyon bölgesinde sıkı bir mücadeleye giren konak, çeşitli hücrelerini (nötrofiller, monositler, NK, makrofajlar, DC) antijeni tanımakta görevli reseptör mekanizmalarını (toll-like reseptör) ve çeşitli eriyik molekülleri (kompleman,IL-1 α ,IL-12 ve TNF α 'i de içeren sitokinler) bulunduğu bölgeye toplar.Anti-leishmanial IgG'nin kronik ve iyileşmeyen hastalarda yüksek oluşu da göz önüne alınarak savunmada işlevsiz olduğu anlaşılmaktadır (20).

2.8.4. İmmün Yanıt

Fare modellerinde çalışmak zahmetsiz olmakla birlikte özellikle hamsterlerdeki *L.donovani* ile oluşan ilerleyici özellikteki enfeksiyon, insanlardaki VL kliniğine çok

benzemektedir. Yapılan çalışmalarda *L.donovani* enfeksiyonu inoküle edildiğinde, ilk hafta amastigotların deride kalıp hücre içerisinde bölündükleri gözlenmiştir.4-6 hafta arasında ise bir granuloma oluşumu dikkat çekmekte iken 8.haftada derideki parazitlerin büyük bir miktarının kaybolduğu gözlenmiştir. Bundan sonra ilk yerleştiği yer karaciğer olup,karaciğerdeki bölünmeyle birlikte sayı artışı çok hızlı olurken, dalağa yerleşenler ise ömür boyu bu organda kalmakta ve ‘‘güvenli bir liman’’görevi gören dalak sayesinde yavaşça gelişimlerine devam etmektedirler (20).

Yapılan çalışmalarda amastigotların 8.haftadan itibaren karaciğer kupffer hücreleri içinde yerleştiği ve hem dalak hemde karaciğerde IFN- γ ve IL-12 üreten hücrelerin sayı bakımından az olduğunda parazitin erken dönem çoğalmasının daha kolay olduğu gözlemlenmiştir. Parazit gelişiminin ilk 4 haftada IL-12 ‘den bağımsız olduğu hem enfeksiyona hassas C57BL/6 farelerde, hemde IL-12 p40 eksikliği olan özel fare suşlarında bu gelişimin benzer olması nedeniyle gösterilmiştir. Çalışmalarda *L.major* enfeksiyonunun da ilk 4-6 haftalık yavaş ilerleyen, IL-12 p40, IFN- γ , CD40 ve iNOS sunan hücrelerin etkileşimiyle gerçekleşmektedir. Enfeksiyonun genellikle gerilime aşamasında karaciğerde görülen granulomlar immun sistemi baskılanmış farelerde ve ilerleyen sistemik tutuluşlu VL olgularında gözlenmemektedir. Karaciğerde granuloma oluşumu için, CD40+, CD80+ hücrelerinin, IFN- γ , IL-12 sentezinin gerekliliği gösterilmiş olup, dolaşımdaki monosit ve TNF- α 'nın granuloma içerisinde parazitin öldürülmesi için şart olduğu gösterilmiştir. Tekrar enfeksiyon alınması durumunda ise artık karaciğer enfeksiyona karşı dirençli olup, hız bir şekilde toplanan CD8+ hücrelerinden meydana gelen granulomalar enfeksiyonu ortadan kaldırılmasına yardımcı olmaktadır.CD8 hücrelerinin tam anlamıyla uzun dönem immun belleğin korunmasında ve *Leishmania* enfeksiyonlarında temel rolü oynadığı gözlenmiştir (20).

Dalakta parazit geç dönemde ortaya çıkıp, yavaş yavaş bölündükleri için yaşamları boyunca oradaki kalabilmektedirler. BALB/c farelerde *L.donovani* enfeksiyonu sırasında IL-14 bulunmadığı durumlarda IL-10, IL-12, IFN- γ ve TGF- β nın mevcut olması birlikte gözlemlenmiştir. Özellikle IFN- γ 'a cevap vererek NO sentezi gerçekleştiren hücrelerin dalakta bulunmaması, parazitin buradaki uzun süreli varlığını açıklayabilmektedir. Akut VL olgularının kanlarında yükselmiş IL-10 sentezi yanında IL-14, IL-13 ve IgE seviyelerinde yükseldiği gözlenmektedir (61).

2.8.4.1.Humoral İmmun Yanıt

Leishmaniasis enfeksiyonları, hasta serumunda anti-leishmania antikorlarının bulunması ile karakterize edilmiştir. KL'de aktif lezyon döneminde antikor titreleri genellikle çok düşük olarak bildirilmekle beraber bazı çalışmalarda antikor izlenimlerinin *L.braziliensis* enfeksiyonlarında tanı ve prognoz takibinde hayati öneme sahip olduğu bilinmektedir. Ancak VL olgularında bu antikor seviyeleri tipik olarak çok yüksek olarak saptanmıştır (62).

VL'de Th1 kökenli IFN- γ 'nın IgG1 ve IgG3 izotiplerini, Th2 kökenli IL-4 ve IL-5'in ise IgG4'ü düzenlediği varsayılmakta , bu antikorların korunma ve patogenezdaki rolleri tam olarak bilinmemektedir (23).

Son çalışmalarda IgG'nin enfeksiyondan koruma etkisi olmadığı gibi, enfeksiyonun ilerlemesine sebep olan faktörlerden meydana geldiği saptanmıştır. BALB/c farelere sonradan IgG eklenmesinin hem daha büyük lezyonlara hemde daha fazla miktarda IL-10 sentezine neden olduğu bildirilmektedir. Artan antikor titreleri son yıllarda DAT, ELİSA, dot-ELİSA, immunoblot, hızlı strip test, İFAT, İHA gibi spesifik serodiagnostik yöntemlerle tespit edilerek tanı koyma isteğiyle kullanılmaktadır. Ancak Leishmaniasis tanısı hala mevcut zorluğunun sürdürmektedir (63).

2.8.4.2.Hücrel İmmun Yanıt

KL'de konağın derisinde bulunan DC'ler *Leishmania* parazitlerini fagosite ederek doğuştan sahip olunan immunityle sonradan edinilen immunité arasında ilk bağlantı görevini gerçekleştirmektedirler.

Fagositozu gerçekleştiren DC'lerin yüzeyinde bulunan class I ve class II major histocompatibilite (MHC) moleküllerinin oluşmasıyla ,CD40 CD54, CD60 ve CD86 gibi yardımcı moleküllerinin yüzeye çıkması ve IL-12 p40 sentezi ile enfekte DC'leri deriden en yakındaki lenf nodlarına transfer edilip burada T hücrelerine antijeni sunması gerçekleşmektedir (64).

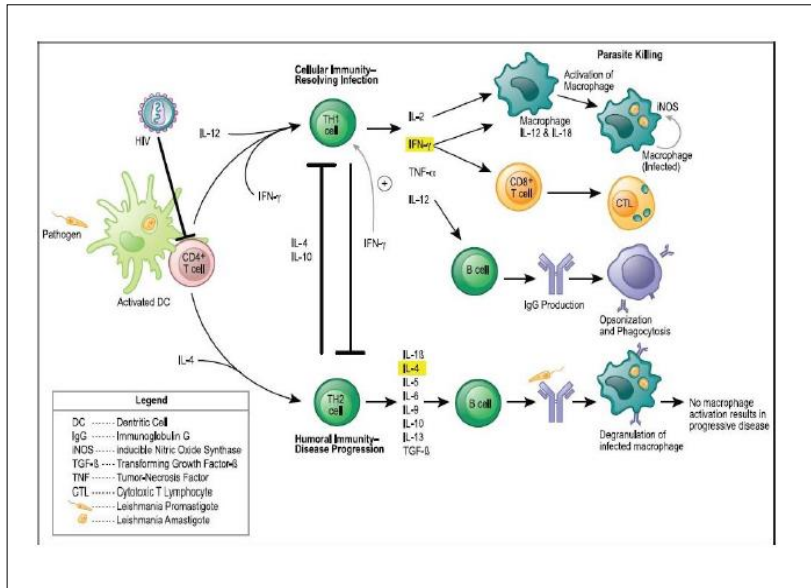
Yapılan fare çalışmalarında DC'lerin lenf noduna geçişinde CCR2 ve CCR7 moleküllerinin sunumuyla ilgili olduğu gözlemlenmiştir. Genetik olarak bu moleküllerden yoksun olan fareler için bu göçün gerçekleşmemiş olduğu gözlemlenmiştir (65).

VL'de farklı kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin Th1 cevap oluşumunu etkilediği gözlemlenmiştir. Özellikle CCR5 ve MIP-1 α 'nın eksikliğinin enfeksiyonun erken

fazındaki IFN- γ cevabını azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak bu yanıtın enfeksiyonun kronikleşmesiyle düzeldiği görülmüştür. *Leishmania* ile konağın enfekte olması sonucunda karaciğerde hızlı bir CCL2, MIP-1 α ve CXCL10 birikmesi olduğu gözlenmiştir. Enfeksiyon sonrasında da yüksek yoğunlukta da varlığını devam ettiren CXCL10'un karaciğere Th1 hücre toplanmasını tetiklediği ve buna karşılık dalaktaki CCL2 yoğunluğunun ise Th2 sitokinlerinin sentezini yükselterek bu bölgede parazitin yaşamını devam etmesine sebep olduğu gözlemlenmiştir (65).

Th1, Th2 hücre gelişiminde rol oynayan immunolojik faktörler ile ilgili özellikle fare modellerinde yapılan çalışmalar, insan ve hayvan leishmaniasis olgularında parazitlerle konak arasındaki etkileşimi ortaya çıkarmada yardımcı olmaktadır. Enfekte olmuş kişilerin lenfositlerine bakıldığında belirgin bir IFN- γ ve çok zayıf bir IL-4 varlığı öncelik göstermektedir. Benzer şekilde ağır enfeksiyon da IL-4 sentezi öne çıkmaktadır. VL ve KL' de iyileşme görüldüğünde, biopsi örneklerinde IL-10, IL-12 ve IFN- γ seviyelerinin yükselmiş olduğu gözlenmektedir. Yapılmış olan çalışmalarda sitokin sentezinin tek bir hücre ile belirginleşmesinden çok, hem Th1 hemde Th2 hücrelerden sentezlenen sitokinlerin mevcudiyeti dikkat çekmektedir.

İnsan çalışmalarıyla kıyaslandığında, özellikle fare modellerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiş olan bilgilerin, leishmaniasisten korunma uğraşlarına ışık tutacağı düşünülmektedir (42). (Şekil 2.8.)



Şekil 2.8. İmmun yanıt

2.8.5.Parazit-Memeli Konak İlişkisi ve İmmünopatogenez

2.8.5.1. Doğal İmmün Yanıtın Aşılması

İnoküle edilmiş promastigotun ilk hedefi makrofajlardır. Metasiklik promastigot, makrofajdaki C reseptörü 1-3, mannoz fukoz reseptörü ve Fc reseptörünü kullanarak tutunmayı gerçekleştirir . Anti-leishmanial antikolar ve C reseptörü parazitin yüzeyinde birikmeye başlar. Bu noktada parazitin yüzeyinde bulunan LPG ve gp63 çok önemli rol oynar (59,67-70).

C3 molekülü aktif litik formu olan C3b ile LPG ve gp63'ün yüzeyine tutunur ve C aktivasyonu yapar. *Leishmania*'lar C3b ile opsonize olmalarıyla CR1-3'ü kullanarak reseptöre bağlı endositozla makrofaj içine girer. Ancak yüzeylerinde dahil olmuş kalın LPG ve gp63, parazitleri C5-9 litik kompleks etkisinden korur (67,68).

Benzer biçimde IgM'ye bağlı immüno aderans mekanizmalarıda, C bağlı lizis gelişmeden çok önce Fc reseptörü yolu ile fagositoza olanak sağlamaktadır. Burada dikkat çeken bir başka nokta ise çok az sayıda parazitin makrofajlarda olmasıdır. Bir çok mikroorganizma için sorun olacak bu durum *Leishmania*'lar için avantaj olarak kullanılmaktadır, çünkü görmezden gelmek“ignorance” tetiklemek yolu ile de doğal bağışıklığın ilk basamaklarında konağa üstün gelebilmektedirler. Chang ve McGwire'in ortaya koyduğu şekilde, LPG ve gp63 invazyon sonrası aşağıya regüle edilmektedir ki bu regülasyon da parazitin hedeflediği gözden kaçmış ve düşük immünojenite olgularını desteklemektedir. Promastigotların fagositozunu takiben, tutunma ve bağlanmada önemli rol oynayan parazit olguları ve virülans faktörleri tekrardan devreye girer. Hücre içi öldürme ve degradatif makrofaj yollarıyla interfere olarak parazitin zarar görmeden makrofaj içerisinde yaşamasını ve çoğalmasını sağlarlar (68,69).

LPG molekülünün fonksiyonları şu şekilde özetlenebilir:

1. Adezyon moleküllerini (ICAM ve VCAM) ve de makrofaj kemotaktik protein-1'i (MCP-1) inhibe etmesiyle makrofaj göçünü engeller.
2. Oksijen radikalleri ile NO ve NOS2 inhibisyonu ve protein kinaz C (PKC) sinyal yolunun inhibisyonu yoluyla oksidatif yıkımı engeller (67,69).
3. Fagozom-endozom füzyonunu geciktirilebilmektedir. gp63'ün fonksiyonları ise şöyledir:

a.) Makrofaj içi oksidatif yıkım inhibisyonu yapar.

b.) Proteaz aktivitesiyle lizozomal sitoliz ve degradasyondan korunmayı sağlar.

Bu etkilere, tükrüğün makrofaj anti-leishmanial aktivite baskılama etkisi ve vazodilatasyon etkisi eklendiğinde, parazit promastigotta, dirençli olan amastigot formuna dönüşecek zaman sağlanır (immün yanıt oluşumunu erteleyerek ve geçici olarak baskılayarak zaman kazanır) ve yeterli derecede çoğalarak esas olan hedefe yani yeni hücreleri enfekte edecek kapasiteye ulaşır. Bu kapasite sağlandıktan sonra fagozom-sekonder lizozom füzyonu gerçekleşir ve parazitofor koful oluşur. Bunun ardından makrofajlar parazit tarafından lizise uğratılır. Enfeksiyon bölgesine gelen başka mononükleer fagositler ve antijen sunan hücre (ASH) kapasitesine sahip hücreler özellikle DH ikincil enfeksiyon hedefi haline gelir (68)

2.8.5.2. Adaptif İmmün Yanıtın Aşılması

Kutanöz lezyonlarla seyreden, tedavisiz bile %95 oranında kendiliğinden iyileşebilen KL etkeni *L.major* ile tedavisiz %95 ölümlü sonuçlanan ve visseral özellik gösteren VL etkeni *L.donovani*'nin patogenezi, hayvan (özellikle fare) modelleri üzerinde yapılan çalışmalar sayesinde bugünkü konumuna ulaşmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar iki etkenin de her iki tipte hastalık oluşturabileceğini gösterebilir düzeye sahiptir. *Leishmania* enfeksiyonunun gidişi, koruyucu hücrel immün yanıt ile patoloji meydana getiren ve hastalığı artıran immün yanıt arasındaki kompleks etkileşimler sonucunda belli olmaktadır. Farelerin *L.major* ile enfeksiyonları, hastalık patogenezinin aydınlatılması açısından önemli olmanın yanı sıra, immün yanıt fonksiyonlarının anlaşılmasını da sağlayan çok önemli ve kullanışlı bir modeldir. Bazı fareler (C7BL-6), *L.major* ile enfekte edildikten bir süre sonra kutanöz lezyonlar geliştirirler ve hastalığı bölgesel lenf nodlarında sınırlandırmaktadırlar. Bu hayvanlar insandaki KL'ye model olarak kullanılmaktadır. Enfeksiyonu kontrol edemeyen ve sistemik hale getiren fareler (BALB/C) ise, insandaki VL ya da DKL immünopatogenezi için model oluşturur (68,69).

Leishmania enfeksiyonlarına direnç ya da duyarlılıktan sorumlu olan immünolojik patikaların ortaya çıkarılması, immün sistemin Th1/Th2 dengesine bağlı olan, hücrel-hümmoral polarizasyon ayrıcalığını ortaya koymuştur. Th1/Th2 dengesi, patojenin tipine ve virülans faktörlerine, ASH'lerin "naive" T hücreleri ile etkileşimlerine ve salgılanan sitokinlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Th1/Th2 dengesinin Th2 yönüne kayması veya

Th1 yanıtının baskılanması leishmaniasisten sorumlu olarak düşünölmektedir. Adaptif immün yanıtın *L.major* ve *L.donovani* tarafından modölyasyonu ve hastalık gidişine ait bilgiler deneysel hayvan modellerinden gelmektedir (68,69).

2.9. Leishmaniasis'in Tanı Yöntemleri

Leishmaniasis tanısında farklı yöntemler kullanılmaktadır.

2.9.1. Direkt Tanı

Kan ve kemik iliği Giemsa ve Romanovski boyası ile boyandığında amastigotlar saptanabilir. Bu materyal Novy, Nicolle, Mac Neal (NNN) besiyerine ekilerek ya da sincap, hamster veya köpeğe verilerek parazitin üretilmesiylede hastalık tanımlanabilir. Kültürde 10-20 günde, teşhis için kullanılan hamsterdan haftalar sonra sonuç alınır (6,71-75).

2.9.2. İndirekt Tanı

Yüksek hassasiyet ve özgüllükte olan serolojik testlerdir. Bu yöntemlerdeki hedef akut fazda artan antiparaziter antikorların titrelerini tayin ederek tanıya yardımcı olabilmektir.

2.9.2.1. ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde kullanılacak olan antijenin iyi hazırlanıp hazırlanmadığına bağlı olduğu bildirilmiştir. Promastigot ve amastigotlardan elde edilen eriyik antijenlerden başka son yıllarda daha spesifik olan rekombinant leishmanial antijenler kullanılmaktadır. Son yıllarda hızlı ve pratik olmaları sebebiyle tanıda serolojik testlerin öneminin arttığı gözlenmiştir (71-73, 76-79).

2.9.2.2. IFA

İmmunolojik tanı teknikleri mevcut parazit hastalıklarının tanısında yaklaşık 40 yıl önce kullanılmaya başlanmıştır (80).

2.9.2.2.1. Doğrudan Floresan Antikor Tekniği (DFAT)

Bu metodun uygulanmasında, bütün özel antikorların işaretli olması şartı kullanım alanının oldukça sınırlı olmasına neden olmuştur.İndirekt immunofloresan tekniğine göre daha az duyarlı olduğu gözlemlenmiştir (80).

2.9.2.2.2. İndirekt Floresan Antikor Tekniği (IFAT)

Çalışma prensibi, farklı oranlarda sulandırılmış şüpheli serumların daha önceden lamalar üzerine tespit edilen parazitin kendisinin veya kesitlerinin üzerine konup, inkübasyon ve yıkama işleminden sonra antijen-antikor tepkimesinin meydana gelip gelmediğine, test edilen serumlar içinde antijene karşı oluşmuş antikorların bulunup bulunmadığı floresan izotiosiyanat ile işaretli spesifik antiantikorlar (anti-globin) yardımıyla gösterilmesine dayandırılmaktadır. Spesifik antikorlar floresan veren bir madde olan floresan izotiosiyanat yardımıyla görülür hale getirilebilmektedir.Spesifik olmayan floresan veya yeşil ışığı örtmek için Evans blue gibi zıt boyama yöntemlerinden faydalanılmaktadır (80).

Sonuçlar floresan mikroskobunda değerlendirilmektedir. Bu metot ile yüzey antijenleri değerlendirilebildiği gibi, parazit içindeki antijenler de değerlendirilebilmektedir. IFA tekniği bütün gruplardaki özel immunoglobulinlerin (IgG, IgM, vb.) ortaya çıkarılması için faydalanılabilmektedir. IFA tekniğinin farklı avantajlarının ortaya çıkması, pratik olarak serolojik tanı konusunda parazit immunolojisinde gelişmelerin olmasını sağlamış ve bu testin birçok uygulama için kaynak olduğu bildirilmektedir (80).

2.9.2.3. Western Blotting

Bu test leishmaniasis tanısından çok araştırma amacıyla kullanılır. Testin IFAT ve ELISA'ya göre daha duyarlı olduğu kabul edilmiştir. 14-16 kDa moleköl ağırlığındaki antijenlerin leishmaniasisin tanısında önem taşıdığı bildirilmiştir (81).

2.9.2.4. Direkt Aglutinasyon Testi (DAT)

Hem insanlarda hem de köpeklerde VL tanısında kullanılan bir serolojik yöntemdir. Ayrıca bu test, özel bir konjugeye gereksinim göstermemesi, antijenin uzun süre ve kolay bir şekilde saklanabilmesi, insan ve bütün hayvanların serumlarıyla çalışma olanağı verebilmesi nbu testi oldukça ekonomik ve kolay bir yöntem kılmıştır. Test prensip olarak, serum örneğindeki antikoların promastigotları aglutine etmesi esasına dayanmaktadır (22).

2.9.2.5. İmmunokromatografik Testler (Hızlı Tanı Testleri)

İmmunokomatografik testler diğer ismiyle yandan akımlı testler (lateral flow test) olan hızlı tanı testlerinin (HTT) kullanımı başka alanlarda olduğu gibi parazitolojide de yaygınlaşmaktadır. rK39 hızlı tanı testi (rK39 dipstick) ile çok kısa sürede güvenilir sonuçlar sağlamaktadır (22).

2.9.3. Moleküler Biyolojik Yöntemler

Leishmania parazitlerinin tanısı, tiplendirilmesi, serolojik tetkikler için ilgili antijenlerin geliştirilmesi ve hastalarda hücresele immun yanıtın araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (72,73,6).

2.9.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Leishmania'ların tanısında ribozomal RNA (rRNA) gibi hedefler artırılmış olmasına rağmen kinetoplast DNA'sı (kDNA), mevcut her hücrede birçok kopya içermesi nedeniyle,

tercih edilen sekans olduğu bildirilmiştir. PZR metodu, özellikle parazit sayısının oldukça az görülen kronik hastalarda deri leishmaniasis tanısında değerli olduğu bildirilmiştir (82).

2.10.Leishmaniasis'in Tedavisi

Leishmaniasis tedavisinde birincil ve ikincil derecede seçilen ilaçlar, semptomatik ve destek tedaviler olarak ayrı tutulabilir.Tedavide birincil ilaçlarda kullanılan ve ilk tercih edilen ilaç, beş değerlikli antimon bileşikleridir. Bunun dışında pentamidin, dirençli olgularda alternatif bir seçenek olarak düşünülse de, yüksek toksisitesi sebebiyle pek tercih edilmemektedir (24).

VL'de 1990 yılına kadar antimon bileşiklerine tek eş değerlikde pentamidin gösterilmesine karşın, günümüzde de pentamin dışında, Amfoterisin B, lipid ile birleştirilmiş Amfotericin B (Amfoterisin B kolesterol dispersiyon, Amfotericin B lipidden oluşan veya liposomal amfotericin B), Aminosidin, Interferon- γ ve Sodyum stiboglukonat ile immunokemoterapi kombinasyonu ve Miltefosin ile oral kemoterapi alternatifleri olarak sunulmaktadır (83).

VL tedavisinde kullanılan 5 değerli antimonlu bileşikler 100 mg antimon (Sb)/ml içeren Na stibogluconate ve 85 mg Sb/ml içeren meglubin antimonata benzer etki ve toksisiteye sahiptir. İlaç IM olarak veya küçük bir iğne kullanılarak damardan verilir. 50-100 ml, % 5'lik dekstroz içinde 20 dakikadan da fazla sürede infüzyon şeklinde de verilebilir. Tedaviye 21 gün devam edilir. Tedavinin sonuna doğru halsizlik, iştahsızlık, bulantı, kusma ve kas ağrıları görülebilmektedir. Toksik etkiler gelişince bir gün dinlenmeden sonra her dozu 2 mg/Sb/kg azaltılarak tedaviye devam edilir. Karaciğer ve pankreas enzim seviyeleri yükselebilir, diğer bir yandan hemoglobin seviyeside düşebilir.Ancak tedavi durdurulduğunda bütün değerlerin normale döndüğü bildirilmiştir (84,85).

KL tedavisinde, leishmania türü, leishmaniasisin kliniği, lezyonun yeri, sayısı, siddeti ve kişinin immun durumuna bağlı olarak, sistemik ilaç tedavisi, intralezyonel tedavi, topikal tedavi veya fiziksel metolardan herhangi biri ya da birkaçı birlikte uygulanmalıdır (86).

KL de hastalık eğer erken tespit edilirse tamamen iyileşme olasılığı artar.Bu yüzden hastalık profilaksisi son derece önemlidir (87).

Basit KL tedavisizde iyileşebilir ve kişide o türe karşı immünite gelişir. Bu yüzden Güney-Batı Asya'nın birçok bölgesinde bebeklerin kalçalarında bilerek enfeksiyonun meydana gelmesi sağlanmakta ve dolayısıyla daha sonraki olası enfeksiyonlara karşı bağışıklık kolaylıkla edinilmektedir. Çocuk multipl lezyonlardan ve yüzde gelişecek şekilsiz skarlardan korunmuş olucaktır. Bu immünite gelişimi daha çok *L.tropica* ve *L.major* 'un sebep olduğu kutanöz leishmaniasiste koruyucudur ve tedavi edilmeksizin kendiliğinde iyileşme aşaması gerçekleşebilmektedir. Bu yüzden bu türlerin enfeksiyonlarında ilaç kullanılmaya gerek duyulmadan özellikle endemik bölgelerde takibi yeterli olabilmektedir. İyileşmenin bir yıl ya da daha fazla süre alabilmesi nedeniyle özellikle endemik bölgelerde iyileşme süresinin azaltılması için lezyonun tedavi süreci sağlanmalıdır. *L. mexicana* ve *L.braziliensis*'in neden olduğu KL daha uzun sürer ve ciddi bir durum içerir. *L. braziliensis* türü mukokütanöz hastalığına neden olduğu için bu türün tespit edilen hastalarında sistemik tedavi başlanması tavsiye edilmektedir (88-91).

Tedaviye dirençli olan *L. aethiopica*'nın sebep olduğu leishmaniasis tabloları haricindeki tüm *Leishmania* enfeksiyonları için ilk olarak beş değerli antimon bileşiklerinin kullanımı tavsiye edilmiştir. Leishmaniasisin diğer türleri, sodyum stiboglukonat (Pentostam®) veya meglumine antimonat (Glucantime®) gibi beş değerli antimon bileşikleriyle uzun süreli günlük enjeksiyonlar şeklinde kullanılarak tedavi edilirler. Antimonun ilk KL tedavisinde kullanımı 1913 yılında Viyana'da Tartar emetik ile gerçekleştirilmiştir. 1937 yılında pentavalan tartar emetikten daha az toksik içerikli olan Salustibosan kullanılmıştır. Pentostam ve Glucantime savaş yıllarında İngiltere ve Fransa'da Salustibosan yerine geliştirilmiştir. Halen *Leishmania*'ya karşı daha etkili ve daha az toksik başka bir ilaç geliştirilememiş olup Dünya Sağlık Örgütü tarafından Pentostam ve Glucantime halen mevcut ilk ilaç olarak önerilmektedir. Antimon kullanılırken elektrokardiografi (EKG) farklılıkları, karaciğer, aritmi, böbrek fonksiyonları ve akut böbrek yetmezliği bakımından hastalar iyi takip edilmelidir (92-95).

KL de tedaviye başlanılmadan önce yaranın ikincil bakteri ile enfekte olup olmadığı saptanmalıdır. Eğer varsa antimon bileşiklerine ek olarak antibiyotik ve antifungal ilaçların da tedaviye eklenmesi gerekmektedir. Kullanılan ilaçlar lezyon içine enjeksiyon yapmaya uygun değilse veya fazla sayıda lezyon varsa kas içine uygulanması tercih edilir (12,88).

Diğer bir grup ilaç ise katekonazol, amfoterisin-B, allopurinol, pentamidin'dir. Ancak bu ilaçlar güçlü toksisiteyi yüzünden diğer tedavilerden cevap alınamayan vakalarda kullanılmaktadır.

Ayrıca tüm bu kullanılabilir ilaçların dışında hastanın tedavi esnasında sağlıklı ve iyi beslenmesine özen gösterilmeli, tedaviye ek olarak demir ve vitamin preparatlarında dahil edilmesi önerilmektedir (96).

2.11. *Leishmania*'nın Sağlık Açısından Önemi

Diğer sokucu Diptelerde olduğu gibi tatarcıklar soktukları yerde güçlü bir kaşıntı ve sonrasında ateşli, yangılı ve alerjik, "harara" denen küçük geçici lezyonlar bırakırlar (97,98). Tatarcıklar, verdikleri bu rahatsızlıktan başka, oluşan lezyonlara enfeksiyon bulaşmasıyla Leismaniasis dışında, ikincil derecede hastalıklara da neden olabilirler (99).

Tatarcıkların sokmasıyla insan veya hayvanlara *Leishmania* türleri dışında, bazı hastalıklara neden olabilen virüs ve bakteriler de taşınmaktadır (100).

Tatarcıklarla taşınan virüsler insanlarda, yangılı ve ateşli tatarcık humması denen hastalıklara yol açar. Tatarcık ateşi veya diğer adıyla Papatasi Ateşi (üçgün ateşi) insanlarda 2-4 gün veya bazen daha uzun sürebilir. Bu hastalık Akdeniz bölgesi, Ortadoğu, Amerika ve Afrika'da özellikle yaz aylarında oldukça yaygındır. Akdeniz bölgesinde yaşayan insanların çoğunun, çocukluğunda bu hastalığı geçirdikleri düşünülmektedir (100).

P.papatasi Asya, Avrupa, Afrika da tatarcık ateşini bulaştıran önemli vektörlerden biridir. Tatarcık ateşinin doğal enfeksiyon oranı %0,015- %0,5 arasında değişmektedir. Bu hastalığa neden olan virüslerin doğal omurgalı rezervuar kaynaklarının olmadığı bilinmesine karşın, bazen epidemiyeye neden olabilecek kadar yayılabileceği bildirilmiş, virüsün tatarcıklarda, nesilden nesile genetiksel olarak aktarımı sağlandığı kanısına varılmıştır (100).

Tatarcıklar, phlebovirüs denen virüsleri de bulaştırmaktadırlar. Akdeniz bölgesinde *P.perniciosus*'un Toscana virüsünü bulaştırdığı, Amerikada ise *Lutzomyia trapidoi*, Chagres ve Toro virüslerini bulaştırdıkları bildirilmiştir. Yaklaşık olarak 11 adet Vesicularvirus tatarcıklardan izole edilerek ve yaşam siklusları belirlenmiştir. Ayrıca Vesicular stomatitis denen virütik hastalık bilinmekte olup, insanlarda ensefalitiye neden olabilen altı farklı virüs çeşiti izole edilmiştir (100).

Tatarcıklarla bulaşan *Bartonella bacilliformis* bakterisinininenden olduğu Oroya fever (Verruga peruana) hastalığına,Peru,Kolombiya ve Ekvator'da rastlanmıştır. Bu hastalığın bulunduğu köyler genellikle deniz seviyesinden 750-27000 m arasında yüksekliklerde bulunur.Büyük olasılıkla ekolojik koşullar ve yükselti bu hastalığın sınırlarını belirlemektedir.Bakterinin yaşam döngüsü tamamen bilinmemekle beraber,bazı memelileri rezervuar kaynağı olarak kullandığı ve insanlara mekanik yollarla bulaşabileceği düşünülmektedir (100).

Leishmaniasis ,*Leishmania* parazitlerinden bulaşan hastalıklara verilen genel bir isimdir. Daha öncelerden kala-azar ve şark çıbanı olarak bilinmesine karşın,ilk vaka 1898 de Borowsky tarafından Taşkent'teki Rusya askerlerinde tanımı konmuştur. Birkaç yıl sonra Nicolle ve Comte 1908'de Tunus'taki bir köpekte kala-azar vakasını gözlemlemiştir (88).Daha sonraları Lafont (1915) kala-azar ve köpek leishmaniasisi hasta kayıtlarının tanımlanmaya başladığını bildirmiştir.Lombard and Quilichini (1912), kala-azar hastalarının olduğu evlerde kediler üzerinde yaptığı deneylerde ,kedilerde de kalazarın varlığını ortaya çıkarmıştır. Acton (1911),ilk kez tatarcıkların içinde leptomonas formunun oluştuğunu bulmuştur.Aynı yılda Sergent ve arkadaşları ilginç bir çalışma sonucunda , şark çıbanının fazla olduğu Biskra bölgesinde topladıkları *P. papatasi*'leri , bazı işlemlerden geçirerek bir insanın derisine enjekte etmişler , yaklaşık 2 ay sonra enjekte ettikleri yerde şark çıbanının meydana geldiğini gözlemlemiştirler.Bu çalışmaların neticesinde *Leishmania tropica* bulunmuştur.Daha sonraları farklı araştırmacılar tarafından aynı metod kullanılarak farklı hayvanlarda deneysel olarak şark çıbanı lezyonları oluşturulmuştur (101).Adler ve Theodor(1925) Asya Bölgesinde ,yakalayabildikleri *P.papatasi*'lerde ilk kez bir leptomonas bulmuşlar ve bu leptomonasın şark çıbanına sebep olduğunu ortaya koymuşlardır.Aynı araştırmacılar tarafından 1926 yılında *Leishmania tropica*'nın *P.papatasi* içinde geliştiği,Short ve Barraud, aynı yıl, *Leishmania donova* ' nin *P.argentipes* içinde geliştiği gösterilmiştir.10 yıla takiben yapılan araştırmalarda şark çıbanı ile tatarcıklar arasında bir ilişkinin varlığı kanıtlanarak ,hastalığın bulaşmasında tatarcıkların rol oynadığı ortaya konmuştur (101).Adler and Theodor (1929) şark çıbanının *P.papatasi*'nin ısırmasıyla bulaştığını yaptıkları deneyle kanıtlamışlar ve aynı zamanda *P.sergenti*'de *Leishmania tropica* 'nın mevcudiyetini keşfetmişlerdir.Patton ve Hindle (1927) Kuzey Çin'de ,*P.major* 'un *P. sergenti*'den daha iyi bir vektör olabileceğini yaptığı disseksiyon çalışmalarıyla kanıtlanmıştır (101).

Son zamanlarda *Leishmania* türlerine ait olan farklı suşlar çalışılmaktadır. Bu suşların enfektif özellikleri birbirinden farklı içerikte olduğu gözlemlenmiştir (102). Özellikle gelişen teknoloji sayesinde PCR ve ELISA testlerinin kullanımıyla, *Leishmania* ve tatarcıklar arasındaki ilişki ayrıntıları ile ortaya konulmuştur (103). Direkt mikroskop altında incelenen tatarcıklara ait enfektif oranı ile ELISA testi kullanılarak tespit edilen oranın birbirine çok yakın değerlerin çıkması, ELISA testinin tatarcıkların enfekte olup olmadıkları ve hangi paraziti taşıdıkları bilgisini elde edebileceğimizi gösterir (104).

Leishmaniasis'in Amerika, Asya, Afrika ve Akdeniz bölgesinde yer alan yaklaşık 88 ülkede yaygın olarak görülen bir rahatsızlık olduğu bilinmektedir (105). Hastalık Kuzey ve Batı Afrika, Akdenizin kıyı bölgelerinde, Ortadoğu'dan Hindistan'a kadar olan bölgede, Asya ve Güney Afrika'nın bazı bölgelerinde kurak ve yarı kurak alarında daha çok görülürken, Amerika da daha çok Meksika'dan Kuzey Arjantin'e kadar olan bölgenin ormanlık alanlarında yaygındır.

İnsanlarda farklı *Leishmania* parazitleri deri enfeksiyonlarına sebep olabilmektedir. Genel olarak deri enfeksiyonuna neden olan *L.major*, *L.tropica* ve *L.aethiopica* eski dünya parazitleri, *L.braziliensis*, *L.guyanensis*, *L. Panamensis* ve *L.mexicana* ise yeni dünya parazitleri olarak bilinmektedir (86).

Ülkemizde Deri Leishmaniasis'i *L. major*'un neden olduğu yaş tipinden ziyade *L.tropica*'nın neden olduğu antroponotik şeklindeki kuru tip lezyonlar şeklindedir. Güneydoğu Anadolu bölgesi başta olmak üzere ülkemizdeki yaygınlığı 1950 yılından önce oldukça yüksektir (106). Daha sonra yapılan sıtma mücadelesinin tatarcıkları da etkilemesi ile hastalık oranında bir azalma görülmüş, fakat, son 10 yıl içinde hastalık insidansında yükselmeler kaydedilmiştir (107-111).

Şanlıurfa'da şark çıbanı üzerinde yapılan bir araştırmada, bu hastalığın her on kişiden birini etkilediği gözlenmiş, kötü olan çevre koşulları, evin yerleşim özellikleri, hayvan barınakları ve evde yaşayan birey sayısı ile hastalığın oluşumu arasındaki ilişkinin, anlamlı olduğu bulunmuştur (105,111).

Visseral Leishmaniasis, *L.infantum* ve *L.donovani*'nin neden olduğu; dalak, kemik iliği ve karaciğere kadar ulaşabilen ve tedavi edilmediğinde öldürücü etkisi olan bir hastalık olup, dünyanın hemen her yerinde, özellikle tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak görülen hastalıktır. Visseral leishmaniasis'e Kuzey Afrika, Avrupa, Akdeniz kıyı boyu

ülkeleri,Batı Asya ve Çin’de yaygın,Orta ve Güney Amerika’da ise sporadik vakalar halinde rastlanılmaktadır.Tatarcıkların ısırmasıyla,insana ,köpeklere ve kedilere bulaşabilen bu hastalığın çok sık görülmeside kan transfüzyonu ile insandan insana da geçebildiği bildirilmiştir (112) .

Ülkemizde Visseral Leishmaniasis’e Ege ve Akdeniz bölgesinde yaygın bir şekilde , diğer bölgelerde nadir olarak rastlanmaktadır.Ülkemizde bu hastalığa *L.infantum*’un sebep olduğu gözlemlenmiştir. Lakin hangi tatarcık türüyle bulaştığı kesinlik kazanamamıştır (112).

2.12.Leishmania ile Mücadele ve Kontrol

Vektör canlılarla mücadele amaçlı yapılan çalışmalar , ergin ve larva mücadelesinin eş güdümlü yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur (113). Özellikle sivrisineklerde ergin ve larva habitatu tamamen aynı olmadığı için ve larvalar sucul habitatlarda geliştiklerinden dolayı,larva mücadelesinde başarı elde edilir.Tatarcıkların larva habitatları dağınık ve çok belirgin olmadığı için olası larva habitatlarında kimyasal bir mücadele yapılabilir (114).

Tatarcıkların insanlara sokmasını engelleme yollarından olan bireysel korunma oldukça önemlidir.Uzun zamandır halk arasında kullanılan cibinlikler, korunma açısından oldukça faydalı bir uygulamadır.Pencere ve kapıların sinek teli veya tüylerle örtülmesi korunma açısından farkındalık sağlar.

Son zamanlarda insektisit emdirilen cibinlik uygulaması sonucu, tatarcıkların insanları sokma aktivesinde ve vektörlüğünü yaptığı parazitlerle bulaşan hastalıkların insidansında bir düşüş gözlenmiştir. Suriye’de yapılan bir çalışmada ,Pyrethroid emredilmiş cibinliklerin kullanımının ,şark çıbanı vakalarının %50 dolayında düşmesinde kolaylık sağladığı ve leishmaniasis kontrolünde alternatif bir kontrol yaklaşımı olduğu bildirilmiştir (115).

İtalya’da Deltamethrin emredilmiş köpek tasmalarının kullanılmasıyla ,köpek leishmaniasisi insidansında önemli derecede azalma meydana geldiği bildirilmiştir(116).

Çalışma alanımız olan Şanlıurfa şehir merkezi ve kırsal alanlarda K-OTAB (deltametrin-tablet formülasyonu) emredilmiş cibinliklerin kullanması sonucunda ,şark çıbanı insidansında %1,87’den %0,035’e varan bir azalmanın olduğu gözlemlenmiştir (111).

Tatarcıkların dinlenme , beslenme ve üreme habitatları farklı ve bir okadar çeşitli olduğu için,erginlerde mücadele oldukça zordur.Farklı coğrafyalar da değişik biyo-ekolojik özelliklere sahip olmaları dolayısıyla , benzer mücadele teknikleri bazen istediğimiz sonuçları vermeyebilir (117).

Şimdiye kadar kimyasal mücadele yaparken ,tatarcıkların dinlenme alanlarından olan, ağaç kovukları,duvar çatlakları , kemirgen yuvalarına sisleme veya püskürtme yöntemiyle insektisitler uygulanmıştır (118). Ancak bu insektisitlerin tatarcıklarda direnç oluşturabileceği ve çevreye verebilecekleri zararlar göz önünde alındığında ,alternatif kontrol metotları geliştirilerek kimyasal mücadele uygulamalarının en zararsız hale getirilmesinde yarar vardır.

Tatarcıklarla mücadelede biyolojik ajanların kullanılması oldukça yeni bir uygulamadır.Tatarcıkların parazit ve predatör şeklinde görülen bazı doğal düşmanlarının olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (99).Özellikle kertenkeleler ergin tatarcıkları avlarken , karıncalar da tatarcık larva ve yumurtaları için predatör olduğu bildirilmiştir (119).

Bazı akar ve nematodların tatarcıklar üzerinde ekto parazit olarak bulunabildiği ve larvalarda yüksek oranda ölüme sebep olduğu bildirilmiştir (120).Sivrisinek larvaları ile mücadelede oldukça önemli bir biyolojik kontrol ajanı olan *Bacillus thuringiensis israelensis*(BTI)'ın bazı tatarcık türleri üzerinde etkin olduğu saptanmıştır (121) .

Entomopatojenik bir nematod olan *Rhabditoid* cinsi nematodun , sinek , sivrisinek ve tatarcık larvası üzerine olan etkisi araştırılmış ve *P.papatasi* larvalarında %18 oranında ölümlerin meydana geldiği ortaya konulmuştur (122).

3. BÜYÜME FAKTÖRÜ (GROWING FACTOR)

Ağırlıkları 4000- 60000 Dalton arasında değişmekte olan, çok az miktarda bile olsa hücresel aktiviteleri etkileyebilen proteinlerdir (123).

Büyüme faktörleri hücrelerin replikasyon ve farklılaşmasını düzenlerler. Sistemik dolaşımda bulunurlar ve çeşitli hücre sistemleri ve dokularca salınırlar, bundan dolayı hücre metabolizmasının sistemik ve lokal düzenleyicilerindedir. Büyüme faktörleri dolaşımda serbest olarak yada spesifik bağlayıcı proteinlere bağlanmış halde bulunurlar yada platelet agregasyonundan sonrasında salınmak üzere platelet granüllerinde depolanırlar (124).

Büyüme faktörlerinde hücrel fonksiyonlar endokrin, parakrin veya otokrin mekanizmalarla sağlanır.

-Endokrin yolla etkileyen faktörler hedef hücreye kan vasıtasıyla taşınır ve uzağında olan hücreleri de etkiler.

-Parakrin yolla etki eden faktörler salgılandıkları bölgede etkinliğini gösterir.

-Otokrin faktörler, salgılanmış oldukları hücrenin fonksiyonlarını etkilemektedir.

-Bazı transforme olan fibroblastlar, hiç salgılanmamış faktörlere hücrenin kendi bünyesinde, intrakrin mekanizma ile yanıt verirler (123,125).

Geniş araştırmalarda dokuya özgü olan büyüme faktörü üretimi gösterilememiş olup, çoğunlukla aynı faktör çeşitli hücre ve dokularca sentezlenir haldedir. Lokal olarak üretilmiş olan faktörlerin sentez ve etkileri sistemik hormonlarca reseptör içeren dokularda modifiye edilir. Sistemik hormonlar spesifik dokularda lokal faktörleri düzene sokarak hedef dokuya özgünlük kazandırır. Bu 4 seviyede düzenlenir;

1- Sentez

2- Aktivasyon

3- Reseptöre bağlanma

4- Bağlayıcı proteinler (121).

Büyüme faktörlerinin her hangi bir hücreyi etki sağlayabilmesi, o hücrenin, o faktörler için reseptöre sahip olup olmasına bağlı bulunmaktadır. Reseptöre bağlanma sonucunda hücre içinde özgün bir cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkmaktadır. Etki çoğunlukla tirozin kinaz uyarılarak meydana gelir. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörleri bulunmaktadır (123,125).

Sitokin ve koloni uyarıcı faktörlerin reseptörleri diğer faktörlerinkinden farklı olduğu gözlemlenmiştir. Çünkü diğerleri sitoplazmik uzantılarında tirozin kinaz aktivitesi gösteren sitoplazmik bir parça içermemekte ya da sitoplazmik uzantıları yoktur veya çok kısa durumdadır. Bununla beraber sitoplazmada tirozin kinaz aktivitesini başlatmaktadırlar. Bazı durumlarda bu bir transmembran proteini olan gp130' a bağlanmakla oluşur. Bu sitoplazma içerisindeki Janus Tirozin Kinazları (JAKs) aktive eder. Bunlarda sinyal iletici ve

transkripsiyon aktivatörü (STAT) olan proteinleri aktive eder. Fosforillenen STAT'lar homo ve heterodimerler meydana getirerek transkripsiyon faktörü olarak etki ettikleri nükleusa giderler. Bu JAK-STAT yolu direkt hücre yüzeyinden nükleusa olan bir başka yoldur (126).

Büyüme faktörleri; kemotaktik ve hücresele proliferasyonu uyarması, aynı ve farklı tipteki hücreler arasındaki sinyalizasyonu sağlaması, ekstrasellüler matriks oluşumu ve anjiogenezi kontrol etmesi, konsantrasyon sürecini düzenlemesiyle ve doku bütünlüğünü yeniden kurması ile iyileşme sürecinde temel bir rol oynamaktadırlar (127).

3.1. Büyüme Faktörlerinin Sınıflandırılması

Bilinen çok sayıda büyüme faktörü vardır ve bunların sınıflandırılması birkaç farklı yolla yapılmaktadır. Birinci sınıflandırma klasik sınıflandırma şeklindedir ve buna göre büyüme faktörleri 3 gruba ayrılmaktadır. Birinci grup; çeşitli hücrelerin çoğalmasını ve gelişimini sağlamakta olan sinir büyüme faktörü (NGF), IGF-1, aktivin, inhibin ve EGF gibi faktörlerdir. Bu grupta 20'den fazla faktör tanımlanmış durumdadır. Sitokinler de ikinci gruptur. Sitokinler; makrofaj ve lenfositler tarafından üretilir ve immün sistemin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Üçüncü grup; kırmızı ve beyaz kürelerin çoğalma ve olgunlaşmasını regüle eden koloni uyarıcı faktörlerdir (128).

Büyüme faktörlerinin klasik sınıflandırılması şu şekildedir ;

- 1- Çeşitli hücre tiplerinin bölünme ve/veya gelişmesini uyaran büyüme faktörleri
NGF, EGF ve IGF-1 aktivin ve inhibinler
- 2- Lenfokin ve sitokinler
- 3- Koloni uyarıcı faktörler

Büyüme faktörleri; vücuttaki doğal metabolizmalar, fizyolojik ve patolojik durumlar üzerine etkilerine dayandırılarak da aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir.

- I- Embriyogenez ve gebelikte görevli büyüme faktörleri
- II- Epitel ve hemopoetik hücrelerde görevli büyüme faktörü
- III- Yara iyileşmesi ve inflamasyonda görevli büyüme faktörleri

IV- Tümör hücreleri ile ilgili olan büyüme faktörleri (128).

3.2. Yara İyileşmesinde Rol Oynayan Büyüme Faktörleri

Peptit büyüme faktörleri doku tamirinin başlatılmasında ve yönetilmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Doku hasarı meydana geldiği zaman pıhtılaşma ve trombosit degranülasyonu uyarılır. Trombosit granüllerinin içinde PDGF, TGF- β , EGF ve IGF-1 bulunmaktadır. Trombositlerden salgılanan büyüme faktörleri, iyileşmeye giden yolda bir takım olaylar zincirini başlatmakta ve devam ettirmektedirler. İlk olay, inflamatuvar hücrelerin, fibroblastların, epitel hücrelerinin ve endotel hücrelerinin yara bölgesine çekilmesi şeklindedir. Trombositlerden salınan büyüme faktörleri hızla yara bölgesine dağılmakta ve proteazlar tarafından parçalanmaktadır. İyileşmenin tam anlamıyla olabilmesi için de inflamatuvar hücreler, fibroblastlar ve epitel hücreleri tarafından büyüme faktörü sentezinin idamesi şarttır (129).

Bütün peptit büyüme faktörleri, etkilerini, hedef hücre zarında bulunan yüksek afiniteli reseptörlere bağlanarak gösterirler. Bu reseptörlerin aktivasyonu, yara iyileşmesine oluşan bir takım olayları uyarmaktadır. Bu büyüme faktörlerinin postreseptör düzeyde hangi mekanizmayla yara iyileşmesini sağladıkları tam bilinmemekle beraber, tirozin rezidülerinden protein fosforilasyonunun temel olay olduğu varsayılmaktadır (129).

3.3. Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (Transforming Growth Factor-Beta)

TGF- β ailesi diğer büyüme faktörlerine nazaran daha yakın zamanda tanımlanmış bir üyesidir. Bu ailenin üyeleri özellikle ektoderm kökenli keratinosit ve lökositlerin büyümesini geçici olarak inhibe ederken, fibroblast gibi mezoderm kökenli hücreler için zayıf da olsa mitojenik halde bulunmaktadır (130).

Yara iyileşmesi sürecinde inaktif halde bulunan TGF- β muhtemel durumda düşük pH veya plazminin etkisiyle proteolize uğramakta ve aktif hale geçmektedir. TGF- β ' nın yara iyileşmesi bağlamında oluşan en önemli etkisi inflamatuvar hücre kemotaksisini uyararak ve ekstraselüler matriks sentezini artırmaktır (131).

3.3.1. TGF- β ' nin Özellikleri

Yapı/fonksiyon özellikleri

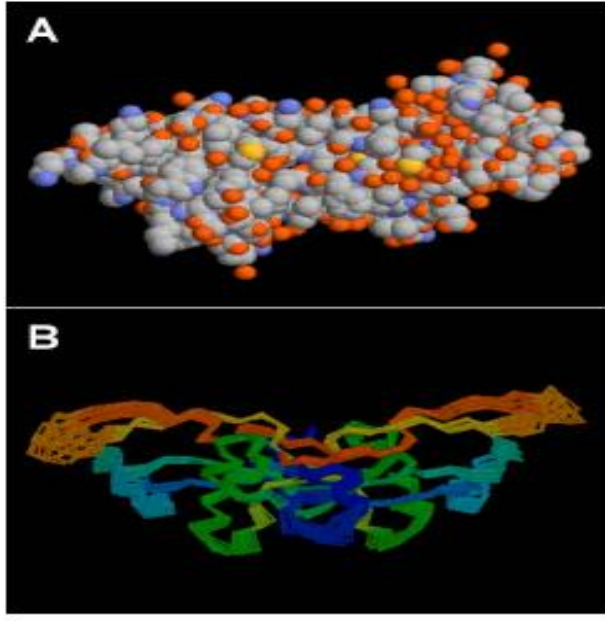
TGF- β ; disülfid bağlarıyla bağlanan iki zincir halinde bir polipeptid hormondur. TGF- β farklı dokularda üç farklı izoform halinde bulunmaktadır (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) ve bu formların polipeptid dizilimleri %60 oranında benzerdir (129). TGF- β vücuttaki tüm hücreler tarafından sentezlenebilen ve tüm hücrelerin hassas olduğu bir faktördür. Bununla beraber, TGF- β 'nin her hücre tipinde cevabı farklı şekildedir. TGF- β , genel olarak hücre döngüsünün regüle edilmesinde, embriyogenezde ve organ gelişiminde etkin bir faktördür (132). Yara iyileşmesi safhalarında, TGF- β trombositlerden başka lenfositler, makrofajlar, endotel hücreler, düz kas hücreleri, epitelyal hücreler ve fibroblastlardan da salgılanmaktadır. Yara alanlarında kemotaktik ve anjiogenezi hızlandırıcı etkisi bulunmaktadır. Ayrıca kollajen, fibronektin ve glikozaminoglikanlar gibi matriks proteinlerinin sentezini düzenler (133).

TGF- β osteoblastlar vasıtasıyla salgılanmaktadır. Salınan büyüme faktörünün önemli bir miktarı kemik matriksi içerisinde depolanmasından dolayı, kemik dokusu vücuttaki en büyük TGF- β rezervuarıdır (134). Ayrıca en çok TGF- β reseptörü içeren hücreler de osteoblastlardır (135).

Protein özellikleri

TGF- β ; TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 ve TGF- β 5 olarak bilinen en az beş izoform halinde bulunur. Bunlar; dönüştürücü büyüme faktörü α (TGF- α) ile bağlantılı değildir. Bunların amino asit dizilimleri % 70- 80 arasında benzerlik gösterir. TGF- β 1 genel formdur ve diğer izoformlar hücre ve dokularda daha sınırlı oranda bulunurken TGF- β 1 hemen hemen hepsinde yaygın bir şekilde bulunur. TGF- β 2, NGF ve PDGF-BB'nin ayrıntılı topolojilerinde tutarlı bir benzerlik vardır (130).

Bütün izoformların biyolojik olarak aktif formları disülfid bağlı olan homodimerlerdir. Bununla beraber disülfid bağlı heterodimer izoformları da mevcuttur. Monomerik altbirimler 112 amino asit uzunluğundadır. TGF- β 4 aminoterminal sonda iki tane ekli amino asit içerir (130).



Şekil 3.1. (A) Rekombinant insan TGF- β 1' in Nuclear Magnetic Resonance (NMR) yöntemi ile çıkarılan üç boyutlu seması (B) TGF- β 1' in heteronükleer NMR yöntemi ile homodimer ayna görüntüsünün sematize edilmesi (136).

TGF- β izoformları uzun öncülerinin proteolitik bölünmesiyle ortaya çıkmaktadır.

TGF- β 1: 390 amino asit

TGF- β 2: 412 amino asit

TGF- β 3: 412 amino asit

TGF- β 4: 304 amino asit

TGF- β 5: 382 amino asit

Bu izoformlar prekürsörlerin karboksitermal ucundan elde edilmektedir (130).

Gen yapısı

TGF- β ' nin farklı izoformları farklı genlerle kodlanmış haldedir. Bütün genler 100 kb' tan fazla uzunluğa sahip ve 7 ekson içermektedir. Genler birbirinden farklı kromozomların haritasını oluşturur. TGF- β 1 geni 19q13 insan kromozomunu, TGF- β 2, 1q41, TGF- β 3 de 14q24 nolu insan kromozomlarını haritalandırmaktadır. TGF- β 3 geni embriyonik kalp ve

akciğer dokusunda çok fazla fakat karaciğer, dalak, böbrek dokularında sınırlı miktarda olarak görülmektedir. TGF- β 1 dalak dokusunda çok fazla miktarda gözlemlenmiştir (137).

İlgili faktörler

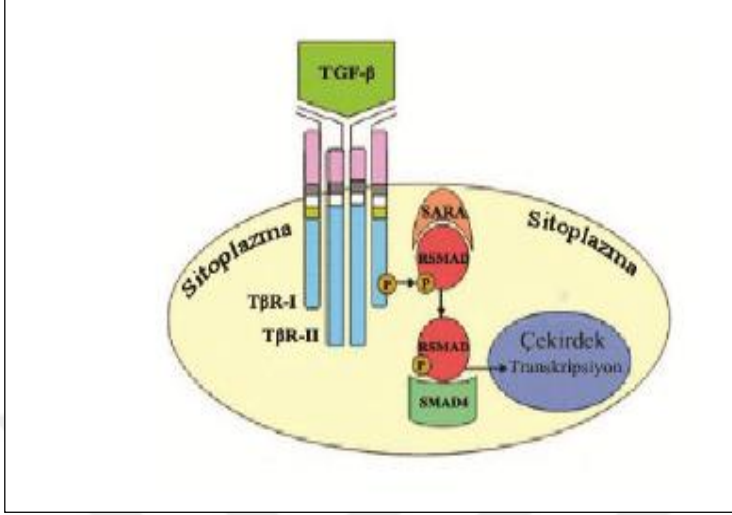
TGF- β ; TGF- β süper ailesi olarak bilinen protein ailesinin ilk örneğini oluşturmuştur. Bu aile; inhibinler, Activin A, MIS (bone morphogenetic proteins), dpp (Drosophila decapentaplegic) ve Vg-1 (Xenopus vegetalising factor-1)' i kapsamaktadır. MNSF (monoklonal nonspesifik süpresör faktör) TGF- β 2 ile %60 dizilim oranında benzerlik gösterir (130).

3.3.2. TGF-B' nin Etki Mekanizması

TGF- β , hücrelerin gelişmesini, çoğalmasını ve birçok farklı hücre tipinin gelişiminin bloke edilmesini düzenler. TGF- β reseptörü Tip I ve Tip II alt birimlerinden meydana gelmektedir. Bunlar SMAD protein ailesini uyaran, serin tirozin kinazlardır. TGF- β 'nin hücre yüzeyindeki Tip II reseptöre bağlanmasıyla Tip I reseptörün fosforlanmasına neden olmaktadır. Böylece Tip I reseptör Smad 2 ve 3 proteinini fosforlayarak ve aktive edebilecek duruma gelir. Aktive olan Smad 2 ve Smad 3, Smad 4 ile heterodimerler meydana getirir ve nükleusa giderler. Smad kompleksi, ko-aktivatörler, ko-represörler ve diğer transkripsiyon faktörleriyle birlikte gen ekspresyonunu düzenlerler (138).

Bu kısım üç fonksiyonel sınıf oluşturan 8 farklı Smad proteini içerir. Bu sınıflar; RSmad (reseptör –kontrol) , Co-Smad (Co-mediator) ve I-Smad (engelleyici) dir. R19 Smadlar (Smad 1, 2, 3, 5 ve 8), Tip I reseptör kinazlarla direkt olarak fosforlanır, aktive olurlar ve homotrimerizasyona uğrarlar ve Co-Smad, Smad 4 ile heteromerik kompleks meydana getirirler. Aktif Smad kompleksleri nükleusa girer, diğer nükleer kofaktörlerle birleşmiş halde hedef genlerin transkripsiyonunu regüle eder. I-Smad, Smad 6 ve Smad 7, TGF- β sinyalizasyonunu negatif yönde düzenler. Bunuda reseptör için R-Smadlarla yarışarak veya Co-Smadlarla etkileşim halinde yapar, çünkü TGF- β 'nin hücre gelişimi üzerinde negatif etkisi bulunmaktadır. Bu mekanizmanın inaktive olması tümör oluşumunu zemin hazırlamaktadır. Tümör oluşturan mutasyonlar hem TGF- β ailesinin reseptörlerinde hemde Smad proteinlerinde gözlemlenmektedir. TGF- β 'nin Tip II reseptörü birçok insanda gastrointestinal

kanser ile mikrosatellit değişkenlikteki mutasyonda ve Smad 4 pankreatik karsinomların yaklaşık yarısında inaktif şekildedir. Diğer birçok somatik ve kalıtsal hastalık TGF- β yolundaki mutasyon veya bozuklukların sonucu şeklidir (138).



Şekil 3.2. TGF- β ' nın sinyalizasyon yolu (139).

3.3.3. Yara İyileşmesinde TGF- B' nın Rolü

TGF- β yara iyileşmesi sürecinde hücre proliferasyonunu, hücre bölünmesini ve ekstrasellüler matris oluşumunu tetiklemekte olan önemli büyüme faktörlerindedir.

Ayrıca monositlerden FGF, PDGF, TNF-alfa ve IL-1 gibi diğer büyüme faktörlerinin sekresyonunu da uyarır; makrofajlar için kemotaktik bir ajandır bununla beraber kendi salınımını da makrofaj içindeki otokrin bir yolakla düzenleyebilmektedir (138).

Normal gelişim süresi 31 gün olan fötal tavşana, gebeliğin 24. gününde TGF- β içeren subkutan yara implante edilmiş ve 1- 7 gün sonra görülen histolojik cevaplar TGF- β içermeyen fötal ve yetişkin kontrol implantları ile karşılaştırılmıştır. Yetişkin implantın histolojisi erken akut inflamatuvar yanıt ile karakterize olduğu ve 7. güne kadar fibroblastlar ve kollajenin baskın olduğu gözlenmiştir. Aksine fötal tavşandan alınan kontrol implantlarında akut inflamasyon, fibroblastların artışı ve kollajen rezervuarının olmadığı görülmüştür. TGF- β ihtiva eden fötal tavşanda 7. günde çok miktarda fibrotik reaksiyon gözlenmiş, histolojisinde kollajen depolanması ile belirgin fibroblast artışı görülmüştür. Bu çalışma TGF- β ' nın fötal yarada fibroblast artışı ve kollajen birikimi ile yetişkin tavşanlardakine benzer iyileşmeye yol açtığını göstermiş bulunmaktadır (140). Yetişkin

tavşanlarda yaralara TGF- β ' ya karşı nötralize edici antikorlar enjekte edildiğinde yaralarda daha az sayıda makrofaj, kan damarı ve daha az kollajen ve fibronektin içeriği meydana geldiği ve skarsız iyileşme geliştiği tespit edilmiştir. Ayrıca kontrol yaralarındaki aynı seviyede gerilme direnci ve daha normal deri yapısı gösterdiği de görülmüştür (141).

4.OKSİDATİF STRES

Canlı organizmada kusursuz bir işleyişin sürekliliği için oksidan ve antioksidanlar denge halinde bulunmalıdır. Bu dengenin oksidanlar lehine bozulması ya da antioksidan sistemlerin yetersiz olması durumunda oksidatif stres ortaya çıkmaktadır (142). Oksitleyici ajanlar organik moleküllerin tümünü etkilese de en başta membran lipitleri olmak üzere lipit, protein ve nükleik asitlerin oksidasyonuna sebep olabilmektedir.

Serbest radikallerin sebep olduğu tepkimelerde substratın oksidasyonunu engelleyerek biyomoleküllerde meydana gelebilecek zararı önleyen moleküller antioksidanlar olarak adlandırılır. Antioksidanlar oksijen tutma özelliklerinden dolayı serbest radikal hasarından koruyucu göreve sahip olan, hücre içinde çoğalabilen yada dışarıdan beslenme yoluyla alınabilen moleküllerdir. Enzimatik antioksidan savunma sistemlerinden, albumin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi moleküller hücre dışı antioksidan savunmadan sorumluyken; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidaz da hücre içi antioksidan savunmadan sorumludur. Bunlardan başka enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri de bulunmaktadır; askorbik asit (C vitamini), alfa-tokoferol (E vitamini), beta-karoten (provitamin A), karotenoidler ve flovenoidler enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerindedir (143).

4.1. Oksidatif Stresin Makromoleküller Üzerine Olan Etkisi

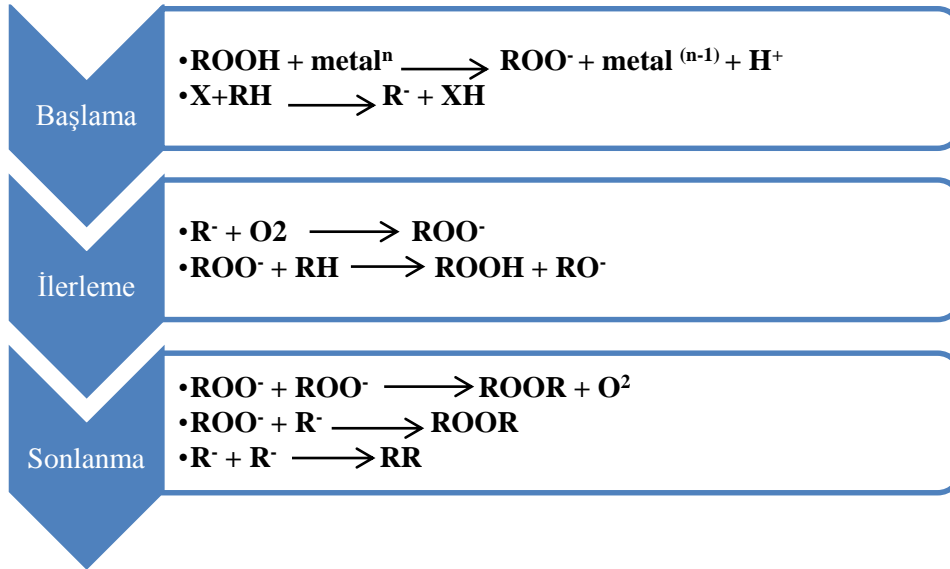
4.1.1. Oksidatif Stresin Lipitler Üzerine Olan Etkisi

Hücre membranında bulunan doymamış yağ asitleri oksidatif strese oldukça duyarlı haldedir. Membranda gerçekleşen lipit peroksidasyonu transmembran iyon gradientinin bozulmasına ve hücrede metabolik olayların aksamasına sebep olmaktadır (144).

Lipit peroksidasyonu serbest radikallerin doymamış yağ asitlerini etkilemesi ile başlar ve başlama, ilerleme, sonlanma olmak üzere 3 safhadan oluşmaktadır (Şekil 4.1.).

Serbest radikallerin doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunu uzaklaştırması peroksidasyon olayı tetiklemektedir. Bir hidrojen atomundan yoksun kalan karbon atomundaki ortaklaşmamış elektron, yağ asidi zincirinin radikal olmasının sebebidir. Kararsız bir halde olan lipit radikali kararlı hale gelebilmek için molekül içi bağlarını yeniden regüle eder ve konjuge dien yapısına dönüşür. Reaksiyon lipit radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi ve lipit peroksi radikalının meydana gelmesiyle devam eder. Meydana gelen lipit peroksi radikali membrandaki diğer doymamış yağ asidi zincirlerine zarar vermesiyle yeni lipit radikalleri oluşmaktadır. Lipit peroksi radikali açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksite dönüşebilmektedir. Bu bir zincir tepkimesidir ve reaksiyonun membranda oluşturduğu hasar geri dönüşümsüz olarak bilinmektedir (145).

Lipit peroksidasyonu, lipit alkolsil radikaller (LO-), malondialdehit (MDA; HOC-CH₂-CHO) gibi aldehitler, alkanlar, lipit deperoksitler ve alkollerin meydana gelmesiyle sonlanmaktadır. Bu ürünlerin büyük çoğunluğu toksiktir (146). Tepkimenin ne zaman sona ereceği ortamda bulunan oksijen ve antioksidan miktarına bağlı olarak belirlenir.



Şekil 4.1. Lipit peroksidasyonunun aşamaları

4.1.2. Oksidatif Stresin Proteinler Üzerine Olan Etkisi

Oksidatif stresin zarar verdiği biyomoleküllerden biri de proteinlerdir. Polipeptid omurgasındaki aminoasitlerin α -karbon atomlarından bir hidrojen atomunun ayrılmasıyla başlayan oksidasyon olayı ile proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri tarafından kovalent modifikasyonu meydana gelir (147). Proteinler serbest radikal saldırılarına doymamış yağ asitlerinden daha az duyarlı haldedir (148).

Protein oksidasyonu reaksiyonları ilk defa Swallow, Garrison, Shuessler ve Schiling araştırmacılarının çalışmalarıyla aydınlağa kavuşmuştur (149-151).

Proteinlerde meydana gelen hasarın nedenleri arasında elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar lipid şekerlerinin otooksidasyonu yer almaktadır. Ayrıca reaktif oksijen türlerinin üretimine sebep bütün reaksiyonlar ve ajanlar da protein oksidasyonuna da sebep olabilmektedir.

Protein oksidasyonu birçok mekanizmayla meydana gelebilir ve çok farklı tipte oksidatif protein modifikasyonu oluşabilmektedir. Bunun sebebi aminoasit yan zincirlerinin her birinin ayrı ayrı modifikasyona uğrama potansiyeline sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Proteinlerde yapısal farklılığa yol açan başlıca molekül mekanizmalar protein karbonil ürünleri (PCO) oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, nitrotirozin (NT) ve dinitrotirozin (diTyr) oluşumu ve ileri oksitlenmiş protein ürünleri (AOPP) oluşumu şeklinde sıralanabilir (152-164).

Oksidatif protein modifikasyonları sonucunda; protein omurgasının fragmentasyonu, yeni reaktif türlerinin oluşumu (DOPA, peroksit), fazla miktarda radikal oluşumu, protein ya da aminoasitlerde dimerleşme, protein agregasyonu, enzim aktivitesi kaybı, proteolize azalmış /artmış eğilim, proteinlerin katlanma bozukluğu, hücre sinyal yollarının zarar görmesi, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonunda farklılıkların oluşması, immünojen aktivitedeki yükseliş, proteinlerdeki yapısal bozulmalardan kaynaklanan fonksiyonel kayıp gibi moleküler sonuçlar ortaya çıkar (165-167).

Oksidatif modifikasyona sahip proteinler ya düşük molekül ağırlıklı ürünlere ayrılır, yada çapraz bağlı yüksek molekül ağırlığına sahip ürünler meydana getirir. Sülfidril gruplarının disülfidrilere ve oksiasitler gibi diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikal aracılı protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisi şeklindedir. Reaktif oksijen türlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda aminoasit

kalıntısında ve/veya peptid omurgasında meydana gelen hasar sonucu PCO ürünleri meydana gelmektedir. PCO düzeyinin saptanması oksidatif protein hasarını belirlemede hassas bir yöntem olmasına karşın belirli bir aminoasit için spesifik değildir.

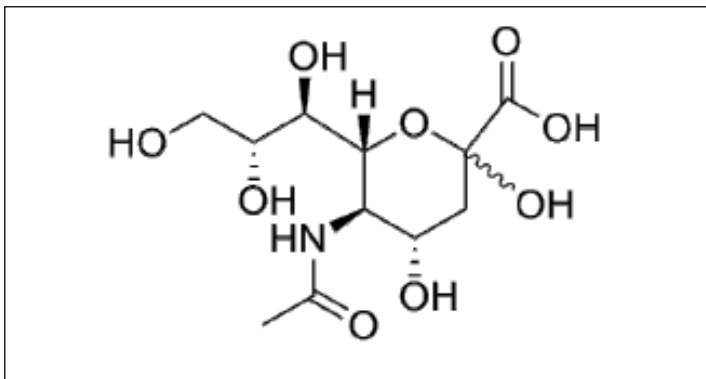
Fazla miktarda üretilmiş olan reaktif oksijen türleri sebebiyle oluşan protein oksidasyonu, nörodejeneratif hastalıklar olan Alzheimer ve Parkinson hastalığı, amilodosis, kas distrofisi, solunumsal distres sendromu, iskemi-reperfüzyon hasarı, kalp damar sistemi hastalıkları, kanser, protein glikozilasyon veya glikooksidasyon son ürünlerinin artmasının neticesi olarak aterosklerozis, iltihaplı eklem romatizması ve diğer hastalıklar ile ilişkilidir.

4.1.2.1. İleri Oksitlenmiş Protein Ürünleri

1996’ da kronik üremik hastaların plazmasında AOPP olarak adlandırılan yeni bir oksidatif stres belirteci belirlenmiş ve daha sonra da yapılan araştırmalarda AOPP araştırmacıların dikkatini çekmiştir (161,164).Yapılan çalışmalarda, AOPP seviyesinin protein oksidasyonu ile uyumlu olduğu, ancak lipit peroksidasyon belirteci olan TBARS ile benzerlik göstermediği bildirilmiştir (163).

4.1.2.2. Siyalik Asit

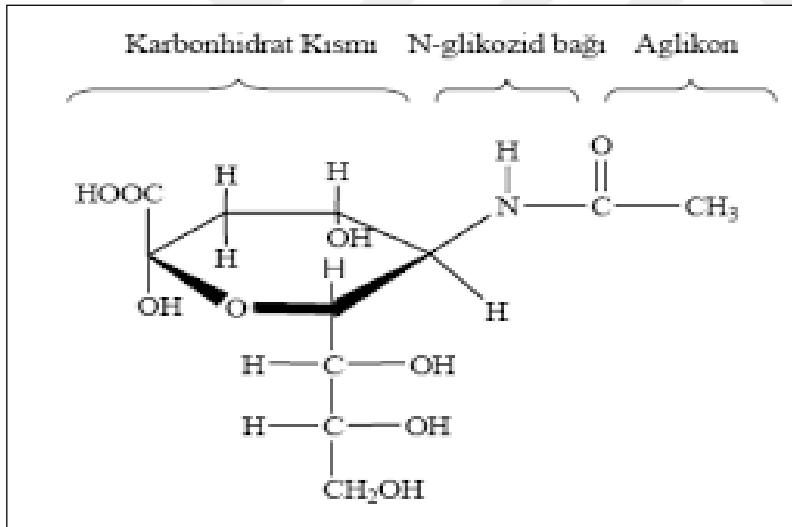
Siyalik asitler hücre membranı başta olmak üzere hücresel bileşenlerin yapısında glikoproteinlere ve glikolipitlere bağlı olarak bulunan, nöraminik asitten türeyen dokuz karbonlu şekerler olarak tanımlanır (Şekil 4.2.). Siyalik asit ilk kez sıgır tükürük bezindeki müsenden izole edilerek elde edilmiştir (168).



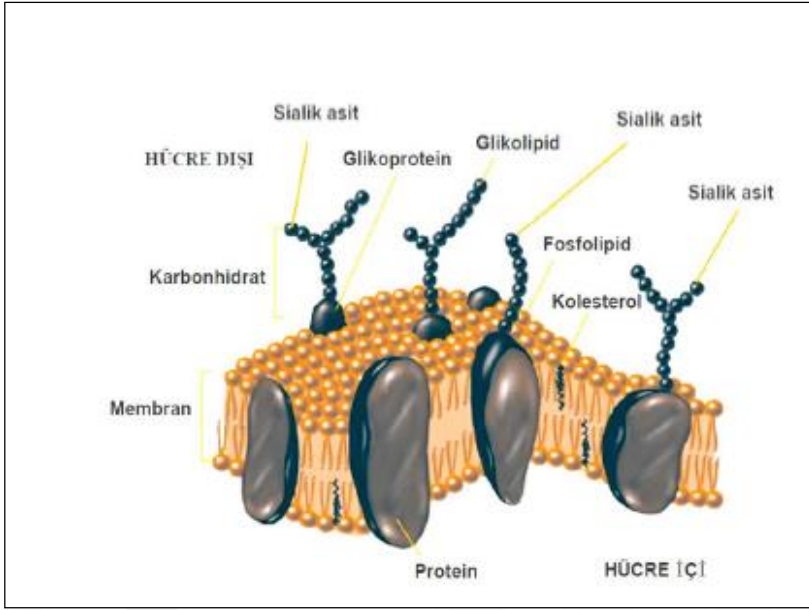
Şekil 4.2. N-Asetilnöraminik asit

Siyalik asitlerin birçok canlıda bulunan yirmiden fazla çeşidi bulunmaktadır. Bunlardan $C_{11}H_{19}NO_9$ kimyasal formülüne sahip N-Asetilnöraminik asit (NANA) insan dokularında bulunan başlıca siyalik asittir (145). Siyalik asitler hücre membranındaki protein ve lipitlerin yapısal bileşenini meydana getirir. Karbonhidrat ve karbonhidrat olmayan yapılarda glikozid bağıyla birleşerek kompleks karbonhidratları oluştururlar. Karbonhidrat olmayan kısma aglikon, tümüne ise glikozid adı verilir (Şekil 4.3.). Aglikon ve nöraminik asit N-glikozid bağı ile bağlanarak N-asetil nöraminik asiti meydana getirir (169).

Siyalik asit negatif elektrik yüküne sahip olmakla beraber membranının dış yüzeyinde bulunmaları onların biyolojik önemini artırır (Şekil 4.4.). Örneğin, sahip olduğu negatif itici elektrostatik güç hücre membranının yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlamaktadır. Pozitif yüklü moleküllere bağlanarak bu moleküllerin transportunda hem itici hem de çekici etkiye sahip olması, kan dolaşımında eritrositleri birbirinden uzaklaştırıcı etkiye sahip olması gibi bir çok özellik siyalik asitin taşımış olduğu negatif yükten kaynaklanan ana işlevlerindedir (170).



Şekil 4.3. N-Asetilnöraminik asitin aglikon kökü ve glikozid bağı konumu.



Şekil 4.4. Hücre membranında siyalik asit

Siyalik asitlerin bağışıklık sisteminde önemli görünen rolleri vardır. Hücreleri bağışıklık sisteminde tanınmayacak bir hale getirirler ve bu asidik moleküller, makromolekülleri ve hücreleri örtmesiyle enzimatik ve immünolojik ataktan korur bu yüzden de siyalik asitlerin bağışıklık sisteminin doğuştan gelen naturel üyeleri olduğu düşünülür (171). E. coli' de siyalik asit miktarının artması bakterinin konak canlıdaki makrofajlarca tanınarak yok edilmesini engellemektedir.

Kanser hücrelerinin yüzeyleri normal hücrelere göre yapısal olarak farklılık gösterir. Bu farklılıklardan biri de malignant hücrelerin membrandalarında siyalik asit miktarının yükselmesidir. Bu sebeptendir ki siyalik asitler vasıtasıyla gizlenmiş olan malignant hücreler bağışıklık sistemi hücreleri tarafından tanınıp yok edilemediği için kolay bir şekilde çoğalma ve metastaz yapma fırsatı bulur. Bu özellikleri sebebiyle siyalik asitler tümör biyolojisinde de önemli yer tutmaktadır (172).

Glikoprotein ve gangliyozidlerde bulunan siyalik asit kalıntılarının, inflamatuvar hastalıklar ve kanser ile ilişkili hücresel tanıma ve immünolojik reaksiyonlarda önemli olduğu bildirilmiş, kanserli olgularda siyalik asit düzeyinin kayda değer ölçüde yükseldiği yapılmış olan bir çok çalışmada gösterilmiştir (173-177).

Siyalik asitler aynı zamanda selektinler gibi fizyolojik reseptör kısımlarının tanınmasında da önemli rol oynamaktadır. Birçok virüs hücre enfeksiyonunda siyalik asitleri kullanır, hücreler arası iletişimde ve hücre adhezyonunda önemli rol oynarlar. Hücrelerdeki

siyalik asit seviyesinin yükselmesi veya düşmesi organizmanın bütününde gerçekleşen bir değişikliği ortaya koymaktadır. Kanser hastalığının evresi ve özellikle metastatik kanser hastalığı ile serum siyalik asit seviyeleri arasında ileri derecede korelasyon gözlemlenmiştir (178). Bu sebepten dolayı siyalik asit seviyesinin tedaviye yanıtının izlenmesinde iyi bir belirteç olduğu öne sürülmektedir (179,180).

Sonuç olarak siyalik asitler fertilizasyonda, immünolojik reaksiyonlarda, tümörün gelişme safhasında, membranlar arası sinyal iletiminde, apoptozda, mikrobiyal ve mikrobiyal olmayan inflamasyonlarda ve daha birçok biyolojik hücrel ve patolojik olayda önemli role sahiptirler.

4.1.3. Oksidatif Stresin Nükleik Asitler Üzerine Olan Etkisi

Oksidatif stresden zarar gören diğer hücrel yapılardan biride nükleik asitlerdir. Hücrede ROS'nin artması, antioksidan enzim seviyelerinin düşmesi ve DNA onarım mekanizmalarının yetersiz kalması halinde oksidatif DNA hasarı meydana gelmektedir.

İyonize edici radyasyon, çok yüksek oksijen konsantrasyonu, otooksidasyona uğrayan kimyasallar (Dihidroksifumarat, dopamin, L-DOPA, noradrenalin, adrenalin), ksantin oksidaz ve substratları, tümör nekrozis faktör alfa gibi etkenler fazla ROS oluşmasına neden olurlar bu da DNA'ya direk olarak hasar verebildiği gibi, onarım enzimlerinin aktivitesini etkileyerek de hasara neden olabilirler (181).

Cu⁺² iyonları DNA'da G-C bakımından zengin bölgelerde yüksek oranda bulunması oksidatif hasara en fazla maruz kalmasına neden olur ve en fazla maruz kalan baz guanindir. Bu nedenden dolayı yaygın olarak ölçülen baz hasarı 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) olup, oksidatif DNA hasarının belirteci olarak kabul görmektedir (182-184). İlk kez 1984 yılında Nishimura ve Kasai tarafından, oksidatif DNA hasarının göstergesi olarak tespit edilmiştir (185). DNA'da oluşan yaklaşık 23 farklı oksidatif baz hasarı ürününden 8-OHdG en çok karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinen baz hasarıdır.

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da tek ve çift baz kırıkları, baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme gibi baz modifikasyonları, abazik alanlar meydana gelebilir veya protein ile DNA arasında çapraz bağlanmalar meydana gelebilmektedir. DNA'da oluşan oksidatif

hasar yaşlanma, kanser, immün sistem hastalıkları, kardiovasküler hastalıklar, dejeneratif hastalıklar gibi durumların başlıca nedeni ve belirteci olarak kabul edilmektedir.

4.1.4. Oksidatif Stresin Hücreler Üzerine Olan Etkisi

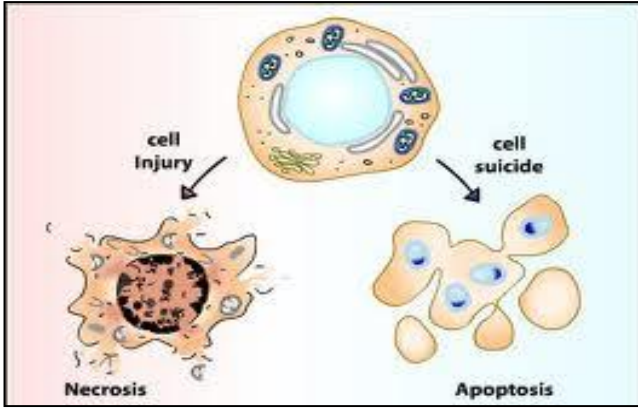
4.1.4.1. Apoptoz

Apoptoz, planlanmış hücre ölümü olarak tanımlanır ve çok hücreli bir organizmanın normal işleyişinin sürekliliği, farklılaşması, çoğalabilmesi için gerekli olan hücre düzeyinde meydana gelen olayların doğal bir parçasıdır. Bir organizmada saniyeler içinde nasıl yüzlerce hücre çoğaltılıyorsa yine benzer amaçla, canlılığın sürekliliği için, birçok hücre de istemli olarak yok edilmektedir.

Apoptozun meydana geleceği hücrede, bu hücre için ölüm tipine özgü olan, birçok farklılaşmalar görülür (Şekil 4.5).Plazma membranında tomurcuk oluşumu, hücrenin büzülmesi, kromatin materyalin yoğunlaşması gibi farklı morfolojik değişimler olabileceği gibi aynı zamanda organel ve reseptör düzeyinde meydana gelen değişimler de söz konusudur (186,187).

Apoptozun organizmada normalden az yada çok meydana geliyor olması patolojik bir sürecin tetiklenmesine neden olmaktadır. Sinir sistemi rahatsızlıklarından olan Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının, bağışık hücrelerin yetersizliği olan AIDS hastalığının, esasında normalden fazla gerçekleşmiş olan apoptoz yatmaktadır (188-190).

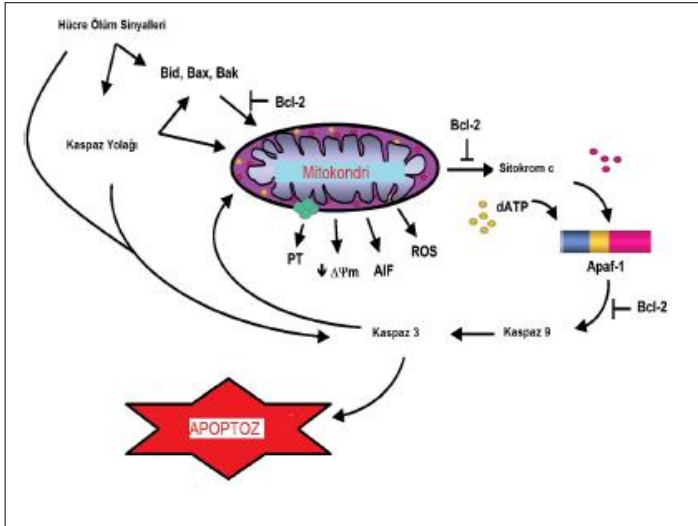
Hücrede baş edilemeyecek düzeyde oksidatif stres meydana geldiğinde DNA zincir kırıkları oluşmuş bir hücre hasarlı başka hücrelerinde oluşumuna zemin hazırlar.Pro-oksidanlar veya bunların meydana getirdiği serbest radikaller hücre bölünmesini uyararak mutagenizin başlamasına ve tümör oluşumuna sebep olmaktadır. Bu şekilde hücre siklusu sürecinde fark edilen hasarlı hücrelerin bölünmesi transkripsiyon faktörleri tarafından durdurulamaz ve bu hücreler çoğalmaya devam ederse apoptoz süreci tetiklenememiş olur ve hasarlı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalabildiği durum olan kanser gelişir (191). Bu nedenle ki apoptoz, canlılığın problemsiz işleyişi için kimi durumlarda gerçekleşmesi zorunlu kılınan bir hücre ölüm tipidir.



Şekil 4.5.Apoptoz

4.1.4.1.1. Apoptozda Mitokondrinin Önemi

Mitokondri hücre içinde ATP üretiminin kaynağı olmasının dışında da hücre içi veya dışından gelen çeşitli ölüm sinyallerinin birleşme noktası olan bir organeldir. Mitokondrinin çift tabakalı zarı tıpkı bir hücre zarındaki gibi zar potansiyeline sahiptir. Apoptotik sürecin tetiklenmesiyle mitokondrinin dış zarının geçirgenliği artmaktadır. Bu durum zar potansiyelinin değişmesine sebep olmakta ve dış zarda meydana gelen şişme ile beraber iki zar tabakası arasında mevcut proteinler (sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AİF), SMAC ve ENDO G) hücre sitoplazmasına doğru çıkarlar. Sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasıyla, inaktif şekilde bulunan Apaf-1'e (Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör) bağlanır ve apoptozom adı verilen yapıyı meydana getirir (192). Apoptozom kaspaz 9'u aktifleştirir ve zincir şeklinde diğer kaspazlarında aktifleşmesiyle birlikte apoptoz olayı geri dönüşümsüz bir şekilde başlamış olur (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Apoptotik süreçte mitokondrinin rolü.

4.2. Oksidatif Stres ve Hastalıklar

Oksidatif stres sonucunda ortaya çıkan hastalıkların başında kanser ve kalp damar rahatsızlıkları gelmektedir. Doymamış yağ asitlerinin hücre membranlarında ve lipoproteinlerdeki oksidasyonu sonucu oluşan oksitlenmiş lipidlerin makrofajların içine alınıp zamanla birikmesi sonucunda köpük hücresi adı verilen yapılar oluşmakta, oksitlenmiş lipidlerle dolu olan bu makrofajlar zamanla birikir ve aterosklerozun başlangıcını teşkil etmektedir (193). Ateroskleroz ise inme, kalp krizi gibi kalp damar yolu hastalıklarının meydana gelmesine sebep olmaktadır. Kalp ve damar yolu hastalıkları dünyada kanserden önce gelen ölüm sebebidir ve bu bağlamda oksidatif stresin rolü göz ardı edilmemelidir. Günlük antioksidan alımının artırılmasıyla kalp ve damar sistemi hastalıklarının oluşma riskinin % 20-30 azaltılabileceği bildirilmiştir (194).

Fazla kırmızı et ve hayvansal gıda tüketimi, az su içme, antioksidanlarca zengin gıdalardan yeterince alınmama gibi eksik ve yanlış beslenme, UV ışınlarına maruz kalma, sigara içme, aşırı alkol tüketme, çok yüksek miktarda oksijene maruz kalma, aşırı vücut egzersizi, stresli yaşam koşulları, ilerleyen yaş gibi durumlar hücrede artan serbest radikal seviyesine neden olmaktadır. Hücrede bulunan antioksidan miktarı oksidan miktardan daha düşük bir seviyede olduğu zaman oluşan oksidatif stres sonucu hücre, doku ve dolayısıyla da organizma seviyesinde bir takım hastalıkların ortaya çıkması olasıdır.

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarıyla serbest radikallerin ilişkisinin incelendiği çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemlerini farklılaştırdığı bildirilmiştir (195,196). Serbest radikal üretiminin insülin gen transkripsiyonunu azaltabileceği de söylenmektedir. Hiperglisemi ve oksidatif stres arasında yakın korelasyon olduğu düşüncesi in vivo çalışmalarla destek görmüş durumdadır (197).

Parkinson hastalığı, Alzheimer, Huntington hastalığı, Lou Gehrig's hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların esas nedeninin oksidatif stresin olduğu ile ilgili yapılan birçok çalışma mevcuttur. Bunların dışında; orak hücre anemisi, kırılğan X sendromu, otizm, viral enfeksiyonlar, obezite, kronik yorgunluk sendromu, epilepsi, endometriozis, polikistik over, yaşlanma gibi birçok hastalığın temelinde yatan sebebin oksidatif stres olduğu yapılan çalışmalarla kabul görmüştür (198,199).

5.GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmalarımız, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

5.1.Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmamıza Şanlıurfa Akçakale Mülteci Kampında ikamet eden Suriyeli halk içerisinde bulunan 32 Leishmaniasisli hasta ve 32 sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. Hastalardan ve sağlıklı kontrol grubundan alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen serum örnekleri daha sonra çalışılmak üzere -80 °C'de saklanılmıştır.

5.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Otoanalizör (Abbott®)
- ELISA yıkayıcı (DAS®)

- ELISA okuyucu (BioTek[®], ELx800)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal[®] 30 RF)
- -80°C derin dondurucu (Revco[®])
- Manyetik Karıştırıcı (Hangping[®], Variomag)
- Distile su cihazı (Nüve[®])
- Deiyonize Su Cihazı (Easypure RF[®])
- Hassas Terazî (Sartorius[®])
- Otomatik Pipetler (0,5-100µl, 50-200µl, 200-1000µl, 1-5 ml) (Gilson[®])
- pH metre (Hanna[®], pH 211)
- ±4°C Buzdolabı (Profilo[®])
- Vorteks (Nüve[®], NM 11)

5.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler, Kitler ve Sarf Malzemeler

- Toplam Antioksidan Status Ölçüm kiti (Rel Assay[®])
- Toplam Oksidan Status Ölçüm kiti (Rel Assay[®])
- Human TGF-β1 ELISA Ölçüm Kiti (Diacclone[®]) ,
- Pleyt (96 Kuyucuklu)
- Pipet Uçları (0.1-10 µL, 1-200 µL, 100-1000 µL, 1000-5000 µL)
- Kurutma Kağıdı
- Jelsiz Biyokimya Tüpleri

5.4 Toplam Oksidan Seviye (TOS) Ölçümü

Santrifüj sonrası ayrılan serum örneklerinde toplam oksidan seviye (TOS), Erel tarafından geliştirilen metodla Rel Assay[®] marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık olarak üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda ksilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili

olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Standart olarak H₂O₂ kullanılır. Sonuçlar µmol H₂O₂ Equivalent/L olarak ifade edilmiştir (200).

5.5. Toplam Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü

Santrifüj sonrası elde edilen serum örneklerinde toplam antioksidan seviye (TAS), Erel tarafından geliştirilen metodla Rel Assay[®] marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS[•] kationik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanmaktadır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edilmiştir (201).

5.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Ölçümü

Oksidatif Stresin bir göstergesi olarak gösterilen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ), TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilmektedir. Örneklerin Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplanırken TAS düzeyleri ile TOS düzeylerinin birimleri eşitlenmiştir (202,203). Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edilmiştir.

TOS, µmol H₂O₂ Equiv. / L.

$$\text{OSİ (AU)} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv. / L.}}{\text{TAS, } \mu\text{mol trolox Equiv. / L.}} \times 100$$

TAS, µmol trolox Equiv. / L.

5.7. TGF-β1 Düzeyinin Ölçümü

Hasta ve Kontrol grubunun serum örneklerindeki TGF-β1 (Transforming growth factor-β1) düzeyi Diaclone marka ELISA ticari kiti ile ölçülmüştür. Testin prensibinde de ifade edildiği gibi; TGF-β1 anti-insan antikoru ile kaplanmış pleyt üzerine metod'da belirtildiği yoğunlukta serum ve standartlar ilave edilerek inkübe edilmiştir. İnkübasyon

sonrası yıkama işlemini takiben Biotin-Konjugat kompleksi ilavesiyle beraber tekrar inkübe edilmiştir.İnkübasyondan sonra yıkama ve Streptavidin-HRP kompleksi bütün kuyucuklara ilave edilmiş ve tekrar inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Üçüncü yıkama işleminden sonra substrat ve stop solüsyonu ilavesini takiben ELISA Pleyt okuyucu'da 450 nm dalga boyunda optik dansiteler ölçülmüştür. Standart örneklerinin absorbanslarından kalibrasyon eğrisi oluşturularak sonuçlar hesaplanmıştır.Sonuçlar pg/mL olarak ifade edilmiştir.

5.8. Yapılan İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS Versiyon 11.5 (SPSS Inc. Chicago USA) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Grupların ortalamaları arasındaki farkın önemi Student's t testi ile karşılaştırılmıştır.Parametreler arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile araştırılmıştır. $P<0,05$ 'den küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

6.BULGULAR

	Hasta Grubu (n=32)	Kontrol Grubu (n=32)	<i>p</i>
Cinsiyet (E/K)	20/26	16/23	0,820
TGF-β1, pg/mL	810.52 ± 169.98	1095.41 ± 305.43	<0,001
TAS, mmol troloks Eq./L	1.08 ± 0.10	1.20 ± 0.16	<0,001
TOS, μmol H₂O₂ Eq./L	18.12 ± 4.50	13.12 ± 3.05	0,002
OSİ, Arbitrary Unit	1.67 ± 0.42	1.10 ± 0.28	<0,001

Tablo 5.1. Hasta ve kontrol grubunun tgf-β1 düzeyi ve oksidatif stres parametrelerinin karşılaştırılması

Tablo 5.1. de görüldüğü gibi TGF-β1 düzeyi kontrol grubunda hasta grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Oksidatif stres hasta grubunda TGF-β1'in düşük olmasına sebep olmuştur. Buna paralel olarak TAS düzeyide aynı şekilde kontrol grubunda daha yüksektir. TOS ve OSİ düzeyi hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olmuştur.

		TOS	TAS	OSİ
TGF-β1	<i>R</i>	,144	,346	,012
	<i>P</i>	,433	,052	,948
TOS	<i>R</i>		,236	,908
	<i>P</i>		,193	,000
TAS	<i>R</i>			-,183
	<i>P</i>			,317

Tablo 5.2. Hasta grubunda testler arasındaki korelasyon analizi

Tablo 5.2. de görüldüğü üzere hasta grubunda TOS ve OSI arasında oldukça anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur. Ayrıca kontrol grubumuzda da TOS ile OSI arasında pozitif, TAS ile OSI arasında ise negatif korelasyon tespit edilmiştir (Tablo 5.3.).

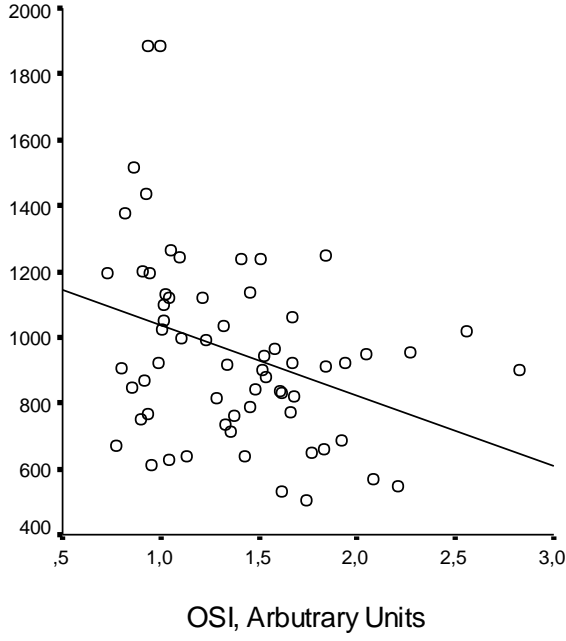
		TOS	TAS	OSI
TGF-β1	<i>R</i>	-,069	,098	-,092
	<i>P</i>	,709	,592	,617
TOS	<i>R</i>		,140	,860
	<i>P</i>		,445	,000
TAS	<i>R</i>			-,371
	<i>P</i>			,036

Tablo 5.3. Kontrol grubunda testler arasındaki korelasyon analizi

		TOS	TAS	OSI
TGF-β1	<i>R</i>	-,261	,325	-,344
	<i>P</i>	,038	,009	,005
TOS	<i>R</i>		-,078	,926
	<i>P</i>		,539	,000
TAS	<i>R</i>			-,426
	<i>P</i>			,000

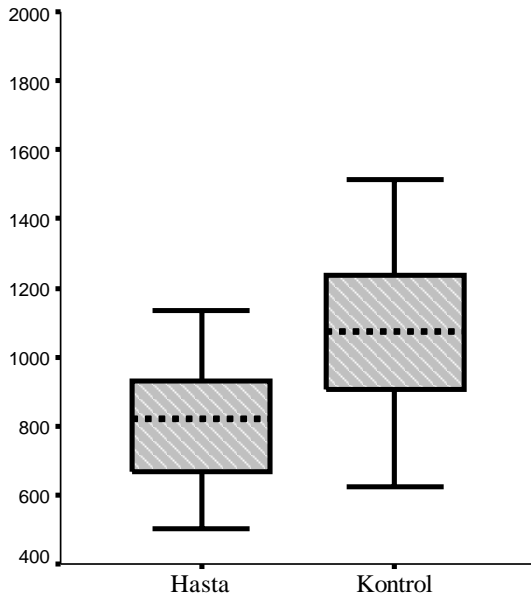
Tablo 5.4. Hasta ve Kontrol grubundaki testler arasındaki korelasyon analizi

Tablo 5.4. de TGF-β1 ile OSI düzeyi arasında anlamlı bir negatif ilişki gözlenmiştir. TGF-β1 artınca OSI düzeyinin azaldığı veya TGF-β1 azalınca OSI düzeyinde arttığı tespit edilmiştir.

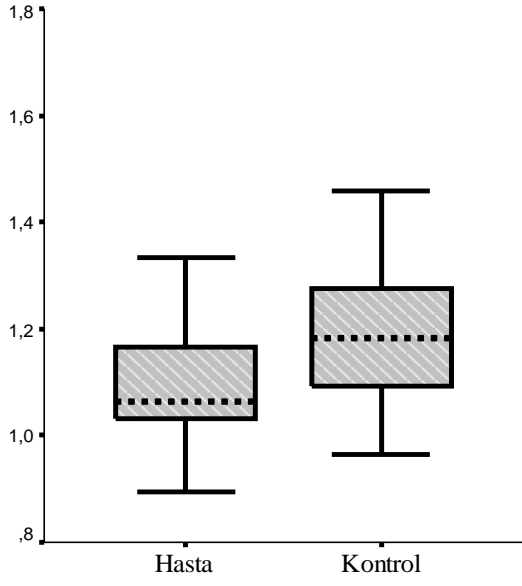


Grafik 5.1. TGF-β1 ile OSI düzeyinin korelasyon analizi

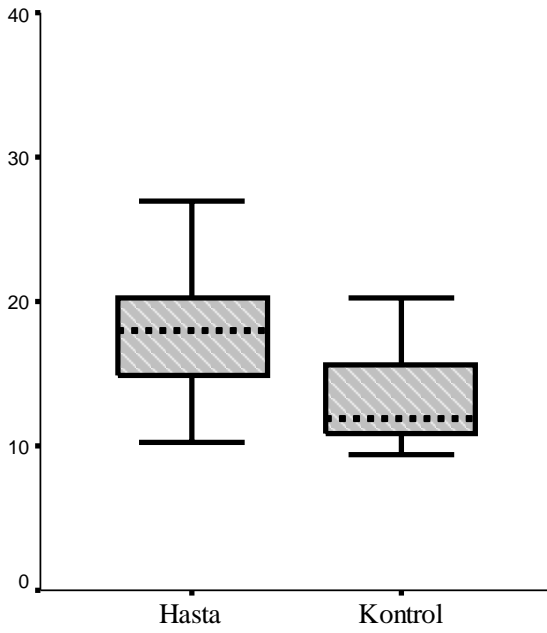
Grafik 5.1. de görüldüğü gibi TGF-β1 ile OSI düzeyi arasında ters orantı bulunmaktadır ve bu korelasyon oldukça anlamlıdır.



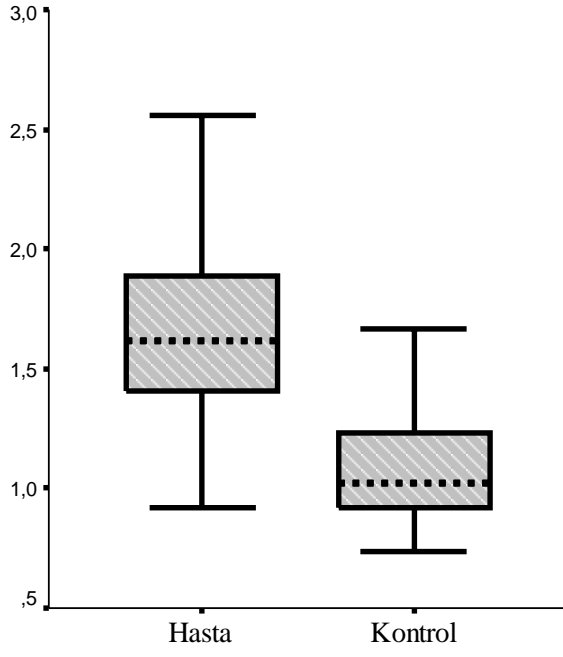
Grafik 5.2. Hasta ve kontrol gruplarının TGF-β1 düzeylerinin arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



Grafik 5.3 Hasta ve kontrol gruplarının TAS düzeylerinin arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



Grafik 5.4. Hasta ve kontrol gruplarının TOS düzeylerinin arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



Grafik 5.5 Hasta ve kontrol gruplarının OSI düzeylerinin arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

7.TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya Sağlık Örgütü'nün de (WHO) belirlemiş olduğu zoonoz hastalıkları arasında en önemlilerinden biri olarak kabul görmüş olan leishmaniasisin, özellikle insanları ,köpekleri ve rodentleri etkileyen başta Akdeniz Bölgesi, Afrika, Asya, Orta ve Güney Amerika olmak üzere dünyanın birçok yerinde yaygın olarak görülmekte olup kendiliğinden iyileşebilen deri formundan (kutanöz leishmaniasis, şark çıbanı), tedavi edilmediği durumlarda ölüme yol açabilen iç organları etkileyen formuna (visseral leishmaniasis) kadar geniş bir yerleşim gösterebilen, genellikle ölümcül seyreden enfeksiyöz, protozoal bir hastalıktır.

Leishmania enfeksiyonlarının kontrolünde, hücrel immünite ile beraber, parazitin virulans faktörleri, tropizmi, patojenitesi ve konağın genetik alt yapısına bağlı olarak geliştirdiği immünite ile vektörün evrimsel açıdan sahip olduğu avantajların tamamının rol aldığı etkileşimler sorumludur.Konakla etkileşimlerinde, doğal bağışık cevap safhaları en temel ve hastalığın gidişini belirleyen en önemli basamaktır (204,205).İlaça direnç artışı giderek çoğalırken erken tanı tedavide büyük önem taşımakla beraber doğru tanı doğru tedavi için önemlidir ve hastalığın iyileşmesinde çok yararlıdır.

Leishmaniasis tanısında birçok yöntem kullanılmaktadır; Direkt mikroskopi, Kültür yöntemleri (Klasik kültür ve mikrokültür yöntemi), serolojik testler ise serumda antikor araştırmasına dayalı olan bir yöntemdir.Serolojik testlerin en önemli testlerinden olanı ELISA yöntemi çok yaygın olarak kullanılmaktadır, duyarlı ve özgül durumdadır. Ancak, immünitesi baskılanmış kişilerde güvenli olarak görülmez.

TGF- β memelilerde yara iyileşmesi sürecinde epitelizasyon, inflamasyon, yeni damar oluşumu ve ekstrasellüler matriksin oluşumunda anahtar rol oynayan regüle edici bir büyüme faktörüdür (207-210).Büyüme faktörlerinin normal ya da gecikmiş yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir.

Memelilerde TGF- β 'nın üç farklı isoformu bulunmaktadır. TGF- β 1, TGF- β 2ve TGF- β 3 proteinleri benzer amino asit içermelerine karşın her biri farklı gen ve kromozomlardan meydana getirilmektedir (211,212).TGF- β süperfamilyası epitelyal hücrelerin büyümesini, farklılaşmasını, apoptoz, motilite ve tümörenezisini düzene sokmaktadır (213). TGF- β çoğunlukla T-hücreleri tarafından üretilmiş olan ekstrasellüler bir proteindir (214).Vücudun bütün hücreleri tarafından eksprese edilen bu sitokin parakrin ve otokrin olarak trombosit, makrofaj, nötrofil, kemik, böbrekler, endometrium, plasenta ve malign hücreler tarafından da

üretilmektedir (215-219). TGF- β trombositlerin alfa granüllerinde yüksek miktarda bulunur. Monositleri uyararak PDGF, FGF, IL-1 ve TNF- α 'nın salınmasına neden olmaktadır. Bunun yanında makrofajlar için kemotaktik, fibroblastlar kemotaksi ve proliferasyonunu uyarma niteliğine sahiptir. Genel olarak TGF- β ekstra sellüler matriks birikimine ve fibrozise neden olur. TGF- β fibroblast kemotaksisini ve bu hücrelerce kollagen ve fibronektin üretimini uyarırken, metalloproteinazlarca hücre dışı matriksin yıkımını inhibe eder. Bütün bu etkiler fibrojenez lehine olup TGF- β kronik iltihabı olaylarda fibrosiz gelişmesinden sorumlu tutulmaktadır (213,220).

TGF- β hücrelerden yüksek molekülle bileşik bir protein olarak salınır. Bu bileşik proteinler; matür TGF- β dimer, LAP (Latency associated protein) ve LTBP (Latent TGF- β binding protein)'dir (221). TGF- β farklı hücreler üzerinde düzenleyici olarak görev alır. Hücre döngüsünün ilerleyişi, migrasyonu, angiogenezis, hematopoezis, kemik şekillenmesi, hücrenin replikasyon ve differansiasyonunda görev alır (222-223). Bu süreçler yara iyileşmesinin önemli safhalarını meydana getirmektedir. TGF- β ekstrasellür matriks üretimini kontrol eder ve hücre replikasyonunda hem inhibitör hem de uyarıcı olarak katkı sağlar (211). Tenaskin, TIMP-1, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), trombospondin, proteoglikan, fibronektin ve kollajen sentezini uyarır. ECM şekillenmesinde bir mediator olarak apoptoz ve morfogenezisi kontrol eder. TGF- β aynı zamanda nöroprotektif bir proteindir (211). İn vivo astrosit kültüründe NGF (Nerve growth factor) sentezini uyarır (225). İnsanlarda hemen hemen tüm hücrelerinde TGF- β reseptörü bulunur (226). Son olarak dokuz membran protein reseptörü tespit edilmiştir (211). Farklı hücre yüzey reseptörleri affiniteye göre değişik TGF- β 'ları bağlar. TGF- β 1 reseptörleri 53 kDa ağırlıklı molekülleri, TGF- β 2 reseptörleri ise 70 kDa ağırlıklı molekülleri bağlayacak şekilde düzenlenmişlerdir. Hücrelerin TGF- β 'ya yanıtı bu reseptörlerin miktarı ile orantılıdır (227). TGF- β yüzey reseptör protein sinyallerini bir intrasellüler protein olarak geçiren Smad proteinlerdir (211,228). Hipertrofik skar ve keloitte ekstrasellüler matriksin aşırı birikimi görülür. Hipertrofik skarda akantoziste artış ile anormal keratinosit diferansiasyonu ve proliferasyonu olduğu son zamanlarda keşfedilmiştir (229). TGF- β farklı moleküler mekanizmalarla hipertrofik skar ve keloid patogeneğinde önemli bir rol oynar. TGF- β üç isoformu yara iyileşmesinde farklı biyolojik aktiviteye sahiptir. TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin fibrozis ve skar şekillenmesine neden olmasıyla beraber TGF- β 3'ün ise skar oluşumunda etkili olmadığı varsayılmaktadır (230). Keloid fibroblast kültürlerinde TGF- β 1 ve TGF- β 2 protein konsantrasyonlarının normal dermal fibroblast kültürleri ile kıyaslandığında yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu TGF- β 1 ve TGF-

$\beta 2$ 'nin fibroze neden olan sitokinler olduklarını destekleyici bir gözlemdir (231). Bunun yanında TGF- $\beta 1$ 'in keloid fibroblastlarda çok yüksek bir kollejen sentezi sağladığı ortaya konmuştur. TGF- $\beta 1$ ile keloid fibroblastları tarafından yapılan kollajen sentez artışına prokollajen tip-1 mRNA düzeylerindeki artış da eşlik etmektedir (211,232).

Kemik şekillenmesi ve iyileşmesinde hem transforming growth faktör beta süperfamilyası (TGF- β s), hem de bone morphogenetic protein (BMPs) önemli rol oynamaktadırlar (211). İn vivo TGF- β 'nın lokal uygulanması ile kondrojenesis ve kemik şekillenmesinde artış olduğu gözlemlenmiştir (233-236). TGF- β aynı zamanda kemik hücrelerinin matris proteinlerinden osteopontin ve osteonektin sentezini uyarır. Tip-1 kollajen, hem kemik organik matrisin % 90'ını oluşturan iskelet yapının hem de kalsifikasyonun ana elementidir. TGF- β tip-1 kollajen sentezini arttırmaktadır (211,237).

TGF- β nın tümörögenizisteki rolü karmaşıktır. TGF- β tümörögenizisin erken safhasında tümör suprese etkisi dışında anti-mitojenik etkisi de bulunmaktadır (213). TGF- β anjiögenizis aktivasyonu yerine tümörün hızlı büyümesi ve metastazı için ekstrasellüler matris üretimi ve immunsüpresyon oluşmasına neden olmaktadır (223,238). TGF- β ekstrasellüler matris sentez degradasyon ve remodeling regülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (239). TGF- β tümör invazyon ve metastaz etkisini TIMP-1, PAI- 1, trombospondin, tenaskin, proteoglikan, fibronektin ve kollajen sentezi stimülasyonu ile sağlamaktadır (211,240).

Buna karşın büyüme faktörlerinin yara iyileşmesi esnasında Leishmaniasis hastalarının iyileşme sürecinde oksidan durumlara etkilerini gösteririr az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sebeple bu tez çalışmasında Leishmaniasis'in patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde TGF- $\beta 1$ nın Leishmaniasis hastalarında seviyesini ve oksidan-antioksidan parametrelerle ilişkisini araştırmayı amaçladık.

TGF- $\beta 1$ seviyesi ELISA yöntemi ile oksidan-antioksidan parametreler ise spektrofotometrik yöntem ile çalışıldı ve çalışılan tüm parametrelerin birbirleriyle korelasyonlarının istatistiksel analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda TGF- $\beta 1$ seviyesi kontrol grubunda ($1095.41 \pm 305.43 \mu\text{mol}$) , hasta grubu ($810.52 \pm 169.98 \mu\text{mol}$)' na göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kalıcı izler bırakarak iyileşme gösteren leishmania lezyonlarında önemli ölçüde makrofaj birikiminin olduğu tespit edilmiştir. TGF- $\beta 1$ 'nin trombosit , makrofaj ve nötrofiller tarafından da üretildiğini dikkate alırsak hasta grubunda TGF- $\beta 1$ seviyesinin daha yüksek olmasını beklerdik. Umulanın aksine düşük

bulunması bize bu hastalarda görülen granüloamatöz lezyonların oldukça dejenaratif hasarlar oluşturduğunu , harap olan ekstrasellüler matriksin kemotaksis ile buraya göç eden makrofaj tipi hücrelerinde , TGF- β 1 gibi sitokinlerin normale göre daha az üretilmesine neden olabileceğini göstermektedir.Ayrıca bu hasta grubumuzda oksitadif stresinde oldukça yüksek bulunması görülerek oksitatif hücrel hasardan dolayı üretiminin artmasını beklediğimiz sitokinlerin üretilmediğini veya üretilse bile oksitatif stres ile yıkıma uğramış olabileceği yönünde düşünmemize yol açmaktadır.

Oksitatif stres, normal metabolizmanın yan ürünü olarak meydana gelebildiği gibi , enfeksiyon, inflamasyon, karsinogenez, ilaç ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisiyle de meydana gelebilmektedir. İnflamatuvar hastalıklarda ve yara iyileşmesinin inflamasyon aşamasında aktif nötrofillerce aşırı miktarda üretilen reaktif oksijen türlerinin doku hasarına sebep olduğu bilinmektedir.Günümüze kadar yapılmış yara iyileşmesiyle ilgili araştırmaların çoğunluğunda yara iyileşmesinde oksijenin yararlı, hipoksinin ise zararlı etkilerinin olduğu sonucu elde edilmiştir (241-243).Yara enfeksiyonunun önlenmesinde de oksijenin rolü olduğu gözlemlenmiştir (242,243).

Yara iyileşmesinin geç yangısal fazında, monositler dokuda makrofajlara dönüştürülmektedir. Bakteri ve endotoksinlerin dolaşıma karışması ile makrofajlar uyarılmış hale geçmektedir.Bu durumda bakteri etkeniyle karşılaşan makrofajların büyüklük ve aktivasyonu ile birlikte makrofajlarda mitokondri, lizozom sayısı ve süperoksit üretimini artırmaktadır. Bu artan reaktif oksijen türlerinin metabolitleri makrofajların yok etme gücünü ileri seviyede arttırır. Ancak makrofajlar tarafından çok fazla miktarda üretilen serbest radikaller rejenere olan deri hücreleri için son derece toksik içeriklidir. Makrofajlar önce fibroblastların üzerinde etkili olmasıyla hücrel çoğalmayı geciktirirler, sonra endotelyal hücreleri etkilemesiyle yarada yeni damar oluşumunu geciktirirler (244).

Makrofajlar, sistemik dolaşımdaki monositlerden veya mevcut dokudaki mononükleer hücrelerden kaynaklanan, fagositoz yapan hücrelerdir. Ancak makrofajlar sadece fagositoz yapmakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli sitokin, büyüme faktörleri ve NO sentezlerini gerçekleştirirler (245).

Fagositoz; yabancı cisimciklerin, mikroorganizmaların, hasarlı ve ölü doku hücreleri ve savunma hücrelerini hücre içine alınması, yıkılması ve ortadan kaldırılması işlemlerini kapsayan bir olaydır.Fagositozun ilk safhası; fagositik hücrenin virüs ve bakterilere yapışmasıdır. Bu süreç kapsülsüz bakteri ve proteinlere karşı duyarsız haldedir. Kan

proteinleri virulent bakterilerin etrafında bir film oluşturarak lökositlerin yapışmalarını kolaylaştırır ve onları fagositoza hazırlar. Diğer bakteriler yüzeylerinde böyle özel antikorlarla çevrelenmezlerse fagosite edilemezler. Sonraki safhada fagositik hücrelerde psödopodlar oluşur. Psödopodlar, sitoplazmanın, partiküllerin etrafına akışını ifade etmektedir. Psödopodların, partikülün tamamını sarıp içlerine almaları sürecine de fagozom oluşumu adı verilmektedir. Fagozom hücre içerisine alındıktan sonra lizozom ile birleşerek fagolizozom adını alır. Bu yapı, hidrojen peroksit, reaktif oksijen türleri (serbest radikaller), peroksidaz, lizozom ve hidrolitik enzimleri ve etkileşimleri içermektedir. Fagositozun son safhası, mikropların öldürülmesi ve parçalanması işlemidir. Bakteriler ve diğer mikropların öldürülmesi büyük ölçüde reaktif oksijen tüketilmesinde ani artış, glikojen katabolizması, glikoz oksidasyonunda artış ve reaktif oksijen türleri ile sağlanır (245).

Fagositozu takiben nötrofiller, monositler ve makrofajlar ; oksijen tüketiminde ani artış, glukoz oksidasyonunda artış ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile karakterize edilmiş oksidatif bir patlamayı uyarmaktadır. Pentoz fosfat yolu aktivasyonun neden olduğu bir glukoz katabolizmasında artış meydana gelmektedir. Bu olay solunumsal patlama (respiratory burst) olarak adlandırılmakta ve reaktif oksijen türlerinin üretim ve salınımıyla ilgili olduğu söylenmektedir (245,246).

Nötrofillerin mikrobisit aktiviteleri, oksijeni toksik olan süperoksit anyonlarına ve hidrojen perokside dönüştürebilen enzim sistemleri üzerine oturmaktadır. Nötrofillerin hücre membranındaki NADPH bağımlı oksidaz sistemi, süperoksit oluşmasını sağlayan önemli bir kaynaktır. Bakteri, mitojen, opsonize partiküller, immün kompleksler , arasinonik asit, lektinler ve metabolizma ürünleri gibi etkenlerle bu enzim aktive olur. Oluşan süperoksit çoğunlukla spontan reaksiyon veya süperoksit dismutaz enzimi ile hidrojen perokside dönüşmektedir. Üretilen hidrojen peroksit miktarı genellikle birçok bakteriyi öldürmeye yeterli olmamaktadır ve klorür varlığında MPO enzimi hidrojen peroksidi HOCl'ye dönüştürmektedir. HOCl antimikrobiyal ve kuvvetli oksidan ajanı olabilmektedir. Bakteriyi halojenasyonla veya lipit peroksidasyonuyla yok etmektedir. Oksidatif patlama aracılığıyla fagolizozomal içerik sindirilir ve bunun sonrasında ekzositoz ile dışarıya atılır (247). Bizim hasta grubumuzda da toplam oksidatif durum oldukça yüksek bulundu. Leishmania parazitinin stimülasyonu veya özellikle yara bölgesine göç eden nötrofil ve makrofajların neden olduğu respiratov burst'den dolayı artan oksidanlar oksidatif stres indeksini de anlamlı oranda yükselmesine neden olmuştur.

Yara iyileşmesi esnasında iNOS'un makrofajlar, keratinositler ve fibroblastlar tarafından eksprese edildiği bilinmektedir. Literatürde, yaralanmadan 6 ila 24 saat sonra hemen hemen tüm makrofajlarda iNOS ekspresyonu olduğu ve inflamasyonlu periodontal dokularda iNOS aktivitesinin ve NO seviyelerini yükselttiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (248,249). Benzer olarak Kendall ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da sağlıklı bireylerin dişeti dokusuna kıyasla inflamasyonlu insan dişeti dokusunda, iNOS aktivasyonunun artmış olduğu gösterilmiştir (250). Bununla birlikte Reichner ve arkadaşları ratlarda yaptıkları çalışmada iNOS pozitif makrofajların, yaralanmadan sonraki 1. günde artmış olduğunu, yaralanmayı takip eden 3. ve 5. günlerde de bu makrofajlardaki iNOS aktivasyonunun azaldığını bildirmektedirler (248).

Daha öncede yapılmış olan TGF- β uygulamasının ağız yara dokusu oksitativ olaylara olan etkisi çalışmasında (251) eksojen olarak uygulanan TGF- β 1' in oral yara iyileşmesinin farklı günlerinde MDA, NOx, GSH, SOD ve AA seviyelerine olan etkisi araştırılmış. Ağız mukozasında cerrahi kesi yarasına TGF- β uygulamasının, ağız içi yara dokusu oksidan olayları üzerine etkilerini, zamana bağımlı olarak araştırılması planlanmıştır.

Yaralanmadan sonraki 1., 3. ve 5. günlerde tavşanlar kulak veninden aşırı miktarda sodyum pentobarbital verilerek kullanılmıştır. Yara dokuları hemen çıkarılarak, lipid peroksidasyonunun belirteci olan malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NOx), değerli antioksidanlar olan glutatyon (GSH), askorbik asit (AA) düzeyleri ve superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi spektrofotometrik yöntemle ölçülmüş. Sonuçlar Anova Varyans Analizi yöntemi ile karşılaştırılmış. Neticesinde ekzojen TGF- β uygulamasının yara iyileşmesinin özellikle 3. gününde MDA, SOD, NOx ve AA seviyelerini arttırdığı tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda bu çalışmayla uyumlu olarak TGF- β 'nın oksidan antioksidanlarla ilişkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda TGF- β 1 seviyesi hasta grubunda artarken OSI seviyeleri azalmakta ve aralarında anlamlı bir resiprokal ilişki tespit edilmiştir. Oksitativ stresin fazla yükselmesi TGF- β 1 sitokinini üreten ve kemotaksis yoluyla leishmanial lezyon bölgesine göç etmiş olan hücrelerde oksitativ hasar meydana getirmekte dolayısıyla TGF- β 1 seviyeleri yükselmesi bekleniyorken düşük bulunmuştur.

TGF- β 1 nin Leishmaniasis hastalarında seviyesini ve oksidan-antioksidan parametrelerle ilişkisi araştırılarak Leishmaniasis'in patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi hususunda yeni bir adım atılmaya çalışılmıştır. Bulgularımızın ışığında, leishmania hastalarında oksitativ stresin oldukça yükselerek normal yara iyileşmesine katkıda bulunan veya bulunması beklenen TGF- β 1 gibi sitokinlerin üretimini engellediği ya da hasara uğratarak fonksiyon görmesine engel olduğunu

söyleyebiliriz.Buna göre bu hastalarda oksitatif stresle mücadele etmenin sadece oksitatif hasarı önlemekle kalmayıp TGF- β 1 üretimini de artırarak kalıcı skarlar oluşturan leishmanial lezyonların daha kolay iyileşmesinide sağlayabileceği kaanatine varmaktayız.Fakat sonuçlarımızın daha geniş hasta popülasyonunda yapılacak daha detaylı ve uzun süreli çalışmalarla teyit edilmesi gerekmektedir.



8. KAYNAKLAR

1. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. Peters W, Killick-Kendrick R, eds. The leishmaniasis in biology and medicine. Biology and epidemiology, 1987; 1: 1-120.
2. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007; 37(10): 1097–1106.
3. Pearson RD, Queiroz Sousa A. *Leishmania* species: visceral (kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. Mandell GL, Douglas RG Jr, Bennett JE, eds. Principles and Practice of Infection Diseases, 2005; 265: 2460-2492.
4. Paul, Christoph, et al. "Mast cells have no impact on cutaneous leishmaniasis severity and related Th2 differentiation in resistant and susceptible mice." *European journal of immunology* 46.1 (2016): 114-121
5. Kılıç SS. Kala-azar ve Diğer *Leishmania* İnfeksiyonları. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M, eds. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2002; 1: 685-696.
6. Kuman HA. *Leishmania* Türleri . İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M, eds. Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul, 2002; 2: 1870-1878.
7. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999; 354: 1191-1199.
8. Kocabaş E, Antmen B, Alhan E, Yıldıztaş D, Aksaray N. Çocukluk çağında kala-azar. *Cukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1998; 23(2): 95-101.
9. Köktürk A, Baz K, Aslan G, Kaya T, Yazıcı C A, İkizoğlu G, Camdeviren H. İçel’de Kutanoz Leishmaniasis’in Durumu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 2002; 26(4): 367-369.
10. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95: 239–243.
11. Pearson RD, Sousa ADQ, Jeromino SMB. *Leishmania* species : visceral (kala-azar) , cutaneous and mucosal leishmaniasis. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Douglas and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; 2831-2844.
12. Bulle B, Millon L, Bart JM, Gallego M, Gambarelli F, Portus M, Schnur L, Jaffe C L, Fernandez BS, Alunda JM, Piarroux R. Practical Approach for Typing Strains of *Leishmania infantum* by Microsatellite Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3391–3397.
13. World Health Organization web sayfası. <http://www.who.int/dr/diseases/leish/default.htm>. Erişim tarihi: 27.05.2015.
14. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 2012; 7(5): e35671.
15. Wilson ME, Jeronimo SMB, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing leishmania species. *Microb pathog.* 2005; 38(4): 147-160.
16. Korkmaz M , Ok UZ. Parazitolojide Laboratuvar . Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir, 2011; 23: 307,308.
17. Cox, Francis EG. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(4): 595–612.
18. Manson-Bahr PEC. Old World leishmaniasis. Francis EG, Cox, eds. The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases, 1996; 206–217.
19. Unat EK. Leishmaniaların tarihçesi. *Leishmaniasis*. Yaşarol Ş, ed. 1981; 1-10.
20. Ak M, Özbek Y, Özensoy S, Turgay N. Visseral Leishmaniasis İmmun yetmezlikte önemi artan parazit hastalıkları. Özcel MA, ed. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları. Ege Üniversitesi Basım Evi-Bornova, İzmir, 1995; 69-107.

21. Özcel MA. Parazit Hastalıklarında Tanı. 1. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1997.
22. Özcel MA, Özbel Y, Ak M. Tıbbi Parazit Hastalıkları. Özcel MA, ed. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, Ege Üniversitesi Meta Basım, Bornova, İzmir, 2007; 22: 200-201.
23. Kuman HA, Altıntaş N. Protozoon Hastalıkları. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1996; 79-100.
24. Markell EK, John DT, Krotoski WA. Markel and Voge's Medical Protozoology. 8th Edition. WB Saunders Company, 1999; 123-188.
25. Yatawara L, Le TH, Wickramasinghe S, Agatsuma T. Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of *Leishmania major*: gene content, arrangement and composition compared with *Leishmania tarentolae*. *Gene*, 2008; 424(1-2): 80-86.
26. Mahboudi F, Abolhassani M, Tehrani SR, Azimi M, Asmar M. Differentiation of old and new world *Leishmania* species at complex and species levels by PCR. *Scand J Infect Dis*. 2002; 34(10): 756-758.
27. Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H. Moleküler Parazitoloji. Meta Basım Matbacılık Hizmetleri, İzmir, 2009; 407-424.
28. Hajjaran H, Vasigheh F, Mohebbali M, Rezaei S, Mamishi S, Charedar S. Direct diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. *J Clin Lab Anal*. 2011; 25: 20-24.
29. Myler PJ. Genome structure and content in *Leishmania*: After the genome. Myler PJ, Fasel N, eds. Caister Academic Press, 2008.
30. Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol*. 2007; 37(11): 1173-1186.
31. Dahlin-Laborde RR, Scolaro EJ, Romine NM, Ramer-Tait AE, Lei SM, Beetham JK. Characterization of DNA sequences that confer complement resistance in *Leishmania chagasi*. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1149(1): 347-351.
32. Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 659-688.
33. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7: 581-596.
34. Klaus SN, Frankenburg S, Dhar AD. Leishmaniasis and Other Protozoan Infections. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, eds. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 6th Ed. 2003; 2215-2224.
35. Waitumbi J, Warburg A. *Phlebotomus Papatasi* Saliva Inhibits Protein Phosphatase Activity and Nitric Oxide Production by Murine Macrophages. *Infect Immun*. 1998; 66: 1534-1537.
36. Harman M. Leishmaniasis Kutis Tedavisi. Tuzun Y, Serdaroğlu S, eds. Dermatolojide Gelişmeler-8. Umur Basım ve Kırtasiye San. ve Tic. A.Ş., İstanbul, 2009; 32-35.
37. Alptekin D, Kasap M, Luleyap U, Kasap H, Aksoy S, Wilson ML. Sandflies (Diptera: Phlebotomidae) associated with epidemic cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa, Turkey. *J Med Entomol*. 1999; 36: 277-281.
38. Toprak S, Ozer N. Sand fly species of Sanliurfa province in Turkey. *Med Vet Entomol*. 2005; 19: 107-110.
39. Volf P, Ozbel Y, Akkafa F, Svobodova M, Votypka J, Chang KP. Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey relationship of *phlebotomus sergenti* with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *J Med Entomol*. 2002; 39: 12-15.
40. Sanchez JL, Diniega BM, Small JW. Epidemiologic investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 1992; 47: 47- 54.

41. Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. *Postgrad Med J.* 2006; 82: 649–657.
42. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 298-319.
43. Reus M, García B, Vázquez V, Morales D, Fuster M, Sola J. Visceral leishmaniasis: diagnosis by ultrasound-guided fine needle aspiration of an axillary node. *Br J Radiol.* 2005; 78: 158–160.
44. Del Olmo ML, Aller de la Fuente R, Velayos Jiménez B, Fernández Salazar L, González Hernández JM. Visceral leishmaniasis diagnosed by duodenal biopsy. *Rev Esp Enferm Dig.* 2009; 101: 439–440.
45. Artan R, Yilmaz A, Akçam M, Aksoy NH. Liver biopsy in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 21: 299–302.
46. El Hassan AM, Ghalib HW, Zijlstra EE. Post –kala-azar dermal leishmaniasis in the Sudan: Clinical features, pathology and treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992; 83: 245-248.
47. Pearson RD, Saosa AD, Jeronimo SM. Leishmania species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. G.L. Mandell., J.E. Bennett, R. Dolin, eds. *Principles and Practise Of Infectious Diseases.* Philadelphia: Churchill-Livingstone, 2005; 2831-2841.
48. Desjeux P. Leishmaniosis. Guerrant, Walker, Weller, eds. *Tropical Infectious Diseases Principles, Pathogens and Practise.* Churchill and Livingstone, 2005; 884-1722.
49. Garcia LS. Leishmaniasis. *Diagnostic Medical Parasitology.* Washington DC. ASM Press. 2001; 205-234.
50. Yemisen, M., Ulas, Y., Celik, H., & Aksoy, N. (2012). Epidemiological and clinical characteristics of 7172 patients with cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa, between 2001 and 2008. *International journal of dermatology*, 51(3), 300-304
51. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitol.* 2008; 24: 324–330.
52. Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur J Epidemiol.* 1999; 15: 271-276.
53. Eduardo AFC, Laura R, Mariana AFC. Specific Serodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis Using Leishmania Species Ribosomal Protein Extracts. *Clinical and vaccine immunology*, 2009; 1774–1780.
54. Maroli M, Mizzoni V, Siragusa C. Evidence for an impact the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern italy. *Med Vet Entomol.* 2001; 15: 358-363.
55. Agut A. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Vet Rec.* 2003; 153: 648–652.
56. Chang KP, McGwire BS. Molecular determinants and regulation of Leishmania virulence. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2002; 1(1): 1.
57. Rivas L, Moreno J, Canavate C, Alvar J. Virulence and disease in leishmaniasis: What is relevant for the patient? *Trends Parasitol.* 2004; 20: 297-301.
58. Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during Leishmania infections. *Parasitol Today.* 2000; 16: 246-250.
59. Pearson RD, Sousa ADQ, Jeronimo SM. Leishmania Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005; 2831-2841.
60. Markell EK, John DT, Krotoski WA. *Markell and Voge's Medical Parasitology.* W.B. Saunders Company, 7 th Edition, 1992; 148-160.

61. TDR News. WHO/TDR-CTD/HH. 1990; 90(1): 14-15.
62. Unat EK. Tıp Parazitolojisi. Ist Univ Cerr Tıp Fak Yayın. 1991; 162: 564-565.
63. Byrceson ADM. Leishmaniasis, Manson's Tropical Diseases. Cook GC, ed. Twentieth Edition, WB Saunders Company Ltd. London, 1996; 1213-1245.
64. Ohan V, Yasarol S. Leishmania'ların Morfolojisi, Fizyolojisi ve Evrimi, Leishmaniasis. Yasarol S, ed. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 1981; 2: 11-25.
65. Pinto-Da-Silva LH, Fampa P, Soares DC, Oliveira SM, Souto-Padron T, Saraiva EM. The 3A1-La monoclonal antibody reveals key features of Leishmania (L) amazonensis metacyclic promastigotes and inhibits procyclics attachment to the sand fly midgut. Int J Parasitol. 2005; 35: 757-764.
66. Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 298-319.
67. Alexander J, Satoskar AR, Russhell DG. Leishmania species: Models of intracellular parasitism. J Cell Sci. 1999; 18: 2993-3002.
68. Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to Leishmania: Mechanisms of parasite control and evasion. Int J Parasitol. 1998; 28: 121-134.
69. Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immunol. 2002; 3: 1041-1047.
70. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. Nat Rev Immunol. 2002; 2: 845-858.
71. Özcel MA. GAP'ı Tehdit Eden Parazit Hastalıkları. 1. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1995; 97-131.
72. Töre O. Protozooloji. Kılıçturgay K, Editörler. Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji, 2. Baskı, Güneş & Nobel Tıp Kitabevleri, 1996; 251-267.
73. Özçelik S. Kamçılı Protozoonlar ve Yaptıkları Hastalıklar. Ustaçelebi Ş, ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitapevi, Ankara, 1999; 1191-1207.
74. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji, 1. Baskı, Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas, 1998; 58-67
75. Frederic L, James J. Cultivation of clinically significant hemoflagellates. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(3): 374-389.
76. Özensoy S, Ozbel Y, Turgay N. Serodiagnosis and epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Turkey. Am J Trop Med Hyg. 1998; 59: 363-369.
77. Rosario EY, Genaro O, Silva J, Costa R. Evolution of enzyme-linked immunosorbent assay using crude leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for Canine Visceral Leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100(2): 197-203.
78. Costa SR, D'Olivera A, Bacellar O, Carvalho EM. T Cell Response of Asymptomatic Leishmania Chagasi Infected Subjects to Recombinant Leishmania Antigens. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(3): 367-370.
79. Handemir E, Kaya N, Şenlik B, Kamburgil K. Askeri Personelde Visceral Leishmaniasis Seroprevalansı. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2002; 26(1): 31-33.
80. Korkmaz M, Ok ÜZ. Parazitolojide Laboratuvar. Özcel MA, Üner A, Ertuğ S, eds. Parazitolojide İmmunofluoresans. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, İzmir, 2011; 23: 209-219.
81. Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Suffia I, Eulalio M, Gari-Toussaint M. Detection by Western Blot of Four Antigens Characterizing Acute Clinical Leishmaniasis due to Leishmania Infantum. Trans R Soc Med Hyg. 1995; 89: 690-691.
82. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Douglas C. PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania. J Clin Microbiol. 2002; 40(2): 601-606.
83. Murray HW. Clinical and Experimental Advances in Treatment of Visceral Leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 2185-2197.

84. Roy A, Chowdhury S, Sengupta S, Mandal M, Jaisankar P, D'Annessa I, Desideri A, Majumder HK. Development of derivatives of 3, 3'-diindolylmethane as potent *Leishmania donovani* Bi-subunit topoisomerase IB poisons. *Plos One*, 2011; 6(12): 284-293.
85. Zhao S, Zhang D, Li L, Mao Q. Acute renal injury as a result of liposomal amphotericin B treatment in sodium stibogluconate unresponsive visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85(6): 1035-1037.
86. Piarroux R, Gambarelli F, Duman H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Qulici M. Comparison of PCR with Direct Examination of Bone Marrow Aspiration, Myeloculture and Serology for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Immunocompromised Patients. *J Clin Microbiol*. 1994; 746-749.
87. Ozbilge, H., Aksoy, N., Kilic, E., Saraymen, R., & Vural, H. (2005). Evaluation of oxidative stress in cutaneous leishmaniasis. *The Journal of dermatology*, 32(1), 7-11.
88. Hepburn NC, Omer AHS. Old world cutaneous leishmaniasis: pathology, clinical features, differential diagnosis and therapy. Gilles Hm, ed. *Protozoal Diseases*, 10th Ed, London Oxford unv. Press. 1999; 471-480.
89. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*. 2000; 25: 363-370.
90. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis an overview. *J Postgrad Med*. 2003; 49: 50-54.
91. Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current opinion in infectious diseases*, 2003; 16(5), 397-401.
92. Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* . 1985; 27(6), 916-920.
93. Heart D, Langridge A, Barlow D, Sutton B. Molecular strategies for antileishmanial drug design. *Nato ASI on Leishmaniasis: the first centenary (1885-1985) the current status and new strategies for control. Greece-Zakinthos*, 1987; 693-697.
94. Kikuth W, Schmith H. Contribution to the progress of antimony therapy of kala azar. *Chin Med J*. 1937; 52(3), 425-432.
95. Memişoğlu HR, Kotoğyan A, Acar MA, Özpoyraz M. Leishmaniasis. *Dermatoloji. Tüzün Y, Kotoğyan A, Aydemir EH, Baransü O, eds. İstanbul*, 1994.
96. Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2002; 106(4): 315-324.
97. Merdivenci A. *Medikal Protozooloji. İst. Üniv. Cerr. Tıp Fakültesi Yayınları*, 1981; 80: 117-123.
98. Unat EK. *Tıp Parazitolojisi ,İnsan Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları*, 3. Basım, İst. Üniv. Tıp Fak. Yay. 1982; 113.
99. Lewis DJ. The Phlebotomine sandflies (Diptera : Pyschodide) of the oriental region. *Bulletin of the British Museum (Natural History), B. Entomology*, 1978; 37(6): 217-343.
100. Lane RP. Sandflies(Phlebotomidae). *Medical Insects and Arachnids*. Springer Netherlands, 1993; 78-119.
101. Wenyon CM. The transmission of *Leishmania* Infections a Review. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1932; 25(5): 319-348.
102. Cihakova J, Volf P. Development of different *Leishmania major* strains in the Vector sandflies *Phlebotomus papatasi* and *P.duboscqi*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1997; 91(3): 267-280
103. Mukhopadhyay J, Ghosh K, Braig HR. Identification of Cutaneous Leishmaniasis Vectors , *Phlebotomus papatasi* and *P. Duboscqi* using Random Amplified Polymorphic DNA. *Acta Trop*. 2000; 76(3): 277-283.

104. Adini I, Jacobson RL, Kasap M, Schlein Y, Jaffe CL. Species-Specific Detection of Leishmania in sandflies Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998; 92(1): 35-37.
105. Bayazit Y. Şanlıurfa İli Şehir Merkezinde Cutaneous leishmaniasis (CL) prevalansı Araştırması . H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Bilim Uzmanlığı Tezi, Şanlıurfa, 1999.
106. Doğan F. Leishmania enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, Leishmaniasis , Kala-Azar ve Şark Çıbanı. 2. Ulusal Parazitoloji Kongresi Ankara, 3-5 Haziran 1981. Yaşarol Ş, ed. Ege Üniversitesi Matbaası , İzmir, 1981; 25-50.
107. Le Pont F. Report of a Mission to the Leishmaniasis Foci Düziçi and Şanlıurfa in Turkey. *IRD, Département Santé,* 1994; 213: 18.
108. Balcıoğlu İC, Özensoy S, Yereli K, Turgay N, Değerli K, Özbilgin A, Özbel Y. Manisa ve yöresindeki 1990 ve 1995 yılları arasında Kala-Azar olguları ve saptanan Phlebotomus türleri. *T Par Derg.* 1996; 20(3-4): 367-373.
109. Aslan G, Seyrak A, Tascı S. Cutaneous leishmaniasis in Şanlıurfa. *Acta Parasitologica Turcica,* 1997; 21(1): 136.
110. Özbel Y, Aklan MZ, Özensoy S, Turgay N, Babaoğlu A, Özcel MA. Distribution of Phlebotomine Sandflies and Epidemiology of Canine Visceral leishmaniasis In Turkey. *Acta Parasitologica Turcica.* 1997; 21(1): 161.
111. Alten B, Çağlar SS. Malaria and Cutaneous leishmaniasis control trial using pyrethroid impregnated bednets in Southeast Anatolia (Şanlıurfa)-Turkey. *AVENTİS Environmental Science and Hacettepe University.* 2001; 63: 151.
112. Özbel Y, Ruhuyan N, Budak S. İzmir Bölgesinde Phlebotomus Türleri Üzerinde İncelemeler. *T Par Der.* 1993; 17(3-4): 101-107.
113. Anonymous. Control of the Leishmaniasis, World Health Organization Technical Report Series , World Health Org. Geneva 1990; 793.
114. Lewis DJ. Phlebotomidae and Psychodidae (Sandflies and Moth flies). Smith GV, ed. *Insects and other Arthropods of Medical Importance,* 1973.
115. Desjeux P. Pyrethroid impregnated bednets :An alternative vector control approach for leishmaniasis. Çağlar S, Alten B, Özer N, eds. *Proceeding of the 13th European SOVE Meeting.* Belek: Society for Vector Ecology, 2000; 152.
116. Maroli M, Gradoni L, Mizzoni V, Siragusa C, Orazi DA. Field studies deltamethrin impregnated dog collars to control canine leishmaniasis transmission in an endemic focus of southern Italy. *PARASSITOLOGIA,* 2000; 42: 117-117.
117. Alten B, Çağlar SS. Vektör Ekolojisi ve Mücadelesi. TC Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koord. Bizim Büro Basımevi, Ankara, 1998: 242.
118. Daldal N, Özbel Y. Phlebotomus spp., Vektörlükleri ve Kontrolü. Özcel MA, Daldal N, eds. *Parazitolojide Artropod Hastalıkları, Vektörler: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları,* 1997; 13: 49-109.
119. Erel D. Anadolu Vektörleri ve Mücadele Metodları. SSBH Hıfz Okulu Yay. 1973; 47
120. Killick-Kendrick R. The Biology of Leishmania in Phlebotomine sandflies. Lumsden WHR, Evans DA, eds. *Biology of Kinetoplastida.* 1979; 2: 395-460.
121. Warburg A, Schlein Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of Phlebotomus papatasi on the transmission of Leishmania major. *Am J Trop Med Hyg.* 1986; 35(5): 926-930.
122. Oğuzoğlu I, Toprak Ş, Özer N. Entomopathogenic nematodes versus Musca domestica , Aedes aegypti and Phlebotomus papatasi. Çağlar S, Alten B, Özer N, eds. *Proceeding of the 13th European SOVE Meeting,* 2000; 275.
123. Steenfos HH. Growth factors and wound healing. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1994; 28: 95-105.
124. Canalis E. Growth factors and their potential clinical value. *J Clin Endocrinol Metab. Clinical Review,* 1992; 75 (1): 1-4.

125. Fisher DA, Lakshmanan J. Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals. *Endoc Rev.* 1990; 11(3): 418-422.
126. Ganong WF. Growth Factors. *The General and Cellular Basis of Medical Physiology. Review of medical physiology, Chapter 18.* Edition, 1999; 42-43.
127. Gope R. The effect of epidermal growth factor & platelet derived growth factors on wound healing process. *Indian J Med Res.* 2002; 116: 201-206.
128. Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell*, 1991; 64: 271-280.
129. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg.* 1993; 165: 728-737.
130. Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990; 6: 597-641.
131. Amento EP, Beck LS. TGF-beta and wound healing. *Ciba Found Symp.* 1991; 157: 115-123.
132. Einhorn T. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg.* 1995; 77(6): 940-956.
133. Wirthlin MR. Growth substances: potential use in periodontics. *The Journal of the Western Society of Periodontology/Periodontal abstracts*, 1989; 37(3): 101-125.
134. Bonewald LF, Mundy GR. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop.* 1990; 250: 261-276.
135. Lind M. Growth factors, possible new clinical tools: a review. *Acta Orthop Scand.* 1996; 67(4): 407-417.
136. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF beta in hepatic fibrosis. *Frontiers in Bioscience.* 2002; 7: 793-807.
137. Fujii D, Brissenden JE, Derynck R, Francke U. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to Mouse chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet.* 1986; 12: 281-288.
138. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003; 113: 685-700.
139. TGF- β ' nin sinyalizasyon yolu. <http://flipper.diff.org/app/items/info/2983> (2011).
140. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci.* 2004; 35: 83-92.
141. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta. *Lancet.* 1992; 339: 213-214.
142. Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. A role for oxidative stress. *Contrib Nephrol.* 2011; 174: 138-148.
143. Vatko M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chem-Biol Interact.* 2006; 160: 1-40.
144. Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J.* 1998; 135: 115.
145. Murray RK, Granner DK, Mayes RA, Rodwell VW. Fizyolojik öneme sahip lipitler. Dikmen N, Özgünen T, eds. *Harper'in Biyokimyası*, 24. Baskı. İstanbul: Barış Kitapevi, 1996.
146. Sole J, Huguet J, Arola L, Romeu A. In vivo effects of nickel and cadmium in rats on lipid peroxidation and ceruloplasmin activity. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1990; 44: 686-691.
147. Shacter E. Protein oxidative damage. *Meth Enzymol.* 2000; 319: 428-436.
148. Chesemann KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bulletin.* 1993; 49(5): 481-493.

149. Swallow AJ. Radiation chemistry of organic compounds. New York, John Wiley & Sons. 1960; 211-224.
150. Garrison WM, Jayko ME, Bennet W. Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution. *Rad Res.* 1962; 16: 483-502.
151. Schuessler H, Schiling K. Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. *Int J Radiat Biol.* 1984; 45: 267-281.
152. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003; 9: 169-176.
153. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003; 329: 23-38.
154. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 899: 191-208.
155. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 1997; 324: 1-18.
156. Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H. Effect of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett.* 1996; 385: 63-66.
157. Halliwell B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo. *FEBS Lett.* 1997; 411: 157-160.
158. Ischiropoulos H, Al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modification. *FEBS Lett.* 1995; 364: 279-282.
159. Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock inflammation and ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 1996; 6: 76-88.
160. Ter Steege JCA, Kaster-Kamphuis L, van Straaten EA, Forget PP, Buurman WA. Nitrotyrosine in plasma of clac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. *Free Radiac Biol Med.* 1998; 25: 953-963.
161. Alderman CJJ, Shah S, Foreman JC, Chain BM, Katz DR. The role of advanced oxidation protein products in regulation of dendritic cell function. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32: 377-385.
162. Witko V, Nguyen AT, Descamps-Latscha B. Microtiter plate assay for phagocyte-derived taurine chloramines. *J Clin Lab Anal.* 1992; 6: 47-53.
163. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996; 49: 1304-1313.
164. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Cantelow S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.* 1998; 161: 2524-2532.
165. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000; 32: 307-326.
166. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radiac Biol Med.* 1999; 27: 1151-1163.
167. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 357-363.
168. Blix G, Lindberg E, Odin & Werner L. The carbohydrate groups of the submaxillary mucin. *Nature.* 1995; 175: 340-341.
169. Champe PC, Harvey RA. Glikozaminoglikanlar. A. Tokullugil, M. Drican, E. Ulukaya, editörler. Lippincott's illustrated reviews serisinden: Biyokimya İkinci Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 1997.

- 170.Schauer R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology*. 2004; 107: 49-64.
- 171.Crook M, Constable S, Lumb P, Rymer J. Elevated serum sialic acid in pregnancy. *J Clin Pathol*. 1997; 50: 494-495.
- 172.Chefalo P, Pan Y, Nagy N, Harding C, Guo Z. Preparation and immunological studies of protein conjugates of N-acylneuraminic acids. *Glycoconjugate J*. 2004; 20: 407-414.
- 173.Dnistrian AM, Schwartz MK, Katopoldis N ve ark. Serum lipid bound sialic acid as a marker in breast cancer. *Cancer*, 1982; 50: 1815-1819.
- 174.Dwivedi C, Dixit M, Kumar SS ve ark. Plasma sialic acid alterations in neoplastic diseases. *J Med*. 1987; 18: 323-327.
- 175.Gressner AM, Henn WKH. Zur klinischen Wertigkeit der Sialinsäure im Serum bei benignen und malignen Erkrankungen. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1987; 25: 423-430.
- 176.Shamberger RJ. Serum sialic acid in normals and in cancer patients. *J Clin Chem Biochem*. 1984; 22: 647-651.
- 177.Tumer GA, Skiler AW, Buomah P ve ark. Relation between raised concentrations of fucose, sialic acid and acute phase proteins in serum from patients with cancer. Choosing suitable serum glycoprotein markers. *J Clin Pathol*. 1985; 38: 588-592.
- 178.Sillanauke P, Pönniö M, Jaakelainen IP. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest*. 1999; 29: 413-425.
- 179.Kökoğlu E, Uslu I, Hatemi H. Serum and tissue total sialic acid as a marker for human thyroid cancer. *Cancer Letters*, 1989; 46: 1-5.
- 180.Sydow G. A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. *Biochem Acta*. 1985; 44: 1721-1723.
- 181.Simic MG. DNA markers of oxidative processes in vivo: relevance to carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 1994; 54: 1918-1923.
- 182.Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Dotsuyama A, Tanaka H. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*, 1986; 7: 1849-1851.
- 183.Sen P, Costa M. Incidence and localization of sister chromatid exchanges induced by nickel and chromium compounds. *Carcinogenesis*, 1986; 7: 1527-1533.
- 184.Sugiyama M, Wang XM, Costa M. Comparison of DNA lesions and cytotoxicity induced by calcium chromate in human, mouse and hamster cell lines. *Cancer Res*. 1986; 46: 4547-4551.
- 185.Kasai H, Nishiura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucl Acids Res*. 1984; 12: 2137-2145.
- 186.Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239-257.
- 187.Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980; 68: 251-306.
- 188.Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle and neurodegeneration. *J Clin Invest*. 2003; 111(6): 785-793.
- 189.Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 2000; 7(3): 153-163.
- 190.Roshal M, Zhu Y, Planelles V. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*, 2001; 6: 103-116.
- 191.Scott WL, Athena AL. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 2000; 21(3): 485-495.
- 192.Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Published online: 30 October 2008; doi 10.1038/nrm2529.
- 193.Maiolino G, Rossitto G, Caielli P, Bisogni V, Rossi GP, Calo LA. The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: The myths and the facts. *Mediators of Inflammation* 2013; Article ID: 714653, 13 pages.

- 194.Percival M. Antioxidants. Clin Nutr Insights 1/96 Rev. 10/98
<http://acudoc.com/Antioxidants>.
- 195.Bayne JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old padigm. Diabetes, 1999; 48(1): 1-9.
- 196.Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. Biochem Pharmacol. 1993; 45(3): 539-542.
- 197.Ceriello A. Acute hyperglycemia and oxidative stress generation. Diabetic Medicine, 1997; 14: 45-49.
- 198.Males M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O8NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2011; 35: 676-692.
- 199.Barnharm KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Nat Rev Drug Discov. 2004; 3: 205-214.
- 200.Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. J Clinical Biochemistry. 2005;47(5):119-29.
- 201.Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clinical Biochemistry, 2004;37:277-285.
- 202.Aycicek A, Erel O, Kocyigit A. Increased oxidative stres in infants exposed o passive smoking. Eur J Pediatr. 2005;164:775-778.
- 203.Aycicek A, Varma M, Ahmet K, Abdurrahim K, Erel O. Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in placental tissue. Eur J Pediatr. 2011;170(5):645-51.
- 204.Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. Trends Parasitol. 2004, 20: 524-530.
- 205.Kaye PM, Svennson M, Ato M. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. Immunol Rev. 2004, 201: 239-253.
- 206.Kane CJ, Hebda PA, Mansbridge JN, Hanawalt PC. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing. J Cell Physiol. 1991; 148: 157-173.
- 207.Gailit J, Welch MP, Clark RA. TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. J Invest Dermatol. 1994; 103: 221-227.
- 208.Martin P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. Science, 1997; 276: 75-81.
- 209.O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor betas and wound healing. Int J Biochem Cell Biol. 1997; 29: 63-78.
- 210.Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF beta. Annu Rev Immunol. 1998; 16: 137-161.
- 211.Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. Miner Electrolyte Metab. 1998; 24 : 111-119.
- 212.Moses HL, Coffey RJ, Lyons RM. Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation. J Cell Physiol Suppl. 1987; 1-7.
- 213.Massague J, Cheifetz S, Laiho M. Transforming growth factor-beta. Cancer Surv. 1992; 12: 81-103.
- 214.Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J Exp Med. 1986; 163: 1037-1050.
- 215.Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM. Transforming growth factor-beta:biological function and chemical structure. Science. 1986; 233; 532-534.

216. Roberts AB, Frolik CA, Anzano MA. Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues. *Fed Proc.* 1983; 42: 2621–626.
217. Centrella M, Canalis E. Transforming and nontransforming growth factors are present in medium conditioned by fetal rat calvariae. *Proc Natl Acad Sci.* 1985; 82: 7335–7339.
218. Frolik CA, Dart LL, Meyers CA. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci.* 1983; 80: 3676–3680.
219. Kothapalli R, Buyuksal I, Wu SQ. Detection of eba1, a novel human gene of the transforming growth factor beta superfamily association of gene expression with endometrial bleeding. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2342–2350.
220. Mitchell J. Repair Cell growth, regeneration, and wound healing. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, eds. *Basic Pathology.* 6th.ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company. 1998; 54.
221. Taipale J, Saharinen J, Keski O. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv Cancer Res.* 1998; 75: 87–134.
222. Kretzschmar M, Doody J, Massague J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature.* 1997; 389: 618–622.
223. Bikfalvi A. Significance of angiogenesis in tumour progression and metastasis. *Eur J Cancer.* 1995; 31(7): 1101–1104.
224. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol.* 1992; 119:1017–1121.
225. Lindholm D, Castren E, Kiefer R. Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J Cell Biol.* 1992; 117: 395–400.
226. Massague J, Andres J, Attisano L. TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev.* 1992; 32; 99–104.
227. Fanger BO, Wakefield LM, Sporn MB. Structure and properties of the cellular receptor for transforming growth factor type beta. *Biochemistry.* 1986; 25; 3083–3091.
228. Lopez CF, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF-beta signaling receptor. *Cell.* 1993; 73: 1435–1444.
229. Niessen FB, Andriessen MB, Schalkwijk J. Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. *J Pathol.* 2001; 194: 207–216.
230. Lee TY, Chin GS, Kim WJ. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann Plast Surg.* 1999; 43: 179–184.
231. Polo M, Smith PD, Kim YJ. Effect of TGF-beta2 on proliferative scar fibroblast cell kinetics. *Ann Plast Surg.* 1999; 43: 185–190.
232. Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF. The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg.* 1996; 98: 827–833.
233. Beck LS, Deguzman L, Lee WP. Rapid publication. TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects. *J Bone Miner Res.* 1991; 6: 1257–1265.
234. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Rowe NM. Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 105: 2028–2038.
235. Sherris DA, Murakami CS, Larrabee WF. Mandibular reconstruction with transforming growth factor-beta1. *Laryngoscope.* 1998; 108: 368–372.
236. Miura Y, Parvizi J, Fitzsimmons JS. Brief exposure to high-dose transforming growth factor-beta1 enhances periosteal chondrogenesis in vitro: a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84: 793–799.
237. Yeung HY, Lee KM, Fung KP. Sustained expression of transforming growth factor-beta1 by distraction during distraction osteogenesis. *Life Sci.* 2002; 71: 67–69.

238. Massague J, Heino J, Laiho M. Mechanisms in TGF-beta action. *Ciba Found Symp.* 1991; 157: 51–59.
239. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGF beta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, 2000; 103: 295–309.
240. Berking C, Takemoto R, Schaidler H. Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. *Cancer Res.* 2001; 61: 8306–8316.
241. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınevi, Konya, 1995; 1-77.
242. Hunt TK, Linsey M, Sonei M, Jawetz E. Oxygen tension and wound infection. *Surg Forum.* 1972; 23: 47-49.
243. Barrette WC, Hannum DM, Wheeler WD, Hurst JK. General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: Abolition of ATP production. *Biochemistry-us.* 1989; 28: 9172-9178.
244. Shou J, Lappin J, Daly JM. Impairment of pulmonary macrophage function with total parenteral nutrition. *Ann Surg.* 1994; 219: 291-297.
245. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 109: 33-44.
246. Babior DM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med.* 1978; 298: 659-668.
247. Ceylan E, Dülger H, Uzun K. Tüberküloz Plörezilerde Plevra Sıvısı Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Tanısal Değeri. *Toraks Dergisi*, 2003; 4(1):33- 37.
248. Reichner JS, Meszaros AJ, Louis CA, Henry WL Jr, Mastrofrancesco B, Martin BA, Albina JE. Molecular and metabolic evidence for the restricted expression of inducible nitric oxide synthase in healing wounds. *Am J Pathol.* 1999; 154: 1097–1104.
249. Lohinai Z, Burghardt B, Zelles T, Varga G. Nitric oxide modulates salivary amylase and fluid, but not epidermal growth factor secretion in conscious rats. *Life Sci.* 1999; 64: 953–963.
250. Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao Y, Bartold PM. Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2000; 35: 194–200.
251. Emine Gülçeri , Güleç Peker. Tgf-Beta Uygulamasının Ağız Yara Dokusu Oksidatif Olaylara Etkisi. Gazi Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Ankara, 2011.