

TIBBİ BİLİMLERDE YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLAR

EDİTÖR
Prof. Dr. Ayşegül ÇEBİ

İKSAD
Publishing House

TIBBİ BİLİMLERDE YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLAR

EDİTÖR

Prof. Dr. Ayşegül ÇEBİ

YAZARLAR

Prof. Dr. Ayşegül ÇEBİ
Prof. Dr. Cengiz KARAKAYA
Prof. Dr. Zeynep TAŞ CENGİZ
Doç. Dr. E. Gülçeri GÜLEÇ PEKER
Doç. Dr. Gülay HACIOĞLU
Doç. Dr. Necati ÖZPINAR
Doç. Dr. Selma CIRRIK
Doç. Dr. Ülkü KARAMAN
Dr. Öğr. Üyesi Egemen AKGÜN
Dr. Öğr. Üyesi Emel KABARTAN ÇÖKELİ
Dr. Öğr. Üyesi Funda DEMİRTAŞ KORKMAZ
Dr. Öğr. Üyesi TUBA GÜL
Dr. Öğr. Üyesi Zekeriya DÜZGÜN
Öğr. Gör. Dr. Rahmi YILDIZ
Arş. Gör. Dr. Selahattin AYDEMİR
Op. Dr. Ümit Doğan ÇELİK
Dr. Midvar DASHDAMİROVA
Dr. Türkan Mutlu YAR
Öğr. Gör. Fethi BARLIK
Arş. Gör. Y. Emre BÜLBÜL
Milad TORKAMANIAN AFSHAR
Murat SAYGIN

İKSAD Publishing House

Copyright © 2022 by iksad publishing house
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or transmitted in any form or by
any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses permitted by copyright law. Institution of Economic Development and Social Researches Publications®
(The Licence Number of Publicator: 2014/31220)
TURKEY TR: +90 342 606 06 75
USA: +1 631 685 0 853
E mail: iksadyayinevi@gmail.com
www.iksadyayinevi.com
It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.
Iksad Publications – 2022©
ISBN: 978-625-6380-16-5
Cover Design: İbrahim KAYA
December/ 2022
Ankara / Turkey
Size = 16 x 24 cm

İÇİNDEKİLER

EDİTÖRDEN
ÖNSÖZ
Prof. Dr. Ayşegül ÇEBİ.....1

BÖLÜM 1
MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYON VE TIPTA UYGULAMALARI
Dr. Öğr. Üyesi Zekeriya DÜZGÜN.....3

BÖLÜM 2
RNA SPLICING HATALARI ve GÜNCEL TEDAVİ YÖNTEMLERİ
Dr. Öğr. Üyesi Egemen AKGÜN.....31

BÖLÜM 3
YENİ BİR HÜCRE ÖLÜM YOLAĞI: FERROPTOZİS
Prof. Dr. Ayşegül ÇEBİ.....49

BÖLÜM 4
LOKAL KANSER TEDAVİSİ İÇİN NANOFİBER İMPLANTLARIN KULLANIMI
Dr. Öğr. Üyesi Funda DEMİRTAŞ KORKMAZ
Arş. Gör. Y. Emre BÜLBÜL.....57

BÖLÜM 5
PROTEAZ İLE AKTİVE OLAN RESEPTÖRLER
Doç. Dr. Selma CIRRIK.....77

BÖLÜM 6
İNTESTİNAL BARİYERİN YAPISI VE GEÇİRGENLİĞİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER
Doç. Dr. Selma CIRRIK.....97

BÖLÜM 7
CESTOD LARVALARI İLE OLAN ENFEKSİYONLAR
Doç. Dr. Ülkü KARAMAN
Doç. Dr. Necati ÖZPINAR.....119

BÖLÜM 8
İNTESTİNAL PROTOZOONLARDA METRONİDAZOLE KARŞI DİRENÇ GELİŞİMİ
Arş. Gör. Dr. Selahattin AYDEMİR
Öğr. Gör. Fethi BARLIK
Öğr. Gör. Dr. Rahmi YILDIZ
Murat SAYGIN ,
Milad TORKAMANIAN AFSHAR
Prof. Dr. Zeynep TAŞ CENGİZ.....143

BÖLÜM 9
HELİCOBACTER TÜRLERİNİN BEYİN-BAĞIRSAK AKSINDAKİ ROLÜ
Dr. Öğr. Üyesi TUBA GÜL…….....159

BÖLÜM 10
GLENFATİK SİSTEM: BEYNİN TEMİZLİK SANTRALİ
Doç. Dr. Gülay HACIOĞLU…….....169

BÖLÜM 11
UYKU YOKSUNLUĞU VE STRES ARASINDAKİ ETKİLEŞİM
Doç. Dr. Gülay HACIOĞLU…….185

BÖLÜM 12
BESLENME VE EPİGENETİK DÜZENLENMELER
Dr. Öğr. Üyesi Emel KABARTAN ÇÖKELİ……...199

BÖLÜM 13
BESLENME VE IVF
Op. Dr. Ümit Doğan ÇELİK
Dr. Midvar DASHDAMİROVA
Prof. Dr. Cengiz KARAKAYA.....223

BÖLÜM 14
DİYABETİK YARA İYİLEŞMESİNDE NİTRİK OKSİT SALAN BİYOMATERYALLER
Doç. Dr. E. Gülçeri GÜLEÇ PEKER.....237

BÖLÜM 15
YARA İYİLEŞMESİNDE BAZI TIBBİ BİTKİLERİN BİYOLOJİK VE FİTOKİMYASAL AKTİVİTELERİ
Doç. Dr. E. Gülçeri GÜLEÇ PEKER.....257

BÖLÜM 16
***TRİCHOMONAS VAGINALIS* VE EPİDEMİYOLOJİSİ**
Dr. Türkan Mutlu YAR…….....281

ÖNSÖZ

Sürekli değişen dünyada teknolojinin de gelişmesiyle özellikle de tıbbi araştırmalar kapsamında yoğun çalışmalar ve büyük projeler yürütülmektedir. Klinik araştırmalarda elde edilen verilere ek olarak multidisipliner çalışmalar neticesinde sadece klinik değil temel bilimler ile yapılan işbirlikleri neticesinde tıbbi bilgi dağarcığımız daha da genişlemektedir. Son yıllarda laboratuvar ve klinik verilerin yanında yazılım odaklı simülasyon çalışmaları da yeni bir bakış açısı kazandırmaktadır.

Bu kitap farklı tıbbi branşlarda yenilikçi yaklaşımları ortaya koyan, son yapılan araştırmaları titizlikle irdeleyen, özellikle moleküler tıp, biyokimya, fizyoloji, nöroloji, mikrobiyoloji dallarında yapılan çalışmaların hastalıklarla ilişkisi, kanser tedavisinde nanofiber kullanımı, intestinal sistem üzerine araştırmalar, beyin bağırsak aksındaki *helicobacter* türleri, tüp bebek tedavisi ve diyabetik yara iyileşmesi gibi alanlardaki nitelikli bilgileri siz değerli okuyuculara sunmaktadır.

Tıbbi Bilimlerde Yenilikçi Yaklaşımlar kitabımızın okuyuculara faydalı olmasını diliyorum.

Prof. Dr. Ayşegül ÇEBİ

Giresun, 2022

BÖLÜM 1

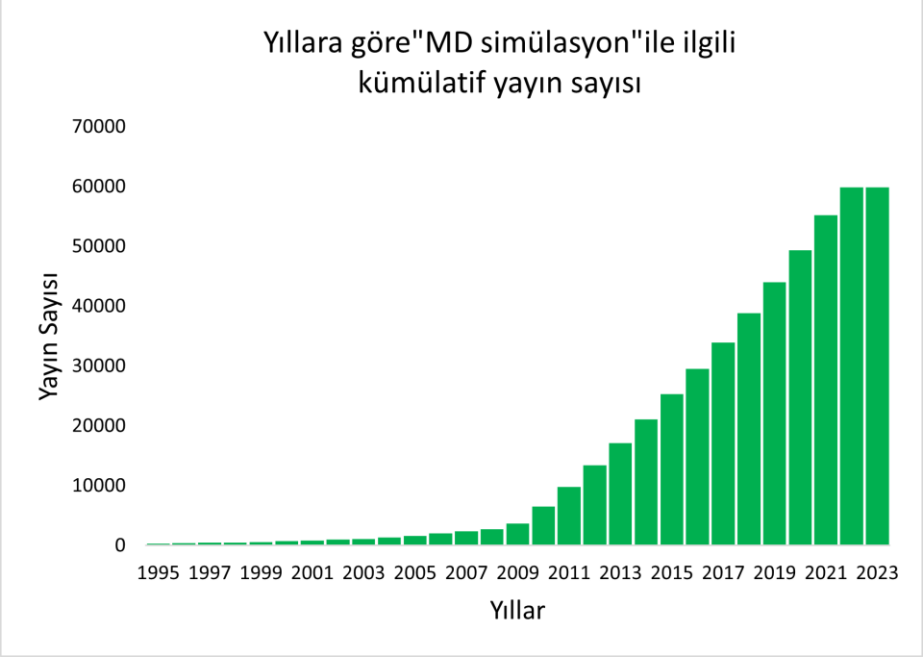
MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYON VE TIPTA UYGULAMALARI

Dr. Öğr. Üyesi Zekeriya DÜZGÜN[1]

[1] Giresun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Bölümü Giresun, Türkiye. zduzgun@gmail.com, Orcid ID: 0000-0001-6420-6292

GİRİŞ

Bilimsel yöntemleri Teori ve Deney olarak iki ana sınıfa ayırmak mümkündür. Teori ile modeller oluşturulup tahminler üretilirken, deneyler ise bu tahminlerin doğruluğunu teyit eder (Smith, 2010). Günümüzde ise bu iki ana metodolojiye ortak olabilecek yeni bir kavram yükselmektedir. Şu anda akademik araştırmalarda hızla ortaya çıkan ve simülasyon olarak isimlendirilen bu yönteme göre deneysel veriler baz alınarak teorik modeller deney ortamı taklit edilerek sanal ortamda test edilebiliyor. Bilindiği üzere teorileri kavramsal fikirler veya denklem olarak düşündüğümüzde bazı durumlarda çözmek için çok karmaşık oldukları söylenebilir. Fakat çeşitli algoritmalar ve günümüz bilgisayar teknolojisi ile bu karmaşık denklem setleri kolaylıkla çözümlenebilir hale gelmiştir. Bu nedenle pahalı ve zaman alıcı deneysel yöntemler yerine simülasyonlar, sonuçlarının deneysel verilere yakınlığı nedeniyle daha cazip ve uygulanabilir hale gelmiştir (Makarov, 2009).



Şekil 1. Yıllara göre "MD simülasyon" ile ilgili yayınlanan makale sayısı

Sağlık bilimlerinde hızla yaygınlaşan Moleküler dinamik (MD) simülasyon metodu, proteinlerin kendi içinde ve diğer bileşikler ile

etkileşimlerini gözlemlemek amacıyla güçlü bir hesaplama yöntemi olarak kullanılabilir. MD simülasyonunun önemli avantajlarının başında elde edilen ve tüm dinamik verileri içinde barındıran yörünge dosyalarının tekrar kullanılabilir olarak kaydedilebilmesidir. Belirli bir zaman dilimini kapsayan bu dinamik görüntüler protein yapıdaki her aminoasit ve diğer bileşik ve iyonların hareketi ve enerjilerini atomik düzeyde gözlemlemeye imkân tanır (X. Wu ve ark., 2022). Yapılan çalışmalar yaşam bilimlerinde MD simülasyonunun yıldan yıla daha etkin biçimde uygulandığını göstermiştir. Herhangi bir biyokimyasal veya farmakolojik deneyden önce MD simülasyonu yapmak zaman ve masraflar bakımından çok avantajlıdır ve MD simülasyon vasıtasıyla deney ile ilgili önemli bilgiler elde edilebilir (Lazim ve ark., 2020; X. Wu ve ark., 2022). MD simülasyonları, bir protein veya membran sisteminde yer alan her bir atomun diğer atomlar ile olan etkileşimlerini, fiziksel deneye ya da teorik modellere dayanarak zaman içinde nasıl hareket edeceklerini ve nasıl bir enerjetik dönüşüm geçirdiklerini tahmin eder. Bu simülasyonlar, substratların bağlanması, proteinlerin katlanması ve konformasyonel değişimleri de hesaba katarak önemli biyomoleküler süreçleri yakalayabilir. Ayrıca femto saniye zaman ölçeğinde atomların anlık konum değişikliklerini hesaplayabilir (Hollingsworth & Dror, 2018). İleri çalışmalar olarak da mutasyonlar, fosforile durumlar, protonasyon ve modifikasyona uğratılmış bileşiklerin eklenip çıkarılmasına verdiği atomik tepki belirlenebilir (Pu ve ark., 2017). MD simülasyonları genellikle elektron paramanyetik rezonans (EPR), Forster rezonansenerji transferi (FRET), X-ışını kristalografisi (XRAY), kriyo-elektron mikroskobu (kriyo-EM) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) dahil olmak üzere çok çeşitli deneysel yapısal biyoloji teknikleriyle birlikte kullanılır (Patodia ve ark., 2014). MD simülasyonların ilk uygulamaları 1940'larda basit gazların benzetimleri ile gerçekleştirilmiştir (Metropolis & Ulam, 1949). Proteinlerin ilk simülasyonu ise 70'li yıllarda çalışılmıştır (McCammon ve ark., 1977). Günümüze geldiğimizde ise MD simülasyonların daha uygulanabilir olması ve ulaşılabilir olması ile özellikle deneysel moleküler biyologlarının daha fazla ilgisini çektiği görülmektedir. MD simülasyonları deneysel çalışmalara öncülük etme yetenekleri ve deneysel sonuçlara farklı bir bakış açısı ve yorum getirebilmesi sayesinde makalelerde sıklıkla görünmeye başlamıştır (Şekil 1) (Dai & Chen, 2022; Durrant & McCammon, 2011; Sloot & Hoekstra, 2010).

MD SİMÜLASYON NEDİR?

Bir MD simülasyonunun ardında yatan temel fikre bakıldığında biyomoleküler sistemdeki tüm atomların ki bu globüler protein de olabilir membrana gömülü integral protein de olabilir, her bir atomun diğer bir atoma bir kuvvet uyguladığı görülür. Bu durumdan hareketle her bir atomun zamana bağlı olarak konumsal değişimini tahmin etmek için Newton'un hareket yasalarından faydalanılabilir (Hernández-Rodríguez ve ark., 2016). Her bir hesaplama adımında atom üzerindeki kuvvetler sürekli tekrar hesaplanır ve bu kuvvetler her bir atomun hızını ve konumunu güncellemek için bir diğer adıma geçildiğinde tekrar baştan hesaplanmış olur. Böylelikle bu zaman adımları birleştirildiğinde bir yörünge meydana getirilmiş olur ve belirli bir zaman aralığı simüle edilerek sistem boyunca her bir atomun konfigürasyonunu açıklayabilen üç boyutlu bir film ortaya çıkar (H. Zhao & Caflisch, 2015). Bu simülasyonların güçlü yönleri ele alındığında herhangi bir deneysel teknikle neredeyse ele alınması imkânsız olan zamanın femto saniye ölçeğinde her bir atomun konumunu ve vektörel hızını yakalaması göze çarpar. Diğer yandan simülasyon koşulları %100 kesinlikte ve hassas bir şekilde kontrol edilebilir. Yani proteinin nasıl bir mutasyona sahip olduğu, hangi ligandların bağlı olduğu, post translasyonel modifikasyona sahip olup olmadığı, protonasyon durumu, zar boyunca voltaj değişimleri, sıcaklık değişimleri, proteindeki allosterik değişimlere bağlı serbest enerji farklılıkları karşılaştırılmalı olarak incelenip belirlenebilir (Hospital ve ark., 2015).

Simülasyonlar deneysel veriler ile karşılaştırıldığında günden güne daha yüksek korelasyona sahip oldukları görülmektedir. Bu durum da simülasyona hayat veren kuvvet alanlarının önemli ölçüde geliştirildiğini göstermektedir. Buna karşın kuvvet alanları hala bazı kusurlara sahiptir ve analiz aşamasında bu kusurlara bağlı bazı belirsizliklerin dikkate alınması gerekir. Deneysel laboratuvar uygulamasının aksine MD simülasyonlarda kovalent bağ oluşması ya da bir bağın kopması beklenmez (Ponder & Case, 2003). Bu handikabın da üstesinden gelebilen çeşitli yöntemler mevcuttur. Kuantum mekanik hesaplamalar ile MD simülasyonların birlikte yürütüldüğü simülasyonlarda bağ oluşum ve kopma reaksiyonları da gözlenebilmektedir (Ahmadi ve ark., 2018). Bir MD simülasyonundaki kuvvetler hesaplanırken de kuantum mekanik hesaplamalarının ve NMR gibi bazı deneysel çalışmaların sonuçlarının dikkate alındığı bir model kullanılır. Bu modele moleküler mekanik kuvvet alanı ismi

verilir ve simülasyonun kalbi bu kuvvet alanındaki parametrik verilerdir. Tipik bir kuvvet alanı iki atom arasında kuantum mekanik ya da NMR ile hesaplanan kovalent bağ uzunluğu, bağ açısı, bağ gerilimini modelleyen yay benzeri algoritmaları, atomlar arasındaki elektrostatik etkileşimleri (Coulomb) ve diğer atomlar arası etkileşimleri betimleyen ve kuvvet alanının doğası gereği yaklaşık veriler sunan terimler içerir (Prezhdo & Rossky, 1997). Daha önce de bahsedildiği gibi sistemin küçük bir kısmında kuantum mekanik hesaplamalara izin veren ve sistemin kalanının moleküler mekanik kuvvet alanları ile simüle edildiği sistemler de mevcuttur. Bu sistemlerde kovalent bağlardaki bağlanma kopma reaksiyonları hesaplanabilmektedir. Kuantum mekanik hesaplamaların küçük bir hacimde yürütülmesinin nedeni hesaplama maliyetinin moleküler mekanik hesaplamaya göre çok daha yüksek olmasıdır. Günümüz teknolojisi ile bir proteinin normalde birkaç günde moleküler mekanik ile simüle edilebileceği bir sistem kuantum mekanik ile teorik olarak binlerce yıl sürebilir (Groenhof, 2013). MD simülasyonu, protein düzeyinde ilk olarak 1970'lerde onlarca atomun simüle edilmesinden başlamış artık günümüzde açık çözücü ortamda büyük makromoleküler protein kompleksleri ve biyolojik öneme sahip zara gömülü integral protein sistemlerine doğru ilerlemiştir (Klein & Shinoda, 2008; Stillinger & Rahman, 1974). Günümüzde artık bir virüsün bile MD simülasyonu yapılabilmektedir (Freddolino ve ark., 2006). 100 bin atomluk bir sistemin simülasyonu küçük bilgisayar kümelerinde hatta iyi bir GPU'ya sahip kişisel bilgisayarlarda bile mümkündür. Süper bilgisayar olarak nitelendirilen yüzlerce hesaplama ünitesine sahip bilgisayar kümelerinde bir milyona yakın atomlu sistem simülasyonları yaygınlaşmaya başlamıştır (Ciccotti ve ark., 2014). Yüksek performanslı bilgi işlem (HPC) kullanımının araştırmacılar tarafından kullanımının yaygınlaşması ve kullanıcı dostu kolay ara yüzlü MD algoritmalarının geliştirilmesi, bu durumu hızlandıran etkenler arasındadır. MD sisteminin başlangıç modeli X-RAY gibi deneysel verilerden elde edilen üç boyutlu protein modellerdir. Simüle edilen sistem genellikle atomik ölçekte temsil edilirken bazı durumlarda kaba taneli modeller tercih edilebilir. Çok daha büyük sistemler ya da çok uzun süreli simülasyonlar gerektiğinde 8 atomu tek bir atommuş gibi gösteren kaba taneli temsiller deneysel doğruluktan biraz fedakârlık vermesine karşın oldukça başarılı sonuçlar üretebilmektedir (Zwier & Chong, 2010). İster atomistik gösterim olsun ister kaba taneli olsun sistemi yürütecek fonksiyonel denklemler içinde Lennard-Jones potansiyelleri,

Kolomb yasası, yaylar, elektrostatik etkileşimler, bağ dönüşleri için periyodik fonksiyonlar ve van der Waals kuvvet hesaplamaları vb. yer almalıdır (MacKerell Jr & Banavali, 2000). Günümüzde atom ölçekli moleküler dinamik simülasyonlarda tercih edilen kuvvet alanları arasında parametreleştirilme farklılıkları olabilmektedir. Bir kuvvet alanında kullanılan bir parametre başka bir kuvvet alanında kullanılamaz ayrıca kuvvet alanları tüm atom ve molekül türlerini temsil edecek kapsamda değildir. Bunun nedeni olarak kuvvet alanının gereksiz parametre içermesinin simülasyon performansını olumsuz yönde etkilemesi sayılabilir. Buna rağmen farklı kuvvet alanları farklı parametreler içermelerine rağmen yürütülen simülasyonlar birbirine eş değer olmaktadır (Price & Brooks III, 2002). Kuvvet alanı parametreleri ile her bir atoma etki eden kuvvet elde edilir ve Newton hareket yasasına bağlı hız ve ivmeleri hesaplamak ve buna bağlı atomların konumlamalarını güncellemek mümkün hale gelir. Kullanılan zaman adımları atomun hızına göre belirlenmektedir. Bunun için atomik simülasyonlarda maksimum zaman adımı olarak genellikle 1-2 femto saniye (fs) olarak tercih edilmektedir (X. Wu ve ark., 2022). Simülasyon adımlarındaki bu kısalık sistemin kararlı bir şekilde çalışabilmesi için kritik önemdedir. Zaman adımı simülasyon performansını etkileyen en önemli unsurlardan biri olduğundan en büyük dar boğaz olarak kabul edilir. Biyokimyasal olaylara bakıldığında protein ligand bağlanması katlanma ve allosterik değişim gibi önemli olayların nanosaniye, mikro saniye veya daha uzun zaman ölçeklerinde gerçekleştiği görülür. Klasik bir simülasyonda 100 nano saniyelik bir simülasyon için 50 milyon adımın hesaplanması gerekmektedir. Bu zaman adımları milyonlarca atom içeren büyük ölçekli sistemler ile birleştiğinde devasa bir hesaplama maliyeti ortaya çıkmaktadır. Sıradan bir masaüstü bilgisayar ile bu işlemlerin yürütülmesi aylar hatta yıllar alabilir (Hollingsworth & Dror, 2018). Simülasyon performansını etkileyen en önemli iki unsur olan atom sayısı ve zaman adımı açısından değerlendirildiğinde kaba taneli simülasyonlar önemli avantajlara sahiptir. Kaba taneli kuvvet alanları tercih edildiğinde zaman adımları 4 fs'den büyük ve 4-8 atom başına bir temsili atom kullanılabilir. Böylelikle simülasyon performansı 10-20 kat artabilmektedir. Kişisel masaüstü iş istasyonlarında dahi 1 mikro saniye/gün performansa ulaşmak mümkün olabilmektedir. Deneysel doğruluktan bir miktar fedakârlık verilmesine karşın. Serbest enerji yüzeyindeki geçişlerdeki yumuşama sebebiyle allosterik etkileşim

simülasyonlarında daha iyi başarılar elde edilmesi mümkün olabilir (Tozzini, 2005). Simülasyon sistemlerinde parametrelerdeki ince ayarlamalar ve grafik işlem birimlerinin (GPU) kullanımını mümkün kılan algoritmaların hayata geçirilmesi ile performans artışı gözle görülür şekilde artmıştır. Günümüz bilgisayarlarında süreci hızlandırmak amacıyla paralelleştirilme yapılarak yüzlerce bilgisayarın tek bir bilgisayar gibi çalıştırılması mümkün hale gelmiştir (Stone ve ark., 2010). Bilgisayarların paralelleştirilmesinde mesajlaşma-geçiş-arayüzü (MPI) olarak isimlendirilen bir protokol kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan popüler simülasyon yazılımları bu MPI protokolünü uzun yıllardır kullanmaktadır (Berendsen ve ark., 1995; Komeiji ve ark., 2001; MacKerell Jr ve ark., 2000; Nelson ve ark., 1996; Salomon-Ferrer ve ark., 2013b). MPI protokolünü sayesinde çok sayıda bilgisayardaki merkezi işlem birimi eş zamanlı kullanılabileceğinden yüzlerce hatta binlerce bilgisayar çekirdeği ile simülasyon süreleri dramatik olarak kısalmıştır. Buradaki genel strateji, simülasyon sisteminin üç boyutlu parseller şeklinde bilgisayarlar arasında paylaştırılmasıdır (Komeiji ve ark., 2001). Mekânsal ayrışma olarak adlandırılan bu strateji ile her bilgisayarda sisteminin bir parseli simüle edilmektedir. Parsellere bölme şekli parçacık listesine göre değil uzaydaki konumlarına göre yapılmaktadır. Yani her bir bilgisayar parsel içindeki parçacıkların sayısı ile değil parselin uzayda kapladığı üç boyutlu alan ile ilgilenir. Böylece sadece komşu bölgeler arasındaki bilgi paylaşımı önemli olabileceğinden işlemciler arasındaki bilgi paylaşımı da minimumdur. Paralelleştirmeye ilave olarak grafik işlem birimlerinin de (GPU) kullanımının yaygınlaşması ile simülasyon yazılımları da hızla GPU kullanımını aktif hale getirecek kod değişimlerini yerine getirmiştir. Eskiden bilgisayarda grafik hesaplama motorları olarak özellikle üç boyutlu oyunların oynanabilmesi amacıyla geliştirilen bu birimler günümüzde mühendislik, jeoloji, hava durumu ve yaşam bilimleri için önemli simülasyon kaynaklarına evrilmiştir (Komeiji ve ark., 2001; Stone ve ark., 2010). Günümüz MD yazılımlarının çoğu yıllar öncesinden GPU için hazır hale gelmiştir. Sadece GPU üzerinde çalışmak üzere özelleşmiş MD simülasyon yazılımları dahi geliştirilmiştir (ACEMD)(Harvey ve ark., 2009). Artık günümüzde altın standart olarak MD simülasyonlarda MPI ya da GPU kullanımı yaygındır (Parton ve ark., 2016). GPU kullanılmasının yaygınlaşması ve MD simülasyon yazılımlarının GPU için özel hızlandırma kodları barındırmaları sayesinde masaüstü iş istasyonları ile bile 100 bin atom

altında 100 ns/gün hızına kadar başarılı performans sonuçları alınabilmektedir (Xu ve ark., 2010). MD simülasyon yazılımlarının kullanımında otomatikleştirme ve basit kullanıcı arayüzlerinin geliştirilmesi sayesinde büyük bir kolaylık sağlanmıştır. Buna karşın uzmanlık gerektiren ise simülasyonun bilimsel probleme nasıl yanıt verebildiğini ve buna göre nasıl bir sistem hazırlanması gerektiğini bilmektir (Hou ve ark., 2011). MD simülasyon denince iki önemli kavram ön plana çıkmaktadır. Bunlar kullanılan kuvvet alanı ve sistemin biyofiziksel ortamını şekillendiren topluluklardır.

Kuvvet Alanı: Sistemi oluşturan atomların koordinatlarına ve birbirine göre konumlarına göre barındırdıkları enerjiyi, bağ uzunluklarını, açıları, dihedralleri içeren parametreler topluluğuna kuvvet alanı denir. Biyomoleküler sistemler son derece karmaşık kuantum mekanik hesaplamalar ile çözülmek yerine kuvvet alanı kullanan moleküler mekanik (MM) yöntemler ile çözümlenmektedir. Bu sistemlerde direkt olarak kuantum mekanik uygulamak yerine kuantum mekanik hesaplamalar ile elde edilmiş parametreler ile hesaplamanın basitleştirilmesi genel stratejidir. Böylece hesaplama maliyeti dramatik oranda azalmış fakat deneysel veriler ile uyum ve doğruluktan az miktarda fedakârlık yapılmıştır (Ponder & Case, 2003). Biyomoleküler sistemin içeriğine göre kuvvet alanları değişkenlik göstermektedir. Makromoleküler sistemlerin simülasyonu için genel olarak GROMOS, AMBER, CHARMM gibi popüler kuvvet alanları tercih edilmekteyken daha küçük bileşiklerin simülasyonu için evrensel kuvvet alanı (UFF), veya MMFF94 gibi kuvvet alanları tercih edilmektedir (Berendsen ve ark., 1995; Halgren, 1996a, 1996b; MacKerell Jr ve ark., 2000; Rappé ve ark., 1992; Salomon-Ferrer ve ark., 2013a; Scott ve ark., 1999). Kuvvet alanlarının tamamında bağ yapan atomlar arasındaki etkileşim için bir fonksiyon tanımlı iken bağ yapmayan atomlar arasındaki etkileşimler için farklı bir potansiyel fonksiyonu kullanılmaktadır (Ponder & Case, 2003).

MD Simülasyonunda Topluluklar: Moleküler sistemin içeriği ne şekilde olursa olsun termodinamik ortamı şekillendirmede belirli topluluklar standart olarak tercih edilmektedir (Brown & Clarke, 1984). Bu topluluklar sırayla Mikro-kanonik Topluluk (NVE), Kanonik Topluluk (NVT), İzobarik-izotermal Topluluk (NPT) ve Grand kanonik topluluk (μVT) olarak isimlendirilir.

Mikro-kanonik Topluluk (NVE): sabit sayıda molekül (N), sabit hacim (V) ve sistemin enerji (E)'sine sahip izole bir sistemi temsil eder. Bu toplulukta belirli bir yörüngedeki toplam enerjiyi potansiyel ve kinetik enerjinin toplamı temsil eder. NVE topluluğunda sistem izoledir ve bu nedenle ortamda ısı alışverişini etkileyen bir fonksiyon olmadığından düzensiz ısı değişiklikleri meydana gelebilir. Bunun sonucunda NVE'li makromoleküler sistemlerde sıcaklık ekzotermik konformasyonel değişim meydana geldiğinde ya da sistem içindeki etkileşimler ile meydana gelebilir (Brown & Clarke, 1984; Schierz ve ark., 2015).

Kanonik Topluluk (NVT): NVT, sabit sayıda molekül (N), sabit hacim (V) ve sıcaklık (T) ile karakterize bir çeşit topluluk türüdür. Bu topluluk kullanıldığında sistem sıcaklığı harici bir ısı rezervuarı ile kontrol altında tutulur. Sıcaklığı kontrol etmek için çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir. Bu algoritmaların başında Berendsen termostatı gelmektedir. Bu algoritma ile sistemin her noktasında parçacık hızı ölçeklendirilerek kontrol edilir. Bu algoritma ile ısı rezervuarının sıcaklığı kolay ve hızlı bir şekilde kontrol edilebilirken sistemde birtakım artefaktlar oluşturma potansiyeli nedeni ile günümüzde artık tercih edilmemektedir. Denge fazı simülasyonlarında kullanımı hala yaygın olsa da üretim aşamasındaki simülasyonlarda farklı algoritmalar tercih edilmektedir. Berendsen'den farklı olarak tüm parçacıklara etki eden kuvveti etkileyen bir kat sayı fraksiyonu kullanan Nose-Hoover algoritması özellikle üretim aşamasında daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Brown & Clarke, 1984; Nielsen, 2013).

İzobarik-izotermal Topluluk (NPT): NPT topluluğunda sabit sayıda atom N, sabit basınç P ve sabit sıcaklık T termodinamik olarak karakterize edilmiştir. Bu toplulukta NVT topluluğundan farklı olarak biyomoleküler sistemin basıncı da kontrol altındadır. Termostat algoritmasına ilave olarak barostat algoritması da sistem dengesinde aktif rol üstlenmiştir. Biyolojik membran simülasyonlarında membran bileşenlerinin stabilitesi için barostat algoritması kullanılması zorunludur (Brown & Clarke, 1984; Di Pierro ve ark., 2015). Üretim simülasyonları da genellikle bu topluluk ile yürütülmektedir. Tek fark üretim simülasyonunda atomik kısıtlama algoritmalarının devre dışı bırakılmasıdır.

Grand kanonik topluluk (μVT): μVT topluluğunda moleküler sistemin termodinamik karakterizasyonu için sabit hacim V ve sabit sıcaklığa T ilave olarak sabit kimyasal potansiyel μ ilave edilir (Brown & Clarke, 1984; Eslami & Müller-Plathe, 2007).

MOLEKÜLER SİMÜLASYONLARIN KISA TARİHÇESİ

Moleküler simülasyonların (MS) ilk örneklerine 1940'lı yılların sonunda parçacık etkileşimlerinin araştırılması çalışmalarında rastlanmaktadır (Metropolis & Ulam, 1949). Metropolis parçacıkların fiziko-kimyasal özelliklerini simüle etmek için bir dizi olasılıkçı yaklaşım önermiştir. İlk MS algoritması ile atomik çarpışmaları simüle etmek için günümüze göre çok ilkel fakat büyük yer kaplayan elektronik bilgi işleme cihazları kullanıldı. Sonraki yıllarda bu makineler bilgisayara evrilmiştir. Bu algoritma ile her atoma bir başlangıç hızı ve koordinat atanmış ve atomik itme ve çekme kuvvetleri simüle edilmiştir (Metropolis & Ulam, 1949; Sinha ve ark., 2022). 1960'lı yıllara gelindiğinde MS Argon gazının karakteristik özelliklerini simüle edebilecek yetenekte algoritmalar gelişmiştir (Rahman, 1964). Bu çalışmada başarılı bir şekilde Lennard Jones etkileşimleri Argon atomlarına uygulanabilmiştir. 1976 yılına gelindiğinde Warshel ve Levitt ilk kez kuantum mekaniği hesaplamalarıyla elde edilen verileri atomlar üzerinde parametreleştirmeyi başarmışlar ve böylece son derece karmaşık kuantum mekanik hesaplamalardan kaçınarak fakat bu hesaplamalardan elde edilen bazı verileri tekrar hesaplamayı gerektirmeyecek şekilde kullanarak görece yakın doğrulukta moleküler mekanik hesaplamalar yapabilmeyi başarmışlardır (Warshel & Levitt, 1976). Benzer yıllarda Karplus ve arkadaşları simülasyon süresini uzatabilmek için bir takım kısıtlama yöntemleri kullanarak MS'i daha da ileri taşımışlardır (McCammon ve ark., 1977; Ryckaert ve ark., 1977). Karplus, Levitt ve Warshel'a karmaşık kimyasal sistemleri çok ölçekli modellere indirgeyerek deneysel doğruluğa yakın simülasyon sistemlerinin yolunu açtıkları için 2013 yılında Nobel Kimya Ödülü layık görülmüştür (Karplus ve ark., 2013). 1980'li yıllara gelindiğinde sabit basınç oluşturabilen izoentalpik topluluklar örneklenmiştir (Andersen, 1980). 1985 yılında Parrinello ve arkadaşları Yoğunluk Fonksiyon Teorisi (DFT) aracılığıyla elektronik yapının doğrudan hesaplanmasına öncülük etmiştir. Bu çalışma ile sıcaklık fonksiyonunun simülasyonda kullanabilir olması yönünden önemlidir

(Car & Parrinello, 1985). MS yaklaşımında, bilgi işlem gücünün hızla artması ve algoritmaların daha yüksek doğrulukta ve verimlilikte geliştirilmesi sayesinde ve ayrıca araştırmacıların bu kaynaklara ulaşımının kolaylaşması ile çalışmalarda büyük artış meydana gelmiştir (Şekil.1). Bilgisayarların paralel olarak eş zamanlı olarak hesaplamaya katılma yeteneklerinin gelişmesi MD simülasyon uygulamalarını büyük ölçüde hızlandırmış ve güncel MD yazılımları olan NAMD, GROMACS ve AMBER gibi paralel hesaplama yapabilen yazılımlar görece kolay kullanılabilen arayüze sahip olmaları sayesinde kullanım sürecini hızlandırmıştır (Abraham ve ark., 2015; Nelson ve ark., 1996; Salomon-Ferrer ve ark., 2013a). Grafik işleme birimlerinin de son yıllarda hızla gelişmesi ile masaüstü bilgisayarlarda bile simülasyon günümüzde mümkün hale gelebilmiştir. İlave olarak MD simülasyon için özelleşmiş işlemciler tasarlanmış ve çok yüksek boyutlarda çok uzun süreli karmaşık biyokimyasal süreçlerin simülasyonu mümkün hale gelebilmiştir (Shaw ve ark., 2009; Sinha ve ark., 2022).

İLERİ DÜZEY MD SİMÜLASYON UYGULAMALARI

Klasik atomik ölçekli bir MD simülasyonda atomik yapı ve fonksiyonel özellikler incelenebilse de büyük ve karmaşık sistemler için farklı stratejiler uygulanması gereklidir. Bunun nedeni karmaşık termodinamik süreçlerin hesaplama maliyetinin çok yüksek oluşu ve istenen enerji seviyesine hiç ulaşılamama ihtimalidir (Lazim ve ark., 2020). Farklı konformasyonel geçiş özelliklerine sahip bir proteindeki ligand bağlanma ve ayrılma kinetiği bu tür hesaplamalara örnek olarak verilebilir. Böyle karmaşık biyolojik süreçleri ancak mikro-mili saniye ölçeğinde gözlemlemek mümkün olabilir. Bu derece devasa hesaplama maliyetlerinden kaçınmak için geliştirilmiş bazı örnekleme yöntemleri geliştirilmiştir (Boehr ve ark., 2009). Gelişmiş örnekleme yöntemlerini iki sınıfta değerlendirmek mümkündür. Bunlar önceden tanımlanan kollektif değişkenlere (CV) yanlılık potansiyellerinin eklenmesine dayalı yöntem ile kollektif değişken içermeyen yöntemlerdir (Yang ve ark., 2019). CV tabanlı yaygın kullanılan yöntemler arasında metadinamik, şemsiye örnekleme (US), yönlendirilmiş moleküler dinamik (SMD) ve sıcaklıkla hızlandırılmış MD (TAMD) gösterilebilir. CV tabanlı yöntemlerde uygun CV'leri hesaplamak deneyim gerektirmektedir. Bazı sistemlerde ise CV belirlenmesine ihtiyaç yoktur. Bu tür sistemlerde CV gerektirmeyen gelişmiş

örnekleme sistemlerinin kullanılması daha uygun olabilmektedir. Bu tür gelişmiş yöntemlere kendi kendini yönlendiren moleküler Langevin dinamikleri (SGLD), hızlandırılmış moleküler dinamikler (aMD), paralel temperleme (PT) ve Replika değişim MD (REMD) örnek verilebilir (Miao & McCammon, 2016). Bu tür yöntemlerin avantajı sistem hakkında önceden elde edilen bir bilgi gerektirmez. Bu durum da bu tür yöntemleri görece uygulaması daha kolay hale getirmektedir. Bir proteinin olası farklı konformasyonel geçiş formlarını CV içermeyen bu tür yöntemler ile araştırmak klasik yönteme göre hesaplama maliyeti açısından daha fazla avantaj sağlamaktadır. Biyomoleküler sistemin çok büyük olması durumunda ya da çok karmaşık konformasyonel geçiş süreci içeriyorsa birkaç yöntemi birleştirme stratejisi faydalı olabilir. Birkaç gelişmiş örnekle yöntemine yakından bakacak olursak metadinamik (MetaD) bunlar arasında en yaygın kullanılan CV tabanlı yöntemlerden biri olarak sayabiliriz. MetaD ilk olarak bu alanda saygın bir bilim insanı olan Parrinello ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Barducci ve ark., 2011; Yang ve ark., 2019). Bu yöntemde temel fikir bir kum havuzunu doldurmak için kum kullanmaya benzer. MetaD'de sisteme bir polarizasyon potansiyeli eklenir. Böylece sistemin potansiyel enerjisi artmaya başlayacaktır. Potansiyel enerjinin artmasına bağlı olarak normalde mikro saniyeler içinde beklenen sistem içinde enerji düzeyleri arasındaki bariyerlerden geçiş nano saniyeler içinde gerçekleşmiş olacaktır. Bu yöntemin en büyük handikabı eklenen polarizasyon enerjisi ile sistemin normal fiziki koşullarda girmemesi gereken bir faz uzayına girme tehlikesidir. Bu durum da sistemin deneysel ortamdan hızla uzaklaşması anlamına geleceğinden tüm çalışma yanlış sonuç ile tehdit altına girebilmektedir (Laio ve ark., 2005). Araştırmacılar bu ciddi sorunun üstesinden gelebilmek için mevcut algoritmayı modifiye edip iyi kontrol edilmiş metadinamik ismini verdikleri yeni bir metodoloji geliştirmiştir (WT-MetaD) (Barducci ve ark., 2008). Günümüzde WT-MetaD metodu biyolojik problemlilerin çözümünde sıklıkla tercih edilmektedir. Geçiş durumundaki ara formların keşfine ilave olarak ligand bağlanma enerjisinin de yüksek doğrulukta hesaplanmasında kullanılabilmektedir (J. Huang ve ark., 2007). Metadinamik uygulamaları çok ilgi çekici görünse de doğru CV'yi belirlemek çok zor ve uzmanlık gerektirmektedir. Bu nedenle özellikle ligand ayrıştırma işleminde tercih edilen şemsiye örnekleme ve yönlendirilmiş MD (SMD) MetaD'ye göre daha kolay uygulanabilir metodolojilerdir (Limongelli, 2020).

US ve SMD yönteminin dezavantajı ise ligand ayrışma koordinatının bilindiği varsayılır. MetaD ile birçok CV arasından doğru olanı belirlemek gerekirken SMD ve US yöntemlerinde ise sadece mesafe veya açıyı tanımlayan kollektif değişkenlerin bilinmesi yeterlidir. SMD yönteminde çekilecek bileşiğe belirli bir kuvvet ve çekme hızının tanımlanması gerekmektedir (Do ve ark., 2018; You ve ark., 2019). SMD uygulamasında ligand ayrışma yolu bilinmediğinden bu değişken genellikle rastgele hızlandırılmış MD (RAMD) yöntemiyle elde edilebilir (Bruce ve ark., 2018). CV içermeyen yöntemler incelendiğinde REMD yöntemi ön plana çıkmaktadır. Bu yöntem ile farklı sıcaklıkta sistemin replikaları eş olarak yürütülüp örneklem artırılır. Böylece farklı replikalar arasındaki konformasyonel farklılıklar gözlenebilir (Jo ve ark., 2015). Örneğin bir çalışmada REMD yöntemi kullanılarak protein tirozin kinaz A'nın düzensiz alanlarının katalitik aktivite üzerindeki etikleri araştırılmıştır (Nagpal ve ark., 2020). Bir diğer popüler metot ise daha çok ilaç sanayisinde tercih edilen FEP yöntemidir. Bu yöntemde örnekleme metodoloji olarak Monte Carlo (MC) veya atomistik MD kullanılarak ilk referans durumun nihai hedef durumu ile karşılaştırmalı olarak incelenmesi esastır (Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery, 2016). Özellikle ilaç tasarımı çalışmalarında bir bileşiğin farklı mutant formları bir eşleme parametresi kullanılarak aynı sistem içinde simüle edilip serbest enerji farklılıkları hesaplanır (Abel ve ark., 2017; Chen ve ark., 2018). FEP/MD hesaplamalarında çok daha iyi bağlanan ligandların tasarlanması ancak son yıllarda yaygınlaşma başlamıştır. Örneğin 200 civarında ligand seti ile yapılan bir FEP çalışmasında deneysel çalışmalar ile ~1 kcal/mol hata ile yüksek doğrulukta validasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada kuvvet alanı olarak OPLS2.1 ve 3 kullanılmış ve kopya değişimine bağlı FEP simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca GPU tabanlı sistemler ile kullanıcı dostu otomatize iş akışı kodları da kullanılmıştır. Bu tür kodlar FEP gibi karmaşık hesaplama yöntemlerinin kullanımını kolaylaştırması bakımından önemlidir (Wang ve ark., 2015).

MD SİMÜLASYONUN SAĞLIK BİLİMLERİNDE UYGULAMALARI

Mutasyonların proteinlerin yapısında ne tür değişiklere yol açabildiği ve fonksiyonunu ne şekilde etkileyebildiği biyokimyasal deneyler ile belirlemek mümkündür. Böyle bir deney için X-ışını, NMR ya da kriyo-EM gibi yöntemler ile önce proteinin yapısı çözümlenmeli ve mutasyonun neden olduğu işlevsel değişiklik FRET gibi yöntemler ile incelenmelidir. Bu tür bir çalışma için çok yüksek bir maliyet, uzmanlık ve kayda değer bir zamana ihtiyaç vardır (X. Wu ve ark., 2022). MD simülasyon ile böyle bir mutasyonun proteinin kinetiği üzerine etkileri günler hatta saatler içinde yüksek doğrulukta belirlenebilir. Protein-protein etkileşimlerinin araştırıldığı sıcak nokta taraması çalışmaları MD simülasyonunun deneysel veriler ile uyumluluk yönünden gücünü ortaya sermiştir (F.-X. Wu ve ark., 2021). Literatürdeki çoğu MD simülasyon çalışmalarında ligand bağlanması, biyomoleküller süreçler, protein katlanması ve voltaj bağımlı konformasyonel değişikler gibi bir takım biyolojik süreçler gözlemlenmiştir. Deneysel olarak ele alınması zor olan bu süreçler hakkında MD simülasyon ile bazı soruların yanıtlanması daha kolay hale gelebilmiştir (Dai & Chen, 2022; Hollingsworth & Dror, 2018; Makarov, 2009; Patodia ve ark., 2014; X. Wu ve ark., 2022; Zwier & Chong, 2010).

Moleküler yerleştirme ve ilaç tasarımı

Küçük bir molekülü bir proteine yerleştirme stratejisi günümüzde en pratik uygulama konularından biridir. Bir substrat ya da regülatör role sahip olabilen bir ligandın protein gibi bir makro moleküle nasıl bağlandığını anlamak biyolojik problemin anlaşılmasında kritik bir konudur. Bu yaklaşım günümüzde yapısal ilaç tasarımının temelini oluşturmaktadır. Moleküller çok esnek yapıdadırlar ve bir ligandın bağlanma süreci biyolojik olarak bir yapısal yeniden düzenleme gerektirebilir. Bağlanma enerjisi bu sürecin doğal yönlerinden biridir. Proteinin esnekliğini yok sayan moleküler yerleştirme algoritmaları bu anlamda büyük bir handikaba sahiptir (Salo-Ahen ve ark., 2020). Birçok moleküler yerleştirme algoritmaları protein yapıyı protein veri bankasından PDB formatında alındığı şekliyle kabul eder (rcsb.org). Protein yapı ya esnek değildir ya da bazı rezidülerine kısmi esneklik kazandırılmıştır. Bir ligandın deneysel olarak elde edilmiş bir X-RAY kristal yapıya direkt kenetlenmesinin kristal yapının el edilme aşamasında sıkılaşma riski nedeniyle

biyolojik yapıdan uzaklaşılması nedeniyle başarısız olma eğilimi göz ardı edilmemelidir. Bu tür problemler özellikle protein-protein kenetlenmesinde daha dikkat çekici boyuttadır. Bunun nedeni proteinlerin birbirleriyle bağlanırken konformasyonel değişiklik yapma olasılıklarının çok yüksek olmasıdır. Bir proteinin farklı konformasyonları X-RAY olarak elde edilmişse bu durum ligand yerleştirme aşamasında ligand esnekliğinin gözlemlenebilmesi bakımından önemli avantaj sağlayabilir (Konstantinidis ve ark., 2021). Protein esnekliği hesaba katıldığında ise çözümler çok daha sınırlıdır. Bunun için konformasyonları MD simülasyonlar ile çeşitlendirilmiş aynı proteinin farklı konformerleri üzerinde ligand setlerinin moleküler yerleştirilmesi yapılabilir (Duzgun ve ark., 2021). Moleküler yerleştirme çalışmalarında MD simülasyonların kullanılması önemli avantajlar sağlayabilmektedir (Carlson & McCammon, 2000). Moleküler yerleştirme yaklaşımı yüksek hızı ve kabul edilebilir bir doğruluğa sahip olması nedeniyle yüzbinlerce molekülün hızlıca taranmasında gümümüzde altın standarttır. MD simülasyonlar ise yüksek hesaplama maliyeti ve görece daha uzun zaman gerektirdiğinden sanal taramadan elde edilen çok küçük bir azınlık grup için uygulanabilir olabilmektedir (Lavecchia & Di Giovanni, 2013). İlaç keşfi çalışmalarında her bir bileşiğin protein üzerinde etkinliğini belirlemek deneysel olarak son derece pahalı ve zaman alıcıdır. Bunun yerine günümüzde birçok molekül önce sanal olarak moleküler yerleştirme algoritmaları ile taranmakta ve yüksek skora sahip az sayıda bileşik ile çeşitli MD simülasyon çalışmaları yapılabilmektedir. Buradan elde edilen umut vaat eden birkaç bileşik deneysel olarak validasyon çalışmalarına alınmaktadır. MD simülasyon çalışmalarında çok yaygın olarak Moleküler mekanik Poisson Boltzmann MM/PBSA yöntemi, hızı ve güvenilirliği nedeniyle tercih edilmektedir (Lavecchia & Di Giovanni, 2013). Bir uç nokta hesaplama yöntemi olan MM/PBSA ile serbest bağlanma enerjisi, ileri düzey hesaplama metodolojilerine gerek duyulmadan hesaplanabilmektedir.

Günümüzde MD simülasyon ilaç keşfi çalışmalarında artık bir altın standart haline gelmiştir. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD) artık saygın bir alan haline gelmiş ve birçok bilim dalının ilgisini çekerek hızla multidisipliner hale gelmiştir. Bir çalışmada Moleküler mekanik genelleştirilmiş uyanma (MMGBSA) yöntemi ile ligandların mutlak bağlanma serbest enerjileri hesaplanmış ve proteinler üzerinde ligandlar ile etkileşim

kurabilecek sıcak noktaların nasıl keşfedileceği gösterilmiştir (K. Huang ve ark., 2020). Bir diğer çalışmada ise hücre gelişimi ve farklılaşmasından sorumlu bir proteinin (PRC2) bilinen inhibitörleri ile MMGBSA hesaplamaları vasıtasıyla nasıl yüksek bağlanma afinitelerine sahip oldukları gösterilmiştir (Y. Zhao ve ark., 2022). Buna ilave olarak alanin taraması metodu kullanılarak PRC2 üzerindeki bağlanma enerjisine katkıda bulunan aminoasitler belirlenebilmiştir (D. Huang ve ark., 2020). Böyle bir çalışma sadece mevcut inhibitörlerin etkinliklerini göstermekle kalmadı gelecekte de yeni ilaçların geliştirilebilmesi için araştırmacılara önemli bilgiler de sağlamış oldu.

Allosterik düzenlemeler

Proteinlerin en karakteristik özelliklerinin başında dinamik karakterlerini ortaya çıkaran konformasyonel geçişlere sahip olabilmeleridir. Proteinlere işlevsel özellik kazandıran konformasyonel dinamikler allosteri kavramını ortaya çıkarmıştır ve bu olgu protein biyokimyasının ortaya çıkışının ilk zamanlarında bile araştırma konusu olmuştur (Liu & Nussinov, 2016). Proteinde allosterik mekanizmalar küçük konformasyonel geçişlerden geniş çapta dördüncül kaymalara kadar uzanır. Allosterik sınırlar içinde gerçekleşen konformasyon kaymaları genellikle basit olarak değerlendirilir. Buradan hareketle moleküler simülasyonlar ile allosterik geçişlerin anlaşılması kaçınılmaz hale gelmiştir. Buna karşın klasik atomistik simülasyonlarda allosterik geçiş güzergahını belirlemek kolay değildir (Greener ve ark., 2017). Daha önce bahsettiğimiz ileri MD simülasyon yöntemleri ile bu geçiş güzergahlarını ortaya çıkarmak mümkündür. Böylece termodinamik olarak enerji yüzey haritalarında allosterik geçiş güzergahlarını belirlenerek ayrıntılı sonuçlar almak mümkündür (Maximova ve ark., 2016). İleri MD simülasyon yöntemleri kullanmaksızın klasik yöntemler ile konformasyonel toplulukları yakalamak çok zordur. Bu durum sadece bazı proteinler için mümkün olabilmektedir. Örneğin Bacillus stearothermophilus laktat dehidrojenazda konformasyonel geçişi 50 ns içinde tespit edebilmek mümkündür. Bu enzimin iki allosterik geçişi olduğu gösterilmiştir. Bunlardan biri tamamen aktifken diğer durum daha az aktif olan dimerik yapıdır. Fruktoz-1,6-bifosfat, tetramerik durumda allosterik geçiş meydana getirmektedir. Protein üzerinde mutagenez yapıldığında kararlı dimerik yapıların meydana geldiği gözlenmiş ve tetramerik yapı meydana geldiğinde konformasyonel değişiklerin meydana geldiği

görülmüştür (Hospital ve ark., 2015; Wigley ve ark., 1988, 1992). MD simülasyonlar vasıtasıyla allosterik düzenlemelerin gözlenmesi ve analiz edilmesi, yöntemin gücünü göstermesi bakımından dikkat çekicidir. Buna rağmen tüm olgularda uygulanabilmesi için kat edilmesi gereken yol vardır.

Protein yapı tahmini ve MD simülasyon ile rafinasyonu

Yapısal biyoinformatiğin en öncelikli konuları arasında üç boyutlu yapısı bilinmeyen proteinlerin yapısının tahmin edilmesi vardır. Protein yapısının teorik modelini oluşturmak için çok uzun süreli MD simülasyonlar yapmak pratik olmamasına rağmen "ab-initio" (en baştan) olarak yapı tahmini uygulamalarında tercih edilmiştir (Chou, 2004). En baştan protein katlanması için çok uzun süreli simülasyonlar yapmak yerine şablon temelli modelleme teknikleri kullanmak daha etkilidir. Bu tip bir modelleme yönteminde ilgilenilen proteine üç boyutlu olarak yüksek benzerlik gösteren ve yapısı tam olarak bilinen proteinler şablon olarak kullanılır (Ginalski, 2006). Modelleme algoritması iki veriyi kullanır. Birincisi ilgilenilen proteinin aminoasit dizisi; diğeri ise bu diziye uydurulacak bilinen üç boyutlu protein yapısı ya da bir fragmentidir. Modelleme işlemi gerçekleştikten sonra yapının biyolojik forma yakınlaştırılması için MD simülasyon aşamasına geçilir. Böylece protein içindeki etkileşimler gevşetilmiş ve doğal forma yaklaştırılmış olur. Simülasyon Proteinin yapısının enerji yüzeyini daha uyumlu hale getirmiş ve daha gerçekçi bir model ortaya çıkmış olur. Bu yöntem teorik olarak başaralı olsa da modellemede kullanılan şablonun doğal konformasyona yüksek benzerlikte olması beklenmelidir. Yanlış konformasyon seçimi sonucu MD simülasyonun proteini doğru konformasyona yönlendirmesi mümkün olmayabilir. Protein yapı tahminin eleştirel değerlendirilmesi olarak isimlendirilen bir yarışma ile üç boyutlu yapısı bilinen fakat literatüre sunulmamış proteinlerin modellenmesi yarışmaları (CASP) yapılmaktadır. Bu yarışmada araştırmacılar ürettikleri algoritmalar ile doğru yapıya yaklaşmaya çalışmaktadırlar (Kryshtafovych ve ark., 2019). Son yapılan yarışmada yapay zekâ destekli AlfaFold isimli algoritma %90 üzerinde başarı göstererek yeni bir çağın açıldığının göstergesi olmuştur (Jumper ve ark., 2021b, 2021a). Ayrıca elde edilen tahmini yapıların iyileştirilmesinde farklı MD yaklaşımları geliştirilmiş ve doğal yapıya daha yakın temsiller oluşturulmuştur (Hospital ve ark., 2015; Jumper ve ark., 2021b).

MD SİMÜLASYONUN PERSPEKTİFİ VE GELECEĞİ

Günümüzde pek çok gelişmiş örnekleme yöntemleri vardır ve yenileri de geliştirilmeye devam etmektedir. Bilimsel problemin çeşidine göre bu tür yöntemlerin tekil ya da kombine olarak kullanımı protein dünyasında yeni keşiflerin kapısını açmış ve gelecekte üstel olarak bu tür çalışmalar artmaya devam edecektir (X. Wu ve ark., 2022). Moleküler dinamik simülasyon uygulamalarının kullanımı basitleştikçe, kullanılan bilgisayar sistemlerinin performansı arttıkça ulaşılabilirliği artacak ve tıpkı PCR gibi Moleküler biyoloji, Farmakoloji, Tıbbi Biyoloji, Tıbbi Biyokimya vb. laboratuvarlarında rutin olarak kullanılabilecektir. Ayrıca GPU'ların ve yazılım mimarilerinin gelişmesi ile milisaniye düzeyinde simülasyonların gerçekleşmesi uzak bir gelecekte değildir. Birçok biyolojik olayın genelde milisaniye düzeyinde gerçekleştiğini düşünürsek yakın gelecekte MD simülasyonunun çok daha fazla adından bahsettireceği bir tahminden ötedir. (Ciccotti ve ark., 2014; Durrant & McCammon, 2011; Hollingsworth & Dror, 2018; Hospital ve ark., 2015; Patodia ve ark., 2014; Salo-Ahen ve ark., 2020; Stone ve ark., 2010). MD simülasyonun deneysel yöntemler ile tamamlayıcı olarak uyum göstermesi bu alanda önemli bir fırsatı temsil ettiği anlamı taşımaktadır. Bu fırsat MD simülasyonların maliyetinin daha da azalması ve kullanıcı dostu haline gelmesi ile daha fazla büyüme eğilimindedir (Hollingsworth & Dror, 2018).

KAYNAKÇA

Abel, R., Wang, L., Harder, E. D., Berne, B. J., & Friesner, R. A. (2017). Advancing drug discovery through enhanced free energy calculations. *Accounts of Chemical Research*, *50*(7), 1625–1632.

Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, *1–2*, 19–25. https://doi.org/10.1016/J.SOFTX.2015.06.001

Ahmadi, S., Barrios Herrera, L., Chehelamirani, M., Hostaš, J., Jalife, S., & Salahub, D. R. (2018). Multiscale modeling of enzymes: QM-cluster, QM/MM, and QM/MM/MD: a tutorial review. *International Journal of Quantum Chemistry*, *118*(9), e25558.

Alder, B. J., & Wainwright, T. E. (1957). Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of Chemical Physics*, *27*(5), 1208–1209.

Andersen, H. C. (1980). Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature. *The Journal of Chemical Physics*, *72*(4), 2384–2393.

Barducci, A., Bonomi, M., & Parrinello, M. (2011). Metadynamics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *1*(5), 826–843.

Barducci, A., Bussi, G., & Parrinello, M. (2008). Well-tempered metadynamics: a smoothly converging and tunable free-energy method. *Physical Review Letters*, *100*(2), 20603.

Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D., & van Drunen, R. (1995). GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer Physics Communications*, *91*(1–3), 43–56.

Boehr, D. D., Nussinov, R., & Wright, P. E. (2009). The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nature Chemical Biology*, *5*(11), 789–796.

Brown, D., & Clarke, J. H. R. (1984). A comparison of constant energy, constant temperature and constant pressure ensembles in molecular dynamics simulations of atomic liquids. *Molecular Physics*, *51*(5), 1243–1252.

Bruce, N. J., Ganotra, G. K., Kokh, D. B., Sadiq, S. K., & Wade, R. C. (2018). New approaches for computing ligand–receptor binding kinetics. *Current Opinion in Structural Biology*, *49*, 1–10.

Car, R., & Parrinello, M. (1985). Unified approach for molecular dynamics and density-functional theory. *Physical Review Letters*, *55*(22), 2471.

Carlson, H. A., & McCammon, J. A. (2000). Accommodating protein flexibility in computational drug design. *Molecular Pharmacology*, *57*(2), 213–218.

Chen, W., Deng, Y., Russell, E., Wu, Y., Abel, R., & Wang, L. (2018). Accurate

calculation of relative binding free energies between ligands with different net charges. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *14*(12), 6346–6358.

Chou, K.-C. (2004). Structural bioinformatics and its impact to biomedical science. *Current Medicinal Chemistry*, *11*(16), 2105–2134.

Ciccotti, G., Ferrario, M., & Schuette, C. (2014). Molecular dynamics simulation. *Entropy*, *16*(233), 1.

Dai, X., & Chen, Y. (2022). Computational Biomaterials: Computational Simulations for Biomedicine. *Advanced Materials*, 2204798.

Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery, 59 Journal of Medicinal Chemistry 4035 (2016). https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jmedchem.5b01684

Di Pierro, M., Elber, R., & Leimkuhler, B. (2015). A stochastic algorithm for the isobaric–isothermal ensemble with Ewald summations for all long range forces. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*(12), 5624–5637.

Do, P.-C., Lee, E. H., & Le, L. (2018). Steered molecular dynamics simulation in rational drug design. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *58*(8), 1473–1482.

Durrant, J. D., & McCammon, J. A. (2011). Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology*, *9*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-71/FIGURES/4

Duzgun, Z., Kural, B. V., Orem, A., & Yildiz, I. (2021). In silico investigation of the interactions of certain drugs proposed for the treatment of Covid-19 with the paraoxonase-1. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–13.

Eslami, H., & Müller-Plathe, F. (2007). Molecular dynamics simulation in the grand canonical ensemble. *Journal of Computational Chemistry*, *28*(10), 1763–1773.

Freddolino, P. L., Arkhipov, A. S., Larson, S. B., McPherson, A., & Schulten, K. (2006). Molecular dynamics simulations of the complete satellite tobacco mosaic virus. *Structure*, *14*(3), 437–449.

Ginalski, K. (2006). Comparative modeling for protein structure prediction. *Current Opinion in Structural Biology*, *16*(2), 172–177.

Greener, J. G., Filippis, I., & Sternberg, M. J. E. (2017). Predicting protein dynamics and allostery using multi-protein atomic distance constraints. *Structure*, *25*(3), 546–558.

Groenhof, G. (2013). Introduction to QM/MM simulations. *Biomolecular Simulations*, 43–66.

Halgren, T. A. (1996a). Merck molecular force field. III. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, *17*(5-6), 553–586.

Halgren, T. A. (1996b). Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, *17*(5-6), 490–519. http://journals.wiley.com/jcc

Harvey, M. J., Giupponi, G., & Fabritiis, G. De. (2009). ACEMD: accelerating biomolecular dynamics in the microsecond time scale. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *5*(6), 1632–1639.

Hernández-Rodríguez, M., C Rosales-Hernández, M., E Mendieta-Wejebe, J., Martínez-Archundia, M., & Correa Basurto, J. (2016). Current tools and methods in molecular dynamics (MD) simulations for drug design. *Current Medicinal Chemistry*, *23*(34), 3909–3924.

Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, *99*(6), 1129–1143.

Hospital, A., Goñi, J. R., Orozco, M., & Gelpí, J. L. (2015). Molecular dynamics simulations: advances and applications. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry: AABC*, *8*, 37. https://doi.org/10.2147/AABC.S70333

Hou, T., Wang, J., Li, Y., & Wang, W. (2011). Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *51*(1), 69–82. https://doi.org/10.1021/ci100275a

Huang, D., Tian, S., Qi, Y., & Zhang, J. Z. H. (2020). Binding Modes of Small-Molecule Inhibitors to the EED Pocket of PRC2. *ChemPhysChem*, *21*(3), 263–271.

Huang, J., Craggs, T. D., Christodoulou, J., & Jackson, S. E. (2007). Stable intermediate states and high energy barriers in the unfolding of GFP. *Journal of Molecular Biology*, *370*(2), 356–371.

Huang, K., Luo, S., Cong, Y., Zhong, S., Zhang, J. Z. H., & Duan, L. (2020). An accurate free energy estimator: based on MM/PBSA combined with interaction entropy for protein–ligand binding affinity. *Nanoscale*, *12*(19), 10737–10750.

Jo, S., Chipot, C., & Roux, B. (2015). Efficient determination of relative entropy using combined temperature and hamiltonian replica-exchange molecular dynamics. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *11*(5), 2234–2244.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., & Potapenko, A. (2021a). Applying and improving AlphaFold at CASP14. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *89*(12), 1711–1721.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., & Potapenko, A. (2021b). Highly

accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583–589.

Karplus, M., Levitt, M., & Warshel, A. (2013). The nobel prize in chemistry 2013. *Nobel Media AB 2014*.

Klein, M. L., & Shinoda, W. (2008). Large-scale molecular dynamics simulations of self-assembling systems. *Science*, *321*(5890), 798–800.

Komeiji, Y., Haraguchi, M., & Nagashima, U. (2001). Parallel molecular dynamics simulation of a protein. *Parallel Computing*, *27*(8), 977–987.

Konstantinidis, K., Karakasiliotis, I., Anagnostopoulos, K., & Boulougouris, G. C. (2021). On the estimation of the molecular inaccessible volume and the molecular accessible surface of a ligand in protein–ligand systems. *Molecular Systems Design & Engineering*, *6*(11), 946–963.

Kryshtafovych, A., Schwede, T., Topf, M., Fidelis, K., & Moult, J. (2019). Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP)—Round XIII. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *87*(12), 1011–1020.

Laio, A., Rodriguez-Fortea, A., Gervasio, F. L., Ceccarelli, M., & Parrinello, M. (2005). Assessing the accuracy of metadynamics. *The Journal of Physical Chemistry B*, *109*(14), 6714–6721.

Lavecchia, A., & Di Giovanni, C. (2013). Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review. *Current Medicinal Chemistry*, *20*(23), 2839–2860.

Lazim, R., Suh, D., & Choi, S. (2020). Advances in molecular dynamics simulations and enhanced sampling methods for the study of protein systems. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6339. https://doi.org/10.3390/IJMS21176339

Limongelli, V. (2020). Ligand binding free energy and kinetics calculation in 2020. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *10*(4), e1455.

Liu, J., & Nussinov, R. (2016). Allostery: an overview of its history, concepts, methods, and applications. *PLoS Computational Biology*, *12*(6), e1004966.

MacKerell Jr, A. D., Banavali, N., & Foloppe, N. (2000). Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, *56*(4), 257–265.

MacKerell Jr, A. D., & Banavali, N. K. (2000). All-atom empirical force field for nucleic acids: II. Application to molecular dynamics simulations of DNA and RNA in solution. *Journal of Computational Chemistry*, *21*(2), 105–120.

Makarov, D. E. (2009). Computer Simulations and theory of protein translocation. *Accounts of Chemical Research*, *42*(2), 281–289. https://doi.org/10.1021/AR800128X/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AR-2008-00128X_0001.GIF

Maximova, T., Moffatt, R., Ma, B., Nussinov, R., & Shehu, A. (2016). Principles and overview of sampling methods for modeling macromolecular structure and dynamics. *PLoS Computational Biology*, *12*(4), e1004619.

McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, *267*(5612), 585–590.

Metropolis, N., & Ulam, S. (1949). The monte carlo method. *Journal of the American Statistical Association*, *44*(247), 335–341.

Miao, Y., & McCammon, J. A. (2016). Unconstrained enhanced sampling for free energy calculations of biomolecules: a review. *Molecular Simulation*, *42*(13), 1046–1055.

Nagpal, P., Jamal, S., Singh, H., Ali, W., Tanweer, S., Sharma, R., Grover, A., & Grover, S. (2020). Long-range replica exchange molecular dynamics guided drug repurposing against tyrosine kinase PtkA of Mycobacterium tuberculosis. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11.

Nelson, M. T., Humphrey, W., Gursoy, A., Dalke, A., Kalé, L. V, Skeel, R. D., & Schulten, K. (1996). NAMD: a parallel, object-oriented molecular dynamics program. *The International Journal of Supercomputer Applications and High Performance Computing*, *10*(4), 251–268.

Nielsen, S. O. (2013). Nested sampling in the canonical ensemble: Direct calculation of the partition function from NVT trajectories. *The Journal of Chemical Physics*, *139*(12), 124104.

Parton, D. L., Grinaway, P. B., Hanson, S. M., Beauchamp, K. A., & Chodera, J. D. (2016). Ensembler: Enabling high-throughput molecular simulations at the superfamily scale. *PLoS Computational Biology*, *12*(6), e1004728.

Patodia, S., Bagaria, A., & Chopra, D. (2014). Molecular dynamics simulation of proteins: A brief overview. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, *4*(6), 1.

Ponder, J. W., & Case, D. A. (2003). Force fields for protein simulations. *Advances in Protein Chemistry*, *66*, 27–85.

Prezhdo, O. V, & Rossky, P. J. (1997). Evaluation of quantum transition rates from quantum-classical molecular dynamics simulations. *The Journal of Chemical Physics*, *107*(15), 5863–5878.

Price, D. J., & Brooks III, C. L. (2002). Modern protein force fields behave comparably in molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, *23*(11), 1045–1057.

Pu, C., Yan, G., Shi, J., & Li, R. (2017). Assessing the performance of docking scoring function, FEP, MM-GBSA, and QM/MM-GBSA approaches on a series of PLK1 inhibitors. *MedChemComm*, *8*(7), 1452–1458.

Rahman, A. (1964). Correlations in the motion of atoms in liquid argon. *Physical*

Review, *136*(2A), A405.

Rappé, A. K., Casewit, C. J., Colwell, K. S., Goddard III, W. A., & Skiff, W. M. (1992). UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, *114*(25), 10024–10035.

Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G., & Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics*, *23*(3), 327–341.

Salo-Ahen, O. M. H., Alanko, I., Bhadane, R., Bonvin, A. M. J. J., Honorato, R. V., Hossain, S., Juffer, A. H., Kabedev, A., Lahtela-Kakkonen, M., & Larsen, A. S. (2020). Molecular dynamics simulations in drug discovery and pharmaceutical development. *Processes*, *9*(1), 71.

Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., Walker, R. C., Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., & Walker, R. C. (2013a). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *3*(2), 198–210. https://doi.org/10.1002/wcms.1121

Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., Walker, R. C., Salomon-Ferrer, R., Case, D. A., & Walker, R. C. (2013b). An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *3*(2), 198–210. https://doi.org/10.1002/wcms.1121

Schierz, P., Zierenberg, J., & Janke, W. (2015). Molecular Dynamics and Monte Carlo simulations in the microcanonical ensemble: Quantitative comparison and reweighting techniques. *The Journal of Chemical Physics*, *143*(13), 134114.

Scott, W. R. P., Hünenberger, P. H., Tironi, I. G., Mark, A. E., Billeter, S. R., Fennen, J., Torda, A. E., Huber, T., Krüger, P., & van Gunsteren, W. F. (1999). The GROMOS biomolecular simulation program package. *The Journal of Physical Chemistry A*, *103*(19), 3596–3607.

Shaw, D. E., Dror, R. O., Salmon, J. K., Grossman, J. P., Mackenzie, K. M., Bank, J. A., Young, C., Deneroff, M. M., Batson, B., & Bowers, K. J. (2009). *Millisecond-scale molecular dynamics simulations on Anton. SC '09 Proceedings of the Conference on High Performance Computing, Networking, Storage and Analysis. Association for Computing Machinery, New York, NY. 1–11*.

Sinha, S., Tam, B., & Wang, S. M. (2022). Applications of Molecular Dynamics Simulation in Protein Study. *Membranes*, *12*(9), 844.

Sloot, P. M. A., & Hoekstra, A. G. (2010). Multi-scale modelling in computational biomedicine. *Briefings in Bioinformatics*, *11*(1), 142–152.

Smith, V. L. (2010). Theory and experiment: What are the questions? *Journal of Economic Behavior & Organization*, *73*(1), 3–15. https://doi.org/10.

1016/J.JEBO.2009.02.008

Stillinger, F. H., & Rahman, A. (1974). Improved simulation of liquid water by molecular dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, *60*(4), 1545–1557.

Stone, J. E., Hardy, D. J., Ufimtsev, I. S., & Schulten, K. (2010). GPU-accelerated molecular modeling coming of age. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, *29*(2), 116–125.

Tozzini, V. (2005). Coarse-grained models for proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *15*(2), 144–150. https://doi.org/10.1016/J.SBI.2005.02.005

Wang, L., Wu, Y., Deng, Y., Kim, B., Pierce, L., Krilov, G., Lupyan, D., Robinson, S., Dahlgren, M. K., & Greenwood, J. (2015). Accurate and reliable prediction of relative ligand binding potency in prospective drug discovery by way of a modern free-energy calculation protocol and force field. *Journal of the American Chemical Society*, *137*(7), 2695–2703.

Warshel, A., & Levitt, M. (1976). Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, *103*(2), 227–249.

Wigley, D. B., Gamblin, S. J., Turkenburg, J. P., Dodson, E. J., Piontek, K., Muirhead, H., & Holbrook, J. J. (1992). Structure of a ternary complex of an allosteric lactate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus at 2· 5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, *223*(1), 317–335.

Wigley, D. B., Muirhead, H., Gamblin, S. J., & Holbrook, J. J. (1988). Crystallization of a ternary complex of lactate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus. *Journal of Molecular Biology*, *204*(4), 1041–1043.

Wu, F.-X., Yang, J.-F., Mei, L.-C., Wang, F., Hao, G.-F., & Yang, G.-F. (2021). PIIMS Server: a web server for mutation hotspot scanning at the protein–protein interface. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *61*(1), 14–20.

Wu, X., Xu, L. Y., Li, E. M., & Dong, G. (2022). Application of molecular dynamics simulation in biomedicine. *Chemical Biology & Drug Design*, *99*(5), 789–800. https://doi.org/10.1111/CBDD.14038

Xu, D., Williamson, M. J., & Walker, R. C. (2010). Advancements in molecular dynamics simulations of biomolecules on graphical processing units. In *Annual Reports in Computational Chemistry* (Vol. 6, pp. 2–19). Elsevier.

Yang, Y. I., Shao, Q., Zhang, J., Yang, L., & Gao, Y. Q. (2019). Enhanced sampling in molecular dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, *151*(7), 70902.

You, W., Tang, Z., & Chang, C.-E. A. (2019). Potential mean force from umbrella sampling simulations: What can we learn and what is missed? *Journal of Chemical Theory and Computation*, *15*(4), 2433–2443.

Zhao, H., & Caflisch, A. (2015). Molecular dynamics in drug design. *European Journal*

of Medicinal Chemistry, *91*, 4–14. https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2014.08.004

Zhao, Y., Guan, Y.-Y., Zhao, F., Yu, T., Zhang, S.-J., Zhang, Y.-Z., Duan, Y.-C., & Zhou, X.-L. (2022). Recent strategies targeting Embryonic Ectoderm Development (EED) for cancer therapy: Allosteric inhibitors, PPI inhibitors, and PROTACs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 114144.

Zwier, M. C., & Chong, L. T. (2010). Reaching biological timescales with all-atom molecular dynamics simulations. *Current Opinion in Pharmacology*, *10*(6), 745–752.

BÖLÜM 2

RNA SPLICING HATALARI ve GÜNCEL TEDAVİ YÖNTEMLERİ

Dr. Öğr. Üyesi Egemen AKGÜN [1]

[1] Giresun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD. Giresun, TÜRKİYE egemen.akgun@giresun.edu.tr, Orcid ID: 0000-0003-1979-419X

GİRİŞ

RNA splicing (uç birleştirme) mekanizması, yeni transkribe edilmiş pre-mRNA (öncül messenger RNA) molekülünden olgun mRNA ve diğer bazı RNA türlerinin üretilebilmesi için elzem bir mekanizmadır. Hem ökaryotik hem de prokaryotik genlerde (Lambowitz ve Zimmerly, 2004) karşımıza çıkan bu mekanizma ile transkripsiyondan sonra gene ait kodlama yapmayan bölgeler (ekzon) RNA molekülünden uzaklaştırılır ve kodlamaya katılan diziler (intron) uç uça birleştirilir (splicing).

Uç birleştirme mekanizması ilk olarak 1977 yılında, iki ayrı araştırma grubu tarafından keşfedildi (Berget ve ark., 1977; Chow ve ark., 1977). Richard Roberts ve Phillip Sharp adenovirüs 2 geç mRNA'sı üzerinde yaptıkları hibridizasyon çalışmalarıyla, mRNA dizisinin, virüs genomunun farklı bölgeleriyle bölünmüş (split) olarak eşleştiğini ortaya çıkardılar. Artık uç birleştirme olarak bilinen mekanizmanın temelini oluşturan bu bulguları nedeniyle, Roberts ve Sharp 1993 yılında Nobel ödülünü kazandılar.

RNA uç birleştirme mekanizması ökaryotik mRNA moleküllerinin olgunlaştırılması sürecinin vazgeçilmez bir aşaması olmasının yanında, mekanizmanın alternatif formu ile tek bir genden her bir farklı dokuda optimum olarak çalışan proteinlerin oluşturulması için de gereklidir. Aynı zamanda bu mekanizma yaklaşık 20.000 protein kodlayan gene sahip insanlardaki protein çeşitliliğini de açıklamaktadır (Keren ve ark., 2010). Yeni nesil sekanslama teknolojilerinin gelişimi ile birlikte çoklu ekzonlara sahip ökaryotik genlerin yaklaşık %95'inin alternatif uç birleştirmeye uğradığı ön görülmektedir (Wang ve ark., 2008).

Evrimsel süreçte oldukça iyi korunan uç birleştirme mekanizması, çok hücreli ökaryotlarda intron içeren genlerin daha fazla olması nedeniyle hem daha yaygın hem de daha karmaşıktır (Kornblihtt ve ark., 2013). Protein kodlayan genlerin toplam sayısı göz önüne alındığında türler arasındaki fark oldukça az olduğundan alternatif uç birleştirme mekanizmasının organizma çeşitliliğine katkısının büyük olabileceği düşünülmektedir (Barbosa-Morais ve ark., 2012; Kornblihtt ve ark., 2013).

Organizma için bu kadar önemli bir mekanizmada meydana gelen bozukluklar, kodlama ve çerçeve kayması gibi sonuçlara sebep olabileceğinden üretilen proteinin miktarı ya da aktivitesinde ciddi sorunlara yol açacaktır.

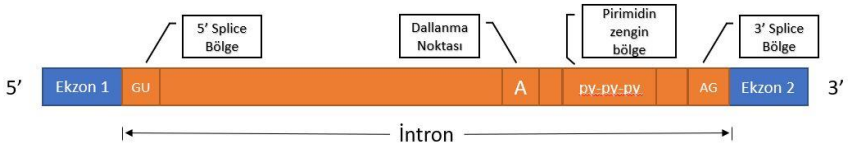
1. Uç birleştirme Mekanizması

Ökaryotik organizmalardaki uç birleştirme işlemi, ***splicesozom*** adı verilen ve snRNA (küçük nüklear ribonükleik asit) molekülleri ile proteinlerden oluşan büyük bir snRNP (ribonükleoprotein) kompleksi tarafından yürütülür (Cvitkovic ve Jurica, 2013; Schmidt ve ark., 2014). Kompleksin ana görevi, uç birleştirme yapılacak bölgenin tanınması ve uç birleştirme reaksiyonlarının katalizlenmesidir.

Bilinen iki tip splicesozom kompleksi bulunmaktadır. Major splicesozomlar beş tane snRNA (U1, U2, U4, U5 ve U6) ve çok sayıda ilişkili proteinin bir araya gelmesiyle oluşur (M. S. Jurica ve Moore, 2003; Wahl ve ark., 2009). Minör splicesozom kompleksi de benzer şekilde beş tane snRNA (U11, U12, U4atac/U6atac, ve U5) ve protein kompleksinden meydana gelir (Turunen ve ark., 2013). Bu iki splicesozom kompleksi yapı olarak benzerlik gösterse de işlenecek mRNA molekülü üzerindeki tanıma bölgelerinin farklılığı, farklı tip intronlarda görev almaları (majör kompleks U2 tipi intronlarda, minör kompleks U12 tipi intronlarda), minör kompleksin nadiren alternatif uç birleştirmede rol alması ve majör kompleks sadece çekirdekte bulunurken minör kompleksin çoğunlukla sitoplazmada bulunması gibi farklı özelliklere sahiptir (van den Hoogenhof ve ark., 2016).

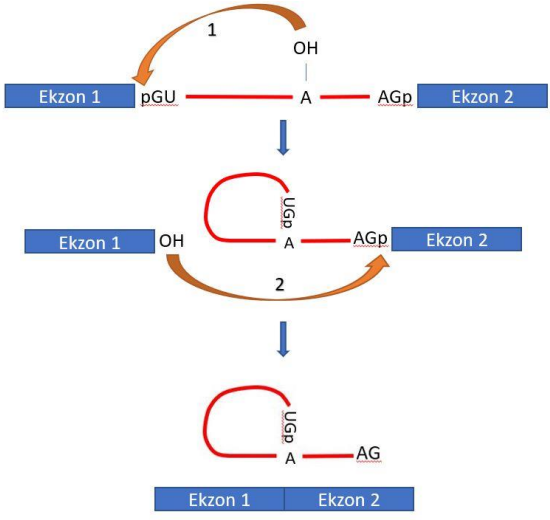
Uç birleştirme reaksiyonuna maruz kalacak intronlarda dört bölge, reaksiyonun tamamlanması için oldukça önemlidir. Bu bölgelerden ***5' ve 3' splice bölgeler***, intronun 5' ucunda ve 3' ucunda bulunur ve sırasıyla U2 tip intronlarda bu uçlar "GU" ve "AG" dinükleotit dizilerine sahipken U12 tip intronlarda yine sırasıyla "AU" ve "AC" dinükleotit dizilerine sahiptirler. Spliceosomun çekirdek elemanları bu korunmuş dizileri tanıyarak ekson-intron kavşaklarına bağlanır. ***Dallanma noktası***, 3' splice bölgeden 18-40 nükleotit (nt) uzaklıkta bir adenozinin bulunduğu noktadır ve transesterifikasyon reaksiyonlarında önemli görevler üstlenir. ***Pirimidin zengin bölge***, intronun 3' ucu ile dallanma bölgesi arasında yer alan ve 15-20 nt uzunluğunda olup

çoğunluğu urasilden oluşan bir dizidir (M. Jurica ve Roybal, 2013; Mercer ve ark., 2015) (şekil 1).



Şekil 1. İntron üzerindeki önemli diziler

Uç birleştirme mekanizması birbirini takip eden iki transesterifikasyon reaksiyonundan meydana gelir. İlk evrede, dallanma bölgesindeki adenozinin 2. pozisyonundaki hidroksil grubunun, 5' splice bölgedeki guanozinin 5. pozisyonundaki fosfat grubuna nükleofilik atağı ile bu bölgedeki intron ve ekzon birbirinden ayrılır. Böylece serbest kalan intronun 5' ucu, adenozinin 2. pozisyonundaki hidrosil grubu ile bağ yapar (2'-5' fosfodiester bağı) ve kement (lariat) oluşumu tamamlanır. İkinci aşamada ise ekzonun ilk reaksiyon sonucu oluşan serbest 3' hidroksil ucu, 3' splice bölgedeki intron-ekzon sınırına saldırarak buradaki fosfodiester bağını koparır. İntronun kement şeklinde uzaklaştırılmasıyla serbest kalan ekzon uçları arasında normal bir fosfodiester bağı (5'-3') oluşturularak iki ekzon birbirine bağlanmış olur (Black, 2003) (şekil 2).



Şekil 2. Splicing (Uç Birleştirme) Mekanizması

Uç birleştirme reaksiyonun başlayabilmesi için öncelikle snRNP moleküllerinin bir araya gelerek splicesozom molekülünü oluşturmaları gerekmektedir. Bunun için de U2 küçük nükleer RNA yardımcı faktör 1 (U2AF1), U2AF2, Splicing Faktörü 1 (SF-1) gibi bazı ek proteinlere ihtiyaç duyulur. Splicesozom kompleksi oldukça dinamik bir yapı olup kompleksi oluşturan yapılar uç birleştirme reaksiyonu boyunca değişikliklere maruz kalır. Splicesozom komplekslerinin oluşumundaki ilk aşama, intronun 5'splice bölgesine U1 snRNP molekülünün bağlanmasıdır. Bunu SF-1'in dallanma bölgesine, U2AF1'in 3' splice bölgeye ve U2AF2'ninde pirimidin zengin bölgeye bağlanması izler (kompleks E). U2 snRNP'nin dallanma noktasına bağlanmasıyla SF-1 bağlandığı yerden ayrılır (kompleks A). Ardından U4*U6/U5 snRNP'ler üçlü halde komplekse katılır U5, ekzonun 5' bölgesine bağlanırken U6 ise U2 ile bağlantı kurar (kompleks B – ön katalitik splicesozom). U1, 5' splice bölgede U6 ile yer değiştirir ve U5 intron-ekzon kavşağına kayar (kompleks B*). Kompleks B*, uç birleştirme mekanizmasındaki ilk transesterifikasyon reaksiyonunu başlatır ve ekzonun 3' serbest kalır. Sonraki aşamada U4 sistemden uzaklaştırılırken artık serbest olan 5' splice bölge de dallanma bölgesindeki adenozine bağlanır (kompleks C-katalitik splicesozom). Daha sonra gerçekleşen yeniden düzenlenmeler ile kompleks C, ikinci transesterifikasyon reaksiyonunu katalizler ve intron kement şeklinde uzaklaştırılarak iki ekzon birbirine bağlanır (Matera ve Wang, 2014; Sun ve Manley, 1995).

2. Uç birleştirme Mekanizmasının Düzenlenmesi

Uç birleştirme yapılacak bölgenin seçiminde, intron üzerindeki 5'- 3' uç ve dallanma noktası dizileri önemli görevler üstlense de sadece bu kısa diziler göz önünde bulundurularak intron ekzon ayrımının yapılabilmesi, genom büyüklüğü ve tanıma dizilerinin kısalığı nedeniyle pek de olası değildir. Bu nedenle uç birleştirme mekanizmasının düzenlenmesi yine pre-mRNA molekülü üzerinde bulunan cis düzenleyici elementler (cis regulating elements) ve trans etkili (trans-acting) düzenleyici proteinlerin karşılıklı etkileşimi ile gerçekleştirilir. Hem intron hem de ekzon dizileri üzerinde bulunabilen bu cis düzenleyici elementlere, splicing düzenleyici elementler (splicing regulator elements – SRE) genel ismi de verilir. SRE'lerin dört tipi bulunur. Bunlar; Ekzonik Splicing Susturucuları (exonic splicing silencer – ESS), Ekzonik

Splicing Hızlandırıcıları (exonic splicing enhancer – ESE), İntronik Splicing Hızlandırıcıları (intronic splicing enhancer – ISE) ve İntronik Splicing Susturucularıdır (intronic splicing silencer – ISS). Bu düzenleyici elementlere bağlanarak uç birleştirme mekanizmasının düzenlenmesinde görev alan trans etkili düzenleyici proteinlerde ise iki önemli protein ailesi öne çıkar. Bunlardan ilki içeriklerinde yüksek miktarda serin ve arjinin amino asidi bulunduğundan **SR proteini** (S ve R sırası ile serin ve arjininin amino asit kısaltmaları) olarak isimlendirilen ailedir. SR proteinleri ESE ve ISE'lere bağlanarak genellikle uç birleştirmeyi artırırlar (Long ve Caceres, 2009). Diğer trans etkili düzenleyici protein ailesi ise hnRNP'dir (heterojen nuclear ribonükleprotein). hnRNP'ler ise ESS ve ISS'lere bağlanarak genellikle uç birleştirmeyi baskılarlar (Chaudhury ve ark., 2010).

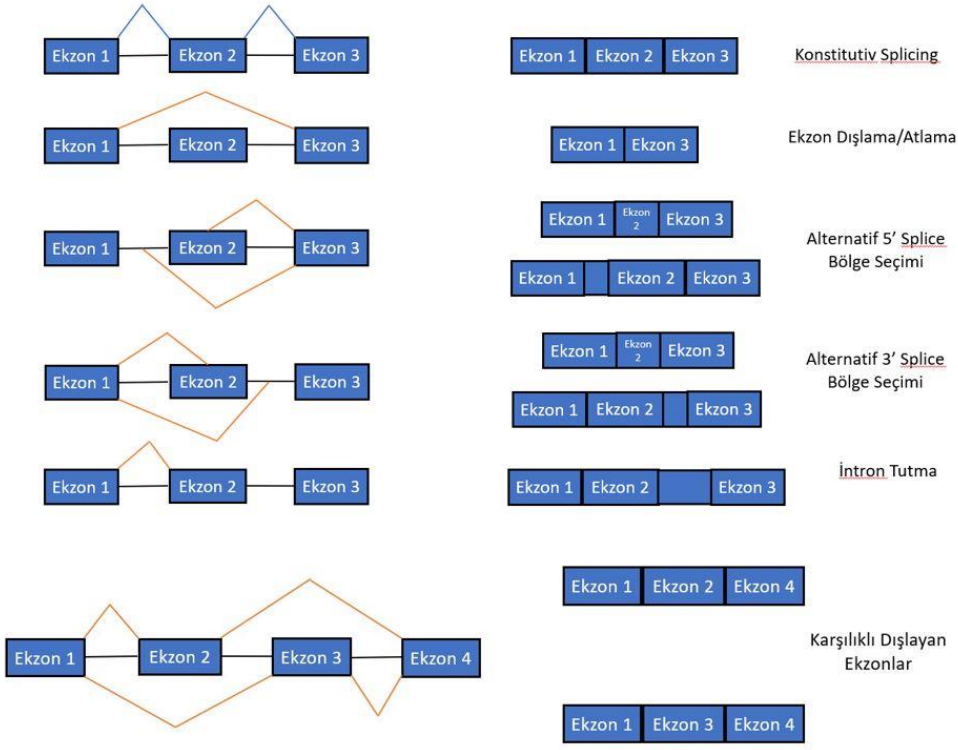
3. Alternatif Uç Birleştirme

Alternatif uç birleştirme, splice bölgelerin orijinalinden farklı kullanılması sonucunda farklı dizilere sahip mRNA moleküllerinin oluşturulabilmesine olanak sağlayan bir mekanizmadır. Sınırlı sayıda kodlayıcı gene sahip canlıların oldukça geniş bir protein çeşitliliğine sahip olmasının da başlıca nedenlerinden biridir. Bu mekanizma basitçe, pre-mRNA molekülünde bulunan bir ya da daha fazla ekzonun atlanması ya da ekzonun uzatılması (komşu intronda bulunan dizilerin eklenmesi) ile gerçekleştirilir. İnsan genleri, ortalama 11.000 nükleotit olan, ancak uzunluklarında önemli farklılıklar olan çoklu intron bölgeleri içerir. Buna karşılık, insan ekzonlarının ortalama uzunluğu 200 nükleotittir (Sakharkar ve ark., 2004). İntron uzunluğundaki bu fark da alternatif uç birleştirme mekanizması için kullanışlı bir alet haline gelmiştir. İntronların bu kadar uzun olması, ekzonların dizi olarak uzatılmasında ve dolayısıyla farklı dizilere sahip olgun mRNA üretiminde neredeyse sınırsız bir çeşitlilik sağlar.

Alternatif uç birleştirme, uç birleştirme bölgesinin normalde olduğundan farklı bir şekilde seçilmesi sonucu dört değişik şekilde meydana gelebilir: ***ekzon dışlama/atlama***, bir ya da daha fazla ekzonun RNA transkribinden çıkarılması; ***alternatif 5' ve 3' splice bölge seçimi***, normal olarak kullanılan uç birleştirme yeri yerine uzak bir ek yeri seçimi sonucu ekzon dizisinin uzatılması ya da kısaltılması; ***intron tutma***, normalde hariç tutulan bir intronun olgun mRNA transkriptinde tutulması; ***karşılıklı olarak dışlayıcı***, iki ekzondan

birinin (veya iki ekzon grubundan bir grubun) korunması, diğerinin ise çıkarılmasıdır (Şekil 3). Alternatif uç birleştirme ile ekzonlar atlanabilir, ancak ekzon sırası asla yeniden düzenlenmez.

Alternatif uç birleştirme mekanizmasının doku bakımı, gelişimi ve hücre farklılaşması üzerine de katkısı bulunmaktadır (Wang et al., 2008). Doku gelişimi ve hücre farklılaşması esnasında trans etkili elementlerin transkripsiyon düzeyleri sıkı bir şekilde denetlenip ayarlanarak bir gen transkripti için farklı dokularda farklı splice bölgelerin seçilebilmesi sağlanır (Baralle ve Giudice, 2017; Bhate ve ark., 2015; Dillman ve ark., 2013; Giudice ve ark., 2014; Llorian ve ark., 2016).



Şekil 3. Alternatif Uç Birleştirme Türleri

4. Uç Birleştirme Hataları ve Hastalıklarla İlişkisi

Splice yapılacak bölgelerin yanlış seçilmesi, ilgili genden üretilecek mRNA molekülünde olması gerekenden farklı dizilerin yer almasına ve dolayısıyla okuma çerçevesinde kaymaya neden olabilir. Bu yanlış okuma

çerçevesi de üretilecek proteinin aktivitesinde azalmadan translasyonun erken ya da geç sonlanmasına kadar değişik derecelerde sorunlara yol açabilir. Bu nedenle uç birleştirme hatalarının çeşitli hastalıklara yol açabileceği yadsınamaz bir gerçektir. Bununla birlikte uç birleştirme hatalarına karşı "anlamsız aracılı bozulma" (NMD) gibi koruyucu süreçler de geliştirilmiştir. Uç birleştirme hatası sonucu değişen açık okuma çerçevesi sonucu erken bir "DUR" kodonun oluşması genellikle bu hatalı mRNA molekülünün protein sentezine uğramadan hızlıca bozulmasına yol açmaktadır. Ancak bu mekanizmanın koruyuculuğu sadece anormal proteinin üretilmesini önlemektir. Genele bakılırsa, ilgili gen işlevsiz kalmaktadır (Sterne-Weiler ve Sanford, 2014). Alternatif uç birleştirmeye uğramış bir mRNA transkriptinin, işlevsel bir alternatif uç birleştirme mi yoksa hatalı bir uç birleştirme işlemi sonucu oluştuğunun ayrımı da oldukça zordur. Bu yüzden ayrım, bu mRNA molekülünden üretilecek proteinin biyolojik olarak işlevsel olup olmaması ile yapılmaktadır.

Uç birleştirme hatalarına yol açabilecek hatalar iki genel başlık altında incelenebilir. (1) Uç birleştirme yapılacak mRNA molekülü üzerindeki dizi mutasyonları, (2) Splicesozom kompleksinin bileşenlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar. Pre-mRNA molekülündeki splice bölgenin tanınmasından sorumlu olan 5' ve 3' uç splice dizileri, dallanma noktası dizileri, çoklu pirimidin dizileri ya da splicing hızlandırıcı dizilerdeki mutasyonlar splicesozom komplekslerinin ekzonları göz ardı etmesine ve ekzon atlanmasına neden olabilir. Bunun tam tersi olarak bu bölgelerdeki mutasyonlar sonucu yeni splicesozom tanıma dizileri ortaya çıkabilir ve ekzonlarla birlikte intronlarda ait diziler de olgun mRNA molekülüne eklenebilir. Pre-mRNA molekülü üzerindeki dizi mutasyonlarının yanında uç birleştirme mekanizmasının çalışmasını sağlayan splicesozom kompleksi elemanları ve splicing yardımcı proteinlerinin mutasyonları da uç birleştirme mekanizmasının orijinalinden sapmasıyla sonuçlanabilecektir (Ezquerra-Inchausti ve ark., 2017; Inoue ve Abdel-Wahab, 2016; Qiu ve ark., 2016; Yip ve ark., 2016). Yapılan hayvan modeli deneyleriyle de oldukça çeşitli insan hastalıkları ve uç birleştirme mekanizmasıyla ilişkili mutasyonlar arasındaki bağlantı gösterilmiştir (Montes ve ark., 2019).

5. Güncel Tedaviler

Eğer hastalık, anormal RNA uç birleştirmesi ya da açık okuma çerçevesindeki kayma sonucu ortaya çıkıyorsa tedavide benimsenen izlem, yanlış uç birleştirmeyi düzeltmek ya da açık okuma penceresini orijinal haline geri getirmektir. Bu stratejiye Duchenne Kas Distrofisi (DMD), Spinal müsküler atrofi (SMA) ya da Kromozom 17'ye Bağlı Frontotemporal Demans ve Parkinsonizm (FTDP-17) gibi nadir görülen genetik hastalıklarda uygulanan tedaviler örnek olarak verilebilir.

Uç birleştirme değiştiricilerinin klinik olarak onaylanmış iki ana sınıfı vardır; antisens sentetik oligonükleotidler (ASO ya da AON) ve küçük moleküller. ASO'lar, tek zincirli sentetik nükleik asit analogları olup hedef RNA molekülüne Watson-Crick baz eşleşmesiyle bağlanarak etkilerini gösterirler. Pre-mRNA molekülü üzerindeki intron ya da ekzon dizilerinde bulunan cis düzenleyici elementlere ASO'ların bağlanması, normalde bu elementlere bağlanarak etkilerini gösteren splicesozom kompleksinin bağlanmasını önler. Örneğin; 5', 3' uç splice bölge ya da dallanma noktasını hedefleyen ASO'ların bu bölgelere bağlanması, splicesozom kompleksinin bu bölgeleri dışlamasına ve sonuç olarak uç birleştirmenin istenilen şekilde değiştirilmesine olanak sağlar. Bununla birlikte ISE ve ESE gibi splicing hızlandırıcı dizilere ASO bağlanması, uç birleştirmenin baskılanmasıyla sonuçlanırken, ISS ve ESS gibi splicing susturucularına ASO bağlanması uç birleştirmenin aktivasyonu ile sonuçlanacaktır (Tang ve ark., 2021).

Duchenne Kas Distrofisi

Duchenne kas distrofisi (DMD), X kromozomuna bağlı resesif kalıtılan nöromüsküler bir hastalık olup distrofin genindeki farklı mutasyonlar (genellikle delesyon) sonucu ortaya çıkar. İnsan genomundaki bilinen en büyük gen olan *distrofin* geni (Xp21.2-p21.1), yaklaşık 2,2 milyon baz çifti uzunluğunda olup 79 ekzona sahiptir (Gao ve McNally, 2015). Distrofin, iç hücre iskeletini (F-aktin) ve hücre dışı matrisi birbirine bağlayan distrofin-glikoprotein kompleksinin bir parçasıdır. Bu protein, çizgili kaslarda kasılma birimleri olarak miyofiberlerin düzgün gelişimi ve organizasyonu için gereklidir. İnsan *distrofin* genindeki mutasyonlar, Duchenne ve Becker Kas Distrofilerine ve DMD ile ilişkili dilate kardiyomiyopati adı verilen bir kalp hastalığına neden olur (Flanigan ve ark., 2003). DMD hastalığına neden olan

mutasyonların %60-70'i tek ya da çoklu ekzonlardaki delesyonlardan, %26'sı nokta mutasyonlarından, %10-15'i ekzonik duplikasyonlardan kaynaklanır (Flanigan ve ark., 2009; Tuffery-Giraud ve ark., 2009). Bu mutasyonların sonucunda genin doğal okuma penceresi bozulur (çerçeve kayması) ve bu da erken bir "DUR" kodonunun oluşumuna bağlı olarak üretilen bozuk/kararsız distrofin proteinin hızlıca bozulmasına neden olur. Sonuç olarak DMD hastalığında, kasların kasılıp gevşemesinin sürdürülebilmesinden sorumlu olan distrofin proteini ya hızlıca bozulur ya da hücrelerde hiç üretilemez.

Tedavide ASO kullanılmasındaki strateji, delesyon mutasyonları sonucu ortaya çıkan çerçeve kaymasını düzeltmek amacıyla, oluşan erken "DUR" kodonunu içeren ekzonun uç birleştirme mekanizması ile çıkartılmasını sağlamaktır. Şu ana kadar DMD tedavisi için bu stratejiyi kullanan dört ASO'ya FDA (U.S. Food and Drug Administration - Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onay verilmiştir. Kullanımına onay verilen ilk ASO, Eteplirsen'dir. DMA hastalarının %14'ünde, 49 ve 50. ekzonlardaki delesyonlar sonucu 51. Ekzonda erken bir "DUR" kodonu oluşmaktadır (Bladen ve ark., 2015). Eteplirsen (Exondys 51), 51. ekzondaki ESE hızlandırıcı dizisine bağlanarak bu ekzonun uç birleştirme esnasında intronla birlikte uzaklaştırılması (ekzonun atlanması) sağlamaktadır. Bu işlem sonucunda her ne kadar 51. ekzonun kaybı söz konusu olsa da doğal tip proteine göre eksik/kısa fakat kısmen işlevsel bir distrofin proteini üretilir (Mendell ve ark., 2013; Miyatake ve ark., 2018). FDA onaylı ve Eteplirsen ile benzer mekanizmalar ile çalışan diğer ASO'lar; ekzon 53'ün atlanmasını sağlayan Golodirsen, ekzon 53'ün atlanmasını sağlayan Viltolarsen ve son olarak ekzon 45'in atlanmasını sağlayan Casimersen'dir.

Spinal Kas Atrofisi

Otozomal resesif bir hastalık olan spinal kas atrofisi (SMA), Ön boynuz hücresi adı verilen ve omurilikteki gri maddenin ön kısmından iskelet kasına uzanan bir motor nöronun dejenerasyonu sonucu ortaya çıkar (Kolb ve Kissel, 2015). Ön boynuz hücrelerinin dejenerasonu ise kas atrofisi ve zayıflıkları, solunum sıkıntısı ve felce neden olmaktadır (Lunn ve Wang, 2008). Dejenerasyonun sebebi *SMN1* (*Motor Nöron Hayatta Kalım 1*) genindeki homozigot delesyon ya da mutasyonlar sonucu SMN proteininin üretimin durmasıdır.

İnsan genomunda birbirine oldukça benzeyen iki *SMN* geni bulunmaktadır; telomerik form (*SMN1*) ve sentromerik form (*SMN2*). Normal bireylerde, *SMN1* geni hemen her transkripsiyonunda normal uzunluk ve özellikteki bir mRNA transkripti kodlar. Ancak *SMN2* geni, 7. ekzonundaki altıncı nükleotitin sitozinden timine dönüşmesi sonucu farklı (alternatif) şekilde uç birleştirmeye uğrar. uç birleştirmedeki bu değişiklik ise ekzon 7'nin atlanmasına/dışlanmasına neden olur. Sonuç olarak bu SMN2 transkriptlerinden üretilen kısa proteinler işlevsizdir ve hızlıca parçalanır. Bununla birlikte SMN2 transkriptlerinden %15'i ekzon atlama mekanizmasından kaçarak işlevsel SMN proteini üretebilir. SMA'lı bireylerde *SMN1* geni işlevsiz olduğundan, *SMN2* kökenli proteinlerin miktarı hastalığın ortaya çıkmasını önleyemez. SMA tedavisinin ASO ya da küçük moleküller tarafından tedavisinin altında yatan fikir işlevsiz haldeki SMN2 ön transkriptlerinin uç birleştirmelerinin ayarlanmasıyla bunlardan fonksiyonel SMN proteinleri üretilmesidir.

Şu ana kadar SMA hastalığının tedavisinde kullanılan iki molekül FDA tarafından onaylanmıştır. Bunlardan ilki bir ASO olan Nusinersen'dir. Nusinersen, SMN2'nin 7. İntronunu üzerinde bulunan, 14 nükleotit uzunluğundaki bir cis elemente (ISS-N1) bağlanır. ISS-N1, hnRNPA1/A2 ve SRSF10 gibi splicing faktörlerinin bağlandığı bir bölge olup ekzon 7'nin uç birleştirme ile çıkarılmasında etkili roller üstlenir (Frederiksen ve ark., 2021; Hua ve ark., 2008). Nusinersen, ISS-N1 bölgesini bağlanarak kapattığında buraya diğer splicing faktörlerinin bağlanmasını önleyerek ekzon 7'nin uç birleştirme ile atlanmasının önüne geçilir. SMA tedavisinde kullanılmasına onay verilen ikinci madde ise küçük bir molekül olan Risdiplam'dır. Risdiplam, SMN2 pre-mRNA (ekzon 7'nin 5' splice bölgesi) ve U1 snRNP (U1 snRNA'nın 5' ucu) kompleksi tarafından oluşturulan geçici çift sarmallı RNA yapısını stabilize eder ve bu da ekzon 7'nin splicesozom kompleksi tarafından tanınmasını kolaylaştırarak ekzon 7'nin olgun mRNA dizisinde yer almasını sağlar (Campagne ve ark., 2019).

SONUÇ

RNA uç birleştirme mekanizması en temel biyolojik süreçlerden biri olmasına karşın birbirleriyle etkileşime giren pek çok bileşenden meydana geldiği için de oldukça karmaşıktır. RNA uç birleştirme

reaksiyonlarında rol alan mekanizmaların daha iyi aydınlatılması, mutasyon kaynaklı uç birleştirme hatalarının düzeltilmesi için yeni yöntem ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır. Her ne kadar şu anda DMD için dört, SMA içinse iki ilaca FDA tarafından onay verilmiş olsa da klinik çalışmaları devam eden ve oldukça umut vaat eden çalışmaların sayısı hızla artmaktadır.

KAYNAKÇA

Baralle, F. E., & Giudice, J. (2017). Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nature reviews Molecular cell biology, 18*(7), 437-451.

Barbosa-Morais, N. L., Irimia, M., Pan, Q., Xiong, H. Y., Gueroussov, S., Lee, L. J., . . . Colak, R. (2012). The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science, 338*(6114), 1587-1593.

Berget, S. M., Moore, C., & Sharp, P. A. (1977). Spliced segments at the 5′ terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 74*(8), 3171-3175.

Bhate, A., Parker, D. J., Bebee, T. W., Ahn, J., Arif, W., Rashan, E. H., . . . Anakk, S. (2015). ESRP2 controls an adult splicing programme in hepatocytes to support postnatal liver maturation. *Nature communications, 6*(1), 1-12.

Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Reviews of Biochemistry, 72*, 291-336.

Bladen, C. L., Salgado, D., Monges, S., Foncuberta, M. E., Kekou, K., Kosma, K., . . . Chamova, T. (2015). The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Human mutation, 36*(4), 395-402.

Campagne, S., Boigner, S., Rüdisser, S., Moursy, A., Gillioz, L., Knörlein, A., . . . Allain, F. H.-T. (2019). Structural basis of a small molecule targeting RNA for a specific splicing correction. *Nature chemical biology, 15*(12), 1191-1198.

Chaudhury, A., Chander, P., & Howe, P. H. (2010). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *Rna, 16*(8), 1449-1462.

Chow, L. T., Gelinas, R. E., Broker, T. R., & Roberts, R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5′ ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell, 12*(1), 1-8.

Cvitkovic, I., & Jurica, M. S. (2013). Spliceosome database: a tool for tracking components of the spliceosome. *Nucleic acids research, 41*(D1), D132-D141.

Dillman, A. A., Hauser, D. N., Gibbs, J. R., Nalls, M. A., McCoy, M. K., Rudenko, I. N., . . . Cookson, M. R. (2013). mRNA expression, splicing and editing in the embryonic and adult mouse cerebral cortex. *Nature neuroscience, 16*(4), 499-506.

Ezquerra-Inchausti, M., Barandika, O., Anasagasti, A., Irigoyen, C., López de Munain, A., & Ruiz-Ederra, J. (2017). High prevalence of mutations affecting the splicing process in a Spanish cohort with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Sci Rep, 7*, 39652. doi:10.1038/srep39652

Flanigan, K. M., Dunn, D. M., von Niederhausern, A., Soltanzadeh, P., Gappmaier, E., Howard, M. T., . . . Weiss, R. B. (2009). Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat, 30*(12), 1657-1666. doi:10.1002/humu.21114

Flanigan, K. M., von Niederhausern, A., Dunn, D. M., Alder, J., Mendell, J. R., & Weiss, R. B. (2003). Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet, 72*(4), 931-939. doi:10.1086/374176

Frederiksen, S. B., Holm, L. L., Larsen, M. R., Doktor, T. K., Andersen, H. S., Hastings, M. L., . . . Andresen, B. S. (2021). Identification of SRSF10 as a regulator of SMN2 ISS-N1. *Human mutation, 42*(3), 246-260.

Gao, Q. Q., & McNally, E. M. (2015). The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Compr Physiol, 5*(3), 1223-1239. doi:10.1002/cphy.c140048

Giudice, J., Xia, Z., Wang, E. T., Scavuzzo, M. A., Ward, A. J., Kalsotra, A., . . . Li, W. (2014). Alternative splicing regulates vesicular trafficking genes in cardiomyocytes during postnatal heart development. *Nature communications, 5*(1), 1-15.

Hua, Y., Vickers, T. A., Okunola, H. L., Bennett, C. F., & Krainer, A. R. (2008). Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *The American Journal of Human Genetics, 82*(4), 834-848.

Inoue, D., & Abdel-Wahab, O. (2016). Modeling SF3B1 Mutations in Cancer: Advances, Challenges, and Opportunities. *Cancer Cell, 30*(3), 371-373. doi:10.1016/j.ccell.2016.08.013

Jurica, M., & Roybal, G. (2013). RNA Splicing.

Jurica, M. S., & Moore, M. J. (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular cell, 12*(1), 5-14.

Keren, H., Lev-Maor, G., & Ast, G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature Reviews Genetics, 11*(5), 345-355.

Kolb, S. J., & Kissel, J. T. (2015). Spinal Muscular Atrophy. *Neurol Clin, 33*(4), 831-846. doi:10.1016/j.ncl.2015.07.004

Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., & Muñoz, M. J. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature reviews Molecular cell biology, 14*(3), 153-165.

Lambowitz, A. M., & Zimmerly, S. (2004). Mobile group II introns. *Annual review of genetics, 38*(1), 1-35.

Llorian, M., Gooding, C., Bellora, N., Hallegger, M., Buckroyd, A., Wang, X., . . . Ule, J. (2016). The alternative splicing program of differentiated smooth muscle cells involves concerted non-productive splicing of post-transcriptional regulators. *Nucleic acids research, 44*(18), 8933-8950.

Long, J. C., & Caceres, J. F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochemical Journal, 417*(1), 15-27.

Lunn, M. R., & Wang, C. H. (2008). Spinal muscular atrophy. *The Lancet, 371*(9630), 2120-2133.

Matera, A. G., & Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nature reviews Molecular cell biology, 15*(2), 108-121.

Mendell, J. R., Rodino-Klapac, L. R., Sahenk, Z., Roush, K., Bird, L., Lowes, L. P., . . . Kota, J. (2013). Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Annals of neurology, 74*(5), 637-647.

Mercer, T. R., Clark, M. B., Andersen, S. B., Brunck, M. E., Haerty, W., Crawford, J., . . . Mattick, J. S. (2015). Genome-wide discovery of human splicing branchpoints. *Genome research, 25*(2), 290-303.

Miyatake, S., Mizobe, Y., Takizawa, H., Hara, Y., Yokota, T., Takeda, S. i., & Aoki, Y. (2018). Exon skipping therapy using phosphorodiamidate morpholino oligomers in the mdx52 mouse model of Duchenne muscular dystrophy. In *Duchenne Muscular Dystrophy* (pp. 123-141): Springer.

Montes, M., Sanford, B. L., Comiskey, D. F., & Chandler, D. S. (2019). RNA splicing and disease: animal models to therapies. *Trends in Genetics, 35*(1), 68-87.

Qiu, J., Zhou, B., Thol, F., Zhou, Y., Chen, L., Shao, C., . . . Heuser, M. (2016). Distinct splicing signatures affect converged pathways in myelodysplastic syndrome patients carrying mutations in different splicing regulators. *Rna, 22*(10), 1535-1549. doi:10.1261/rna.056101.116

Sakharkar, M. K., Chow, V. T., & Kangueane, P. (2004). Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol, 4*(4), 387-393.

Schmidt, C., Grønborg, M., Deckert, J., Bessonov, S., Conrad, T., Lührmann, R., & Urlaub, H. (2014). Mass spectrometry–based relative quantification of proteins in precatalytic and catalytically active spliceosomes by metabolic labeling (SILAC), chemical labeling (iTRAQ), and label-free spectral count. *Rna, 20*(3), 406-420.

Sterne-Weiler, T., & Sanford, J. R. (2014). Exon identity crisis: disease-causing mutations that disrupt the splicing code. *Genome Biol, 15*(1), 201. doi:10.1186/gb4150

Sun, J.-S., & Manley, J. L. (1995). A novel U2-U6 snRNA structure is necessary for mammalian mRNA splicing. *Genes & development, 9*(7), 843-854.

Tang, Z., Zhao, J., Pearson, Z. J., Boskovic, Z. V., & Wang, J. (2021). RNA-targeting splicing modifiers: Drug development and screening assays. *Molecules, 26*(8), 2263.

Tuffery-Giraud, S., Béroud, C., Leturcq, F., Yaou, R. B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., . . . Claustres, M. (2009). Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat, 30*(6), 934-945. doi:10.1002/humu.20976

Turunen, J. J., Niemelä, E. H., Verma, B., & Frilander, M. J. (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip Rev RNA, 4*(1), 61-76. doi:10.1002/wrna.1141

van den Hoogenhof, M. M., Pinto, Y. M., & Creemers, E. E. (2016). RNA splicing: regulation and dysregulation in the heart. *Circulation research, 118*(3), 454-468.

Wahl, M. C., Will, C. L., & Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell, 136*(4), 701-718. doi:10.1016/j.cell.2009.02.009

Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtukova, I., Zhang, L., Mayr, C., . . . Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature, 456*(7221), 470-476.

Yip, B. H., Dolatshad, H., Roy, S., Pellagatti, A., & Boultwood, J. (2016). Impact of Splicing Factor Mutations on Pre-mRNA Splicing in the Myelodysplastic Syndromes. *Curr Pharm Des, 22*(16), 2333-2344. doi:10.2174/1381612822666160226132112

BÖLÜM 3

YENİ BİR HÜCRE ÖLÜM YOLAĞI: FERROPTOZİS

Prof. Dr. Ayşegül ÇEBİ[1]

[1] Giresun Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Ebelik Bölümü Giresun, Türkiye. aysegul.cebi@giresun.edu.tr, Orcid ID: 0000-0003-3804-7966

GİRİŞ

On yıl önce keşfedilen bir hücre ölüm şekli olan ferroptozis, apoptozis ve otofajiden farklı olarak demir bağımlıdır (Dixon, 2017). Ferroptozisde mitokondriyal krista azalmış ya da tamamen ortadan kalkmış olabildiği gibi, dış mitokondriyal zarda yırtıklar bulunur ve sitolojik değişiklikler meydana gelir. Kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimlerin oluşumu ve hücre iskeletinin parçalanması gibi apoptozisin özellikleri ferroptozisde bulunmamaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS) ile membranda meydana gelen lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres oluşumunun etkisiyle plazma zarının seçici geçirgenliğinin azalması hücre anormalliklerine yol açmaktadır (Yu ve ark., 2017; Cao ve ark., 2016; Xie ve ark., 2016). Tablo 1 de hücre ölüm yolaklarından ferroptozis, apoptozis ve otofaji arasındaki farklılıklar morfolojik değişiklikler, biyokimyasal özellikler ve metabolik yolaklar bakımından açıklanmıştır.

Tablo 1. Ferroptozis, apoptozis ve otofaji arasındaki farklılıklar

	Morfolojik özellikler	**Biyokimyasal özellikler**	**Yolakları**
Ferroptozis	-Artmış mitokondriyal membran yoğunluğu ile mitokondrinin küçülmesi, -Dış mitokondrial memnranın bozulması -mitokondri kristalarının küçülmesi	-Demir birikimi ve lipid peroksidasyonu	-Xc/GPX4 -Sülfür transfer yolağı P53/SLC7A11 -P53-SAT1-ALOX15 yolağı
Apoptozis	-Hücre ve çekirdek hacminde azalma -Kromatin aglütinasyonu -Apoptotik cisimlerin oluşumu -Hücre iskeletinin dağılması	-DNA fragmentasyonu	-Ölüm reseptör yolağı -Mitokondri yolağı -Kaspaz, P53 ve Bcl2 aracılı sinyal yolağı
Otofaji	-Çift membran otolizozom oluşumu -Makrootofaji -Mikrootofaji -Şaperon aracılı otofaji	-Lizozomal aktivitenin artması	-mTOR -Beclin1 -P53 sinyal yolağı

DEMİR METABOLİZMASI İLE İLİŞKİSİ

Demir, hemoglobinde oksijen taşınması, sitrik asit döngüsü ve elektron taşıma sistemindeki çoğu protein için bir kofaktör olarak görev yaparak ATP üretimi için katkıda bulunması gibi vücutta pek çok önemli biyolojik sürece katkıda bulunan bir metaldir. Hücrelerin demir tutulumu bu nedenle önemlidir. Demir redoks aktif olması nedeniyle ROS üretebilir. Demir elementi metabolizmada faaliyet gösteren vücutta fizyolojik süreçleri etkileyen önemli bir metaldir. Demirin bağırsaklardaki emilimi ya da eritrosit yıkımı yoluyla meydana gelen Fe^{+2} seruloplazmin tarafından Fe^{+3}'e oksitlenir. Hücre membranı üzerinde bulunan transferrine (TF) bağlanarak TF- Fe^{+3} kompleksi oluşturur. TF reseptörü 1 (TFR1) de TF- Fe^{+3} kompleksinin endositoza girmesini sağlar.

Ferroptozis, çoklu doymamış yağ asitlerinin demir katalizli peroksidasyonu ile tetiklenen apoptotik olmayan bir hücre ölümü şeklidir (Dixon ve ark., 2012). Sıçan sarkom onkogeni (RAS) ile mutasyona uğramış hücrelerde, erastin kaynaklı hücre ölümünün apoptozdan farklı olduğunu, ancak azalmış krista ile tahrip olmuş küçük mitokondri, yoğun bir zar ve yırtılmış bir dış zar dâhil olmak üzere tipik bir nekrotik morfolojiye sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu işlem sırasında hücreler, yüksek hücre içi demir konsantrasyonu ve lipit ROS ile karakterize edilir. Ferroptozisin, demir, lipit ve amino asitlerin metabolik dengesi, redoks ve mitokondri işleyişi de dahil olmak üzere çeşitli süreçler tarafından düzenlendiği yapılan araştırmalarda ortaya konulmuştur (Jiang ve ark., 2021). Hücrede ROS üretmek için Fenton reaksiyonunu başlatmak ve ardından hücre zarlarında çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu teşvik etmek için yeterli miktarda demir gerekmektedir (Dixon ve Stockwell, 2014). Açil-CoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (ACSL4), lizofosfatidilkolin asiltransferaz 3 (LPCAT3) ve LOX ailesi enzimleri çoklu doymamış yağ asitlerinin sentezini ve oksidasyonunu kontrol eden başlıca enzimlerdir (Dixon ve ark., 2015; Doll ve ark., 2017; Kagan ve ark., 2017). Bu enzimlerin anormal ekspresyonu ferroptozisi bozar.

GPX4 ENZİMİ VE FERROPTOZİS

Glutatyon peroksidaz ailesinin bir üyesi olan glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) antioksidan bir enzimdir. İnsanlarda GPX4 geni tarafından kodlanan bu enzim, hücreleri membrandaki lipit peroksidasyonuna karşı koruyan bir

fosfolipid hidroksiperoksidazdır. Başlıca görevi lipit peroksitlerinin oluşumunu engellemek olan GPX4'ün ferroptozis oluşumunda önemli rolü vardır. İndirgenmiş glutatyonu (GSH) okside glutatyona (GSSG) dönüştürürken sitotoksik olan lipid peroksitleri alkollere indirger. GPX4 aktivitesindeki inhibisyon ferroptozisin belirteci olduğu düşünülen lipit peroksitlerin birikmesine yol açar. Yapılan bir çalışmada GPX4 ekspresyonu azaltılmış hücrelerin ferroptozise daha duyarlı olduğu, aksine GPX4 ekspresyonu artırılmış hücrelerin ferroptizisi inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ferroptozisi teşvik eden RSL3 direk olarak GPX4 enzimine etki eder ve aktivitesini inhibe eder. Bu şekilde çalışarak hücrelerin antioksidan kapasitesini azaltarak ROS birikimine yol açar ve ferroptozise neden olur. Bununla birlikte DPI7 ve DPI10 bileşikleri doğrudan GPX4'e etki ederek ferroptozisi teşvik eder. Selenosistein de bilindiği üzere GPX enzimlerinin aktif bir amino asiti olarak bilinmektedir. Selenosisteinin GPX4'e eklenmesinde mevalonat yolu rol almaktadır. Selenosistein tRNA'nın olgunlaşmasını düzenleyerek GPX4'ün sentezinde etkili olabilir. Bu nedenle ferroptozis oluşumunun düzenlenmesi ile de ilgilidir. Bu yolakta IPP ve CoQ10 önemli iki ürün olarak bilinmektedir. Bu yolağın inhibisyonu GPX4 aktivitesini azaltacağı için ferroptozisin de indüklenmesini sağlar (Kryukov ve ark., 2003; Yang ve ark., 2014).

Mitokondriyal voltaj bağımlı anyon kanalları iyonları ve metabolitleri taşıyan transmembran kanallardır. Bu kanallar ferroptozda da önemli bir düzeleyicidir. Erastinin voltaj bağımlı anyon kanalları üzerinde etkili olarak mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açtığı ve yüksek oksit oluşumuna neden olarak demir aracılı hücre ölümüne neden olduğu belirlenmiştir (Yagoda ve ark., 2007)

P53-ARACILI FERROPTOZİS

P53 geni bilindiği üzere önemli bir tümör baskılayıcı gendir. P53 aracılı olan hücre döngüsü inhibisyonu doğal bir süreç olan yaşlanmada önemli bir role sahiptir. Bunun yanında, kanser oluşumu ve apoptozis oluşumunda da önemli bir payı olduğu kabul edilmiştir. Fakat ferroptozisde nasıl bir göreve sahip olduğu henüz netliğe kavuşmamıştır. Yapılan bir çalışmada asetilasyon eksik p53 mutantlarının ferroptozisi teşvik ettiği gösterilmiştir. Ayrıca P53 aktivasyonunun hücrelerin antioksidan kapasitesini azalttığı da belirtilmiştir. Bu şekilde p53 ferroptozisi tetiklemektedir. P53 SLC7A11 ekspresyonunu

aşağı regüle ederek GPX4'ün aktivitesini etkileyerek ferroptozisin azalmasına neden olur. Bu da sistin sistem Xc- alımını engelleyebilmektedir. Ayrıca, P53-SAT1-ALOX15 yolağı, ferroptozisin düzenlenmesinde görev alır. SAT1 P53'ün transkripsiyonel bir hedefi olmakla birlikte poliamin katabolizması için önemli bir hız sınırlayıcı enzimdir. SAT1'in aktivasyonu ile araşidonat lipoksijenaz 15'in (ALOX-15) ekspresyon seviyesi yakından ilişkilidir. Bu mekanizma da ROS tarafından indüklenen lipit peroksidasyonunu ve ferroptozisi teşvik eder (Ou ve ark., 2016). Yapılan araştırmalar P53-P21 ekseninin kanser hücrelerinde ferroptozis oluşumunu negatif yönde düzenleyebileceğini göstermiştir. P53 ekspresyonunun kolorektal kanser hücrelerinde ferroptozisin inhibisyonunda rol oynadığı da gösterildi (Xie ve ark., 2017). Bu nedenle, P53 ferroptozisi iki taraflı bir yolakla düzenleyebilir. Bu konuda çok daha ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

FERROPTOZİSİN KANSERLE İLİŞKİSİ

Pankreatik duktal adenokarsinom hücre hatlarında yapılan bir çalışmada artesunatın ROS üretimini teşvik ettiği ve ferroptozisi bu yolla aktifleştirdiği gösterilmiştir. Bununla birlikte kotilenin A (CN-A) ve feniletil izotiyosiyanat kombinasyonunun ROS üretimini artırdığı, böylece ferroptozisi aktifleştirdiği ve sitotoksisiteye yol açtığı rapor edilmiştir. Pankreas kanseri hücre hatlarında ferroptozisi bu şekilde ROS üretimi aracılı olarak aktifleştiren ve proliferasyonu inhibe eden çalışmalar bulunmaktadır (Eling ve ark., 2015).

Hepatoselüler karsinomada yaygın olarak kullanılan sorafenib ilacının biyolojik etkisi hücrelerin ferroptozisinin indüklenmesi ile ilişkilidir. Ayrıca, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)-dokozaheksaenoik asit (DHA) nanopartiküllerinin insan hepatoselüler karsinom hücrelerini seçici olarak öldürebildiği belirlenmiştir. LDL-DHA nanopartikül uygulaması yapılan insan hepatoselüler karsinom hücrelerinde lipid peroksidasyonunun arttığı, GSH seviyesinin düştüğü ve GPX4 inhibisyonunun gerçekleştiği dolaylı olarak bunun ferroptozise sebep olduğu belirtilmiştir (Ou ve ark., 2017). Hepatositlerde yüksek miktarda ifade edilen proteinlerden olan Sigma 1 (S1R) reseptörünün inhibisyonu hapatoselüler karsinom hücrelerinde ferroptizisi teşvik eder. Metallotiyonein 1-G (MT1G) , P53 ve nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör (NRF2) ferrotozisin negatif düzenleyicileri hepatoselüler karsinom hücrelerinde yer almaktadır. MT1G ferroptozisi engelleyerek

sorafenib direncinin gelişimini destekler, GSH inhibisyonuna ve lipit peroksidasyonunun artmasına yol açar (Nie ve ark., 2018).

Kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında en başta yer alan meme kanseri türleri içerisinde üçlü negatif meme kanseri, tüm meme kanser türlerinin yaklaşık %15-18'ini kapsamaktadır. Üçlü negatif meme kanseri kemoterapiye dayanıklı ve kötü prognoza sahiptir. Bu meme kanseri tipinde sistin önemli amino asitler arasındadır. Sistem Xc- aktivitesinin engellenmesi sistin alımını azaltarak ferroptozise yol açar Chen ve ark., 2017).

P53 kolorektal kanser hücrelerinde dipeptidil peptidaz-4 (DPP4)'ün aktivitesini bloke ederek erastin kaynaklı ferroptozisi inhibe eder. Kolorektal kanser hücrelerinde P53 kaybı, DPP4'ün çekirdekteki birikimini bloke ederek plazma membranına bağlı lipit peroksidasyonuna yol açarak ferroptozisin gerçekleşmesini sağlar. Sisplatin ilacının CRC hücrelerinde ferroptozis ve apoptozisi teşvik ettiği ve GSH delesyonu ve GPX aktivasyonuna yol açtığı belirlenmiştir (Xie ve ark., 2017).

KAYNAKÇA

Chen, M. S., Wang, S. F., Hsu, C. Y., Yin, P. H., Yeh, T. S., Lee, H. C., & Tseng, L. M. (2017). CHAC1 degradation of glutathione enhances cystine-starvation-induced necroptosis and ferroptosis in human triple negative breast cancer cells via the GCN2-eIF2α-ATF4 pathway. *Oncotarget*, *8*(70), 114588–114602.

Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., 3rd, & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, *149*(5), 1060–1072.

Dixon, S. J., & Stockwell, B. R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature chemical biology*, *10*(1), 9–17.

Dixon, S. J., Winter, G. E., Musavi, L. S., Lee, E. D., Snijder, B., Rebsamen, M., Superti-Furga, G., & Stockwell, B. R. (2015). Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. *ACS chemical biology*, *10*(7), 1604–1609.

Doll, S., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Panzilius, E., Kobayashi, S., Ingold, I., Irmler, M., Beckers, J., Aichler, M., Walch, A., Prokisch, H., Trümbach, D., Mao, G., Qu, F., Bayir, H., Füllekrug, J., Scheel, C. H., Wurst, W., Schick, J. A., Kagan, V. E., … Conrad, M. (2017). ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature chemical biology*, *13*(1), 91–98.

Eling, N., Reuter, L., Hazin, J., Hamacher-Brady, A., & Brady, N. R. (2015). Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Oncoscience*, *2*(5), 517–532.

Jiang, X., Stockwell, B. R., & Conrad, M. (2021). Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *22*(4), 266–282.

Kagan, V. E., Mao, G., Qu, F., Angeli, J. P., Doll, S., Croix, C. S., Dar, H. H., Liu, B., Tyurin, V. A., Ritov, V. B., Kapralov, A. A., Amoscato, A. A., Jiang, J., Anthonymuthu, T., Mohammadyani, D., Yang, Q., Proneth, B., Klein-Seetharaman, J., Watkins, S., Bahar, I., … Bayır, H. (2017). Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nature chemical biology*, *13*(1), 81–90.

Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigó, R., & Gladyshev, V. N. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science (New York, N.Y.)*, *300*(5624), 1439–1443.

Nie, J., Lin, B., Zhou, M., Wu, L., & Zheng, T. (2018). Role of ferroptosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, *144*(12), 2329–2337.

Ou, Y., Wang, S. J., Li, D., Chu, B., & Gu, W. (2016). Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(44), E6806–E6812.

Ou, W., Mulik, R. S., Anwar, A., McDonald, J. G., He, X., & Corbin, I. R. (2017). Low-density lipoprotein docosahexaenoic acid nanoparticles induce ferroptotic cell death in hepatocellular carcinoma. *Free radical biology & medicine*, *112*, 597–607.

BÖLÜM 4

LOKAL KANSER TEDAVİSİ İÇİN NANOFİBER İMPLANTLARIN KULLANIMI

Dr. Öğr. Üyesi Funda DEMİRTAŞ KORKMAZ[1]
Arş. Gör. Y. Emre BÜLBÜL[2]

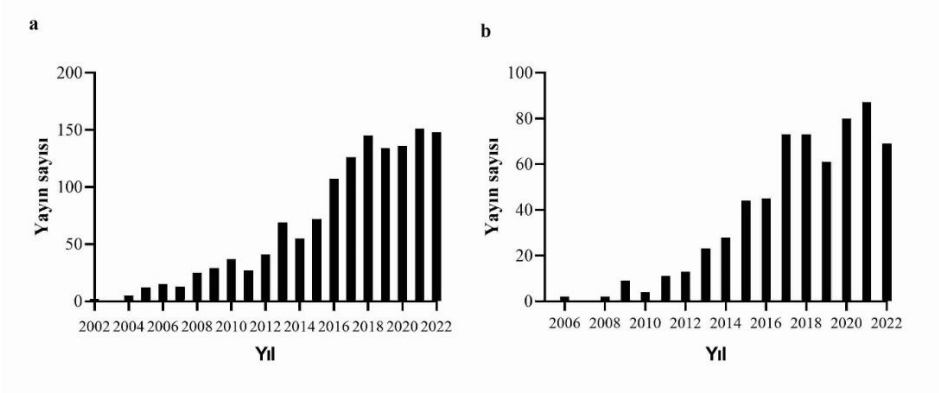
[1] Giresun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Giresun, Türkiye. fundakorkmz@gmail.com, Orcid ID: 0000-0003-3978-9427
[2] Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Fizikokimya Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye. emrbulbul@gmail.com, Orcid ID: 0000-0003-1885-5026

GİRİŞ

Onkolojik hastalıklar dünya çapında ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Global kanser istatistiklerine göre 2020 yılında 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 9,9 milyon kanser kaynaklı ölüm meydana geldiği rapor edilmiştir (Sung et al., 2021). Kanserin teşhisi, önlenmesi ve tedavisine yönelik son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, kanser için yüksek ölüm oranı bir sorun olmaya devam etmektedir. Solid tümörlerin tedavisinde baskın tedavi, tümörün cerrahi olarak çıkarılması ve ardından kemoterapi ve/veya radyoterapi uygulamalarıdır. Bununla birlikte, çoğu vakada birincil hastalıktan önemli ölçüde daha yüksek ölüm riski ile birlikte, kanserin nüksetmesi sıklıkla meydana gelir. Bu nedenle, tedavi etkinliğini ve hasta yaşam kalitesini iyileştirmek için daha etkili ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Nanoteknoloji biyomedikal alanda, kontrol edilebilir fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri ile istenilen özelliklerde malzeme eldesini sağladığından son zamanlarda büyük ilgi kazanmıştır (Şekil 1a). Nanomalzemeler yüksek bir yüzey-hacim oranına sahiptir, bu nedenle hedefe yönelik ilaç salımı için sıklıkla tercih edilir (Chen et al., 2018). Araştırmacılar nanoçubuk (Pearce et al., 2007), nanoplaka (Mishra et al., 2014) nanojel (Asadian-Birjand et al., 2012; Rejinold et al., 2012), nanopartikül (Chomoucka et al., 2010), nanoemülsiyon (Jaiswal et al., 2015) ve nanofiber (Jayakumar et al., 2010) gibi çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmiş, bunların etkinliğini *in vitro* ve *in vivo* test etmektedirler.

Nanofiberler (NF), üretim proseslerinin kolay olması, basit üretimleri, kendilerine özgü ayırt edici özellikleri, yeniden üretim kolaylıkları nedeniyle son yirmi yılda büyük ilgi görmüştür. Doku mühendisliği, yapı doku iskeleleri, ilaç taşıyıcı sistem, implantlar, yara materyali, biyosensör, vitaminler gibi çeşitli uygulamalar için preklinik ve klinik düzeyde araştırılmaya devam edilmektedir (Patel et al., 2022). Kanser tedavisine yönelik NF malzemelerin kullanımı ise son zamanlarda artan bir ilgi kazanmıştır (Şekil 1b).



Şekil 1. a) Biyomedikal alanda nanofiberlerle ilgili güncel yayın sayısı b) "nanofiber" ve "kanser" ana başlığı ile nanofiberlerle ilgili güncel yayın sayısı, Web of Science veri tabanı

Tümör hücreleri ameliyat sırasında çıkarıldıktan sonra tekrarlama potansiyellerini korudukları için kemoterapi kullanımı zorunlu hale gelmektedir. Tümörlerin tedavisi ve/veya tümör nüksetmesinin önlenmesi için lokal ilaç verme sistemleri olarak ilaç yüklü nanofiber (NF) malzemeler geliştirilmektedir. Cerrahi sonrası lokal olarak yerleştirilen NF implantlar antineoplastik ilacı cerrahi bölgede uygun konsantrasyonunda tutarken, toksik etkiler de azaltılmış olur. Bu nedenle, antikanser ilaçlarla yüklü nanofiberler, ilacı bölgesel olarak sürekli bir şekilde iletmek üzere tasarlanır ve bu da onları solid tümör hücrelerine implantasyon için ideal bir aday haline getirir (Poláková et al., 2019). Lokal uygulanmış ilaç yüklü NF'ler ameliyatı takiben kanserin lokal nüksetme riskini azaltmakla birlikte doğrudan tümör bölgesine yönlendirilerek etkin tedavi sağlayabilir (Weinberg et al., 2008).

Klinikte antineoplastik ajanın lokal olarak verildiği ilk implant olan Gliadel® plaka, beyin tümörlerinin tedavisi için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan tek implante edilebilir malzemedir. Gliadel®, biyobozunur bir 1,3-bis(p-karboksifenoksi) propan kopolimerinden ve karmustin yüklü sebasik asitten oluşur ve tümör rezeksiyon boşluğuna yerleştirilmesinden 2-3 hafta sonra bile yavaş karmustin salımı sağlar. İstenmeyen sistemik toksisite, ilacın kan beyin bariyeri boyunca nüfuz etmesine gerek kalmadan etkili bir şekilde bastırılır. Bununla birlikte, bu tartışılmaz avantajlara rağmen, Gliadel® gofret ile tedavi olan hastalar,

herhangi bir tedavi uygulanmayanlara göre yalnızca ortalama 2 ay daha uzun süre hayatta kalmıştır (Westphal et al., 2003).

Lokal ilaç verme sistemleri olarak, elektrospinlenmiş mikro/nanofiberler son derece umut verici malzemelerdir. Lokal antikanser ilaç uygulaması için nanofiberlerle ilgili araştırma makalelerinin çoğu, *in vitro* ilaç salım profillerine veya bunların kanser hücre kültürleri üzerinde test edilen *in vitro* toksisitesine yer vermektedir. Bununla birlikte, canlı bir organizmaya uygulandığında bu tür farmakolojik olarak aktif malzemelerin davranışı, *in vitro* model deneylerinden önemli ölçüde farklı olabilir. Bu kitap bölümü nanofiber implantların lokal kanser tedavisi için *in vivo* kanser modellerindeki etkinliği üzerine gerçekleştirilen çalışmalara değinmektedir.

ELEKTROSPİNNİNG YÖNTEMİ İLE NANOFİBER TEMELLİ BİYOMALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ

Nanofiberler, kontrol edilebilir morfoloji, kimyasal ve termal kararlılık gibi üstün fizikokimyasal özellikleri ve manipüle edilebilir yapıları sayesinde çok çeşitli araştırma alanları olan ve ticari uygulamalarda da yer bulan tek boyutlu nanomalzemelerdir. Elektrospinning (elektroeğirme), nanofiber malzemelerin üretimi için en yaygın kullanılan tekniktir. Nanofiberlerin üretimi için diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, elektrospinleme, polimerik nanofiberler üretmek için kolay bir prosese sahip olması, büyük ölçekli üretime uygun olması, proses ve çözelti parametrelerinin değiştirilmesi ile nanometre-mikrometre çapları arasında istenilen özelliklerde nanofiber malzemeler üretmenin mümkün olması gibi avantajlara sahiptir (Bhardwaj ve Kundu, 2010; J. Ding vd., 2019; Ramakrishna vd., 2012; Wang vd., 2019). Birbirine bağlı gözenekli ağsı yapısı ile yüksek gözeneklilik, yüksek yüzey alanı/hacim oranı gibi özelliklere sahip olması ile farklı doğal ve sentetik polimerler kullanılarak istenilen özelliklerde biyomalzemeler geliştirmeyi mümkün kılmaktadır. Ayrıca, fiber yüzeyinin kimyasal ve fiziksel özelliklerini ayarlamak için yüzey fonksiyonelleştirilmesine uygun yapısı ile belirli özelliklerde nanofiber biyomalzemeler elde etmek için elverişlidir (Bhattarai vd., 2019; Sill ve von Recum, 2008).

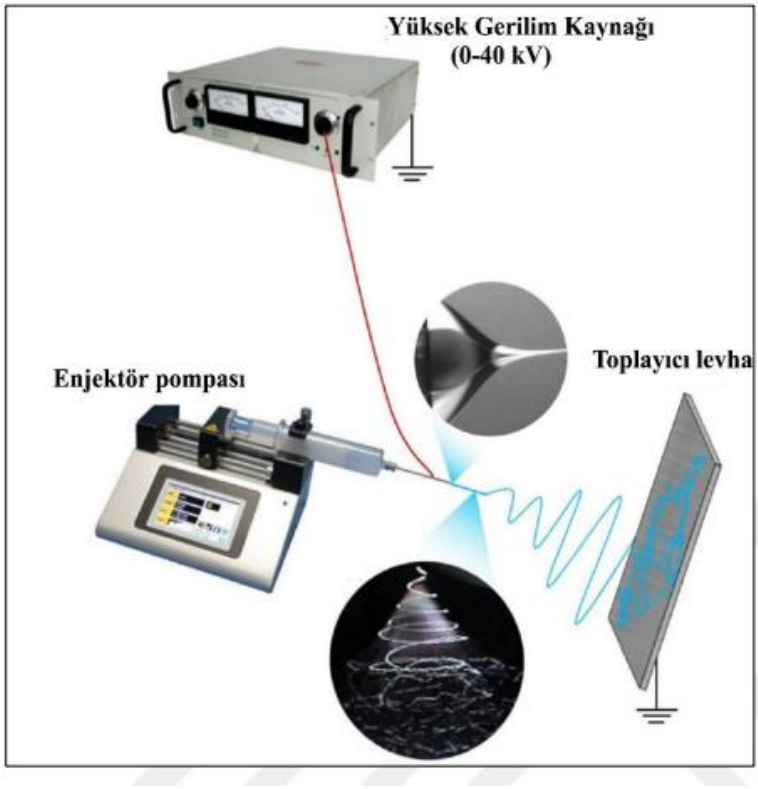
Prensip olarak iki tür kurulum kullanılmaktadır:

i) fiberin tek veya çoklu jette oluşturulduğu iğneli elektrospinning ve

ii) fiberlerin yüksek yoğunlukta bir elektrostatik alan uygulanması ile polimer çözeltisinin yüzeyinden çıktığı iğnesiz elektrospinning (Jirsak vd., 2006; Lukáš vd., 2009).

İğneli elektrospinleme, proses parametreleri optimizasyonunun kolaylığı sayesinde nanofiber malzemelerin yapısal özellikleri üzerinde kontrol edilebilirlik açısından oldukça avanttajlıdır (Jacobs vd., 2010).

Elektrospinning yöntemi, yüklü polimer çözeltisi veya polimer eriyiğinin elektrostatik olarak tetiklenmesi ile oluşan polimer jetlerinin bir toplaıcıda biriktirilmesi sonucunda fibröz yapıların elde edilmesini sağlamaktadır. Elektrospinning sisteminin şematik bir gösterimi Şekil 2'de gösterilmektedir.



Şekil 2. Elektrospinning tekniğinin şematik gösterimi (Bülbül, 2019).

Kısaca, optimize edilmiş bir elektrik potansiyeli uygulandıktan sonra, iğnenin ucundaki polimer çözeltisi damlası elektriklenir. Böylece damlanın yüzeyinde yük birikmesine neden olur ve Taylor konisi olarak bilinen bir koni

şeklinde deforme olması ile fiber jetleri oluşarak toplayıcı plakaya doğru hareket eder (Ramakrishna vd., 2012).

Bu deformasyona genellikle iki elektrostatik kuvvet neden olmaktadır:

(1) polimer damlasının yüzey yükleri arasındaki elektrostatik itme ve
(2) uygulanan güçlü dış elektrik alan tarafından uygulanan Kolomb kuvveti.

Uygulanan elektrik alan kritik bir değeri (eşik) geçtiğinde, elektrostatik kuvvet polimer damlasının viskoelastik kuvvetini ve yüzey gerilimini aşma eğilimindedir; böylece, ince, yüklü bir polimer jeti Taylor konisinin ucundan çıkmaya zorlanmaktadır. Polimer jet daha sonra çözücü moleküllerinin hızlı buharlaşmasıyla birlikte karşı elektroda (toplayıcı plaka) doğru hareket etmektedir. Bu hareket sırasında, jetteki farklı polimerik iplikçikler, ince ve kuru fiberlerin ortaya çıkmasına neden olan "yayılma" adı verilen bir fenomen olan karşılıklı itme nedeniyle ayrılmaktadır. Bu fiberler, topraklanmış bir metalik hedef (toplayıcı plaka) üzerinde toplanarak birkaç mikrometre ile nanometre aralığında çapa sahip nanofiber malzemeleri oluşturmaktadır (Haider vd., 2018; Islam vd., 2019; Ramakrishna vd., 2012).

Çözeltideki polimer konsantrasyonu, çözeltinin viskozitesi ve iletkenliği, elektrostatik alan, iğne ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe veya sıcaklık gibi proses parametrelerinin kontrolü ile çeşitli polimerlerden istenilen yapıda nanofiberleri hazırlamak mümkün olmaktadır (Yan vd., 2021). Doğal, sentetik veya ikisinin kompoziti kullanılarak nanofiber temelli biyomalzemelerin üretilmesinde birçok biyolojik olarak parçalanabilen polimer vardır. Biyobozunur polimerler, hedefe/ ihtiyaca göre farklı işlevlere sahip nanofiberler geliştirmek için kullanılmaktadır. Örneğin, ilaç/ ilaç etken madde iletimi, hücre taşıyıcısı ve kısa süreli doku iskeleleri (yeni doku olgunlaşıp bağımsız hale gelene kadar) gibi geçici işlevleri yerine getirmek için kullanılmaktadır. Bazı polimerler, cerrahide implant gibi uzun süreli amaçlar için de kullanılmıştır (Eatemadi vd., 2016; Ekrami vd., 2022; Garkal vd., 2021).

En yaygın kullanılan ve üzerinde çalışılan sentetik polimerlere polikaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), poli (L-D-laktik asit) (PLDLA), polilaktik glikolik asit (PLGA) ve polikaprolakton- polietilen glikol (PCL-PEG), polikaprolakton- poli (L-laktik asit) (PCL-PLLA) gibi kopolimerleri örnek verilebilir. Diğer yandan, elastin, kollajen, ipek proteini, tropoelastin,

elastin-mimetik peptit, fibrin, fibrinojen, oksitlenmiş selüloz ve hyaluronik asit gibi doğal polimerler de nanofiber temelli biyomalzeme üretmek için kullanılmaktadır (Eatemadi vd., 2016; Jagtiani ve Sabnis, 2022). Nanofiberlerin başlıca biyomedikal uygulamalarından bazıları biyosensörler, kontakt lensler, ilaç taşıyıcı sistemler ve implantları içermektedir (Khodadadi vd., 2020). Başarılı uygulamalar elde etmek için, hedef hücre ve/veya dokuya özel olarak yüksek gerilme mukavemeti, elastik modül, bozunma hızı, toksisite, biyouyumluluk gibi bazı özellikleri dikkate almak önemlidir.

LOKAL KANSER TEDAVİSİ İÇİN NANOFİBERLERLE GERÇEKLEŞTİRİLEN *IN VIVO* ÇALIŞMALAR

Polimer kimyasındaki ve elektrospinning teknolojisindeki ilerlemeler, kanser araştırması ve tedavisi için çok işlevli yapılar olarak nanofiberlerin üretimini mümkün kılmıştır. Polimerik nanofiber matrisler, doğal tümör mikroçevresine benzerlik oluşturacak şekilde tasarlanabilir. Bu sistemler, kanser araştırması ve preklinik kanser tedavisi taraması için tekrarlanabilir modeller olarak hizmet edebilir (Erickson et al., 2022). Elektrospinning işlemi sırasında ilacın doğrudan dahil edilebilmesi, yüksek yüzey alanı/hacim oranı, gözenekli mimari ve ayarlanabilir malzeme özellikleri sayesinde, NF'ler sürekli ilaç salımı için kontrol edilebilir taşıyıcı dağıtım platformlar olarak işlev görebilir (Jagtiani & Sabnis, 2022). Elektrospinning yöntemi ile elde edilmiş ilaç yüklü çeşitli NF implantların kanser tedavisindeki etkinliğini ve güvenliğini incelemek için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Kanser tedavisine yönelik nanofiber temelli ilaç taşıyıcı sistemler için *in vivo* deneylere ilişkin ayrıntılı sonuçlar.

<table>
<tr><th>Biyopolimer</th><th>İlaç ve//veya terapötik katkı maddesi</th><th>Kanser Türü</th><th>In vivo Test</th><th>Uygulama Yöntemi</th><th>Sonuç</th><th>Referans</th></tr>
<tr><td>PCL- Kollojen</td><td>Piperin</td><td>Meme kanseri</td><td>Antitümör aktivite</td><td>Tümör bölgesine implantasyon</td><td>Tümör hacmi (mm^3)<table><tr><th>Grup</th><th>24. gün</th></tr><tr><td>Nanofiber</td><td>1280</td></tr><tr><td>Serbest piperin</td><td>2550</td></tr></table></td><td>(Babadi vd., 2022)</td></tr>
<tr><td>Polivinilalkol/k-carrageenan/pegylated-Poliüretan</td><td>Paclitaxel (PTX)
Camptothecin (CMPT)
Au</td><td>Akciğer kanseri</td><td>In vivo ilaç salımı ve antitumor aktivite</td><td>Tümör üzerine lokal uygulama</td><td>In vivo salım çalışmaları:
Çekirdek-kabuk yapılı nanofiber için CMPT ve PTX'in kan konsantrasyonunun en yüksek değerlerinin sırasıla 26,8 ± 0,04 μg mL^{-1} ve 26,5 ± 0,05 μg mL^{-1}'e 36 saatte ve 24 saatte ulaştığını göstermiştir.
İn vivo antitümör aktivite:
Au, CMPT ve PTX antikanser ilaçlarının, PVA/κ karagenan/CMPT/Au/PEG PU/PTX çekirdek-kabuk nanofiberlerin uygulandığı grupta fare ağırlığında değişiklik olmaksızın tümör hacminin azaltılmıştır.</td><td>(Irani ve Nodeh, 2022)</td></tr>
<tr><td>PCL</td><td>Molibden oksit</td><td>Cilt kanseri</td><td>Antitümör aktivite</td><td>Zebra balıkları üzerine</td><td>Zebra balıklarında yapılan in-vivo denemelerin, 14 günde kanser ilerlemesini %30'dan fazla azalttığı bulunmuştur.</td><td>(Janani vd., 2018)</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>ekzodermal yama</td><td></td><td></td></tr>
<tr><td>PCL/chitosan</td><td>Cisplatin</td><td>Rahim ağzı kanseri</td><td>Antitümör aktivite</td><td>Doğrudan tümör üzerine lokal uygulama</td><td>Tümör hacmi (mm^3)
<table><tr><td>Grup</td><td>14. gün</td><td>21. gün</td></tr><tr><td>Nanofiber</td><td>4,56</td><td>2,79</td></tr><tr><td>Serbest Cisplatin</td><td>5,16</td><td>4,75</td></tr></table></td><td>(Aggarwal vd., 2017)</td></tr>
<tr><td>PLGA/PLA/PCL</td><td>Temozolomide (TMZ)</td><td>Glioblastoma multiforme</td><td>In vivo biyodağılım ve antitümör aktivite</td><td>Beyin dokusu üzerine lokal uygulama</td><td>In vivo biyodağılım:
Ortotopik glioblastoma üzerine lokal uygulama sonucunda 0–30 gün serumda veya hayati organlarda saptanabilir miktarda TMZ yoktur (HPLC ile test edilmiştir), TMZ yalnızca tümör kütlesinde ve beyin dokusunda bulunmuştur.
Antitümör aktivite:
Hayvanların %86'sı, 90 gün sonra hiçbir tümör yenileme belirtisi göstermemiştir (tedavi edilmemiş grup için medyan hayatta kalma oranı 24 gün)</td><td>(Ramachandran vd., 2017)</td></tr>
</table>

PLGA (50:50) ve PLGA (75:25)	Carmustine İrinotecan Cisplatin Combretastatin	Glioblastoma multiforme	*In vivo* biyodağılım ve antitümör aktivite	Beyin dokusu üzerine lokal uygulama	**Biyodağılım:** 56. günde beyin/kan ilaç konsantrasyon oranı: karmustin – 44.88 irinotekan – 77.03 sisplatin – 20.89 kombretastatin – 39.12 **Antitümör aktivite:** Ortotopik glioblastoma üzerine lokal uygulama sonucunda medyan hayatta kalma oranı 87 gün (tedavi edilmemiş kontrol grubu 23 gün)	(Tseng vd., 2016)
PDLLA	Docetaxel (DTX)	Meme kanseri	*In vivo* biyodağılım ve antitümör aktivite	Deri altı göğüs dokusu üzerine lokal uygulama	***In vivo* biyodağılım**: 1. gündeki ilaç konsantrasyonu: 3238 ng/g (nanofiber) 122 ng/g (DTX i.v.) **Antitümör aktivite:** Tümör rezeksiyon alanında 30. günde tümör yenilemesi olmadan sağkalım: %83 (nanofiber) %22 (DTX lokal enjeksiyon) %25 (DTX i.v.) %0 (kontrol grubu)	(Q. Ding vd., 2016)

<table>
<tr>
<td>PLGA (50:50)</td>
<td>Carmustine
İrinotecan
Cisplatin</td>
<td>Glioblastoma multiforme</td>
<td>In vivo biyodağılım ve antitümör aktivite</td>
<td>Beyin dokusu üzerine lokal uygulama</td>
<td>Biyodağılım: Beyin dokusundaki ilaç konsantrasyonu (µg/mL):
<table>
<tr><th>İlaç</th><th>3 gün</th><th>8 hafta</th></tr>
<tr><td>Carmustine</td><td>53,52</td><td>142,11</td></tr>
<tr><td>İrinotecan</td><td>75,95</td><td>233,84</td></tr>
<tr><td>Cisplatin</td><td>406,71</td><td>56,54</td></tr>
</table>
Antitümör aktivite:
Ortotopik glioblastoma üzerine lokal uygulama sonucunda medyan hayatta kalma oranı 60 gün (tedavi edilmemiş kontrol grubu 23 gün)</td>
<td>(Tseng vd., 2015)</td>
</tr>
<tr>
<td>Polietilenoksit/PLLA (2:1, w/w)</td>
<td>Cisplatin</td>
<td>Rahim ağzı kanseri</td>
<td>In vivo biyodağılım ve antitümör aktivite</td>
<td>Doğrudan tümör üzerine lokal uygulama</td>
<td>In vivo biyodağılım:
Cisplatin konsantrasyonu (µg/g):
<table>
<tr><th>Bölge</th><th>1 saat</th><th>12 saat</th><th>24 saat</th></tr>
<tr><td>Vajina</td><td>73,2</td><td>239</td><td>45,3</td></tr>
<tr><td>Kan</td><td>0,1</td><td>0,13</td><td>Yok</td></tr>
</table>
Antitümör aktivite:
9. günde tümör ağırlığı:
0,88 ile 1,17 g (nanofiber grupları)
2,48g (kontrol grubu)</td>
<td>(Zong vd., 2015)</td>
</tr>
</table>

PLGA (50:50)	Carmustine	Glioblastoma multiforme	*In vivo* biyodağılım	Beyin dokusu üzerine lokal uygulama	Beyin/kan ilac konsantrasyon oranı 3. ve 42. günlerde 4.21 ve 12.25.	(Tseng vd., 2013)

Malign glioblastomun tedavisi için daha etkili bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmek amacıyla, Liu ve ark. saf karmustin (Tseng et al., 2013) veya çoklu ilaç maddesi (Tseng et al., 2015a, 2016) ile yüklenmiş biyolojik olarak parçalanabilir PLGA NF membranlar hazırlamışlardır. Başarılı bir *in vitro* salım profili sergileyen materyal, Wistar farelerin doğrudan beyin dokusuna yerleştirilmiştir. *In vivo* çalışmadan elde edilen bulgulara göre ilaç kan konsantrasyonunun zamanla kademeli olarak azaldığı, beyindeki konsantrasyonun ise 6 haftadan uzun bir süre içinde kademeli olarak arttığı, ilacın beyin/kan konsantrasyonu oranının 3. ve 42. günde sırasıyla yaklaşık 4.21 ve 12.25 olduğu bulunmuştur. Histolojik incelemeler, beyin dokusunda herhangi bir enflamatuar reaksiyon göstermediğini, bu da geliştirilen sistemin normal beyin fonksiyonuna müdahale etmeyen, çok umut verici, hedefli bir ilaç verme sistemi olduğunu göstermiştir.

Liu ve ark. biyobozunur BIC/PLGA NF membranlar ile karmustin, irinotekan ve sisplatin taşıyan yeni bir sistem geliştirmiştir. İlaçların NF'den in vitro salım kinetikleri de daha önce geliştirilen sisteme benzer şekilde kontrollü gerçekleşmiştir (Tseng ve diğerleri, 2013). Daha da önemlisi, nanoliflerin 30-35 gün içinde tüm yüklü ilaçları nispeten yüksek miktarlarda salabildiği gözlenmiştir. Wistar fareleri üzerinde yapılan *in vivo* çalışmada BIC/PLGA membranları beyin dokusunun yüzeyine yerleştirildi. Tedavi edilen bölgede ilk 4 hafta boyunca yüksek sisplatin konsantrasyonlarına ulaşıldığı, sonraki 4 hafta boyunca yüksek seviyelerde irinotekan ve karmustin salındığı bulunmuştur. Ek olarak, beyin bölgesine iletilen ilaç konsantrasyonları, plazmada bulunanlardan önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Tseng et al., 2015b).

Zong ve ark. serviks kanserinin tedavisinde fibröz implantların potansiyel rolünü incelediler. U14 rahim ağzı kanseri hücreleri ile elde ettikleri *in vivo* kanser modelinde, sisplatin yüklü poli (etilen oksit)/poli(laktid) (PLA) kompozit NF implant kullandılar. Araştırmacılar intravenöz sisplatin enjeksiyonu yapılan fareler ile karşılaştırıldığında, NF implant uygulaması yapılan farelerin vajinal ve serviks bölgelerinde böbrek, karaciğer veya kandan daha fazla sisplatin birikimi olduğunu göstermişlerdir (Zong et al., 2015).

Liu ve ark. sekonder hepatik karsinoma (SHCC) tedavisinde elektrospun NF'lerin rolünü incelediler. Farelerde diyagnostik laparotomiden sonra, implant olarak doksorubisin yüklü PLA (DOX-PLA) NF'leri uyguladılar. Bulgularına

göre, SHCC'de dikkate değer bir inhibisyona ek olarak, farelerin hayatta kalma süresinin 14 günden 38 güne yükseldiğini gösterdiler (Liu et al., 2012).

Oral karsinoma nüks riskini azaltmak amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, diklofenak sodium içeren nanofiber iskeleler üretilmiş ve etkinliği ortotopik oral squamöz hücre (SCC9) karsinom hayvan modelinde araştırılmıştır. Tümör inokülasyonundan 3 hafta sonra tümör çıkarılmış, rezeksiyon bölgesine ilaç yüklü ve yüksüz naofiberler yerleştirilmiştir. Bir hayvan grubuna da suda çözünen serbest diklofenak verilmiştir. 1 hafta içinde, herhangi bir tedavi uygulanmayan kontrol grubundaki ve diklofenak uygulanan grup farelerin %75'inden fazlasında tümör nüksü meydana geldiği görülmüştür. Buna karşılık, diklofenak yüklü nanofiberler tedavi edilen farelerin sadece %10'unda saptanabilir nüks tümörler görülmüştür. 7 hafta sonra, diklofenak salan nanoliflerle tedavi edilen grupta tekrarlayan tümörleri olan farelerin sayısı (%33), test edilen diğer gruplara göre (%90'dan fazla) önemli ölçüde daha düşük olduğu belirlenmiştir. Tümör ağırlığı, diklofenak ile karşılaştırıldığında diklofenak yüklü nanofiber grubunda daha düşük saptanmıştır. Aynı zamanda, nanofiberle salınan diklofenak miktarının, tümör hücresi proliferasyonunu önemli ölçüde azaltmak için yeterli olduğu, ancak hücre apoptozunu indüklemek için yeterli olmadığı bulunmuştur (Will et al., 2016).

Akciğer kanseri hayvan modelinde altın nanopartikül, paklitaksel (PTX) ve kamptotesin (CMPT) yüklenmiş NF implantların farelerin dorsal kısmına yerleştirildiği çalışmada, altın nanopartikülleri ve ilacın sinerjistik etki göstererek, tümör büyüklüğünü kontrole göre önemli düzeyde azalttığı saptanmıştır (Irani & Nodeh, 2022).

Zhang ve ark. (2022) hem yara iyileşmesini teşvik eden, hem de nüksü önlemeye yönelik curcumin (CUR) ve selenyum nanopartiküllerinden oluşan implante edilebilir polimer bazlı bir nanofiber geliştirmiştir. Materyal *in vivo'*da tümör büyüklüğünü kontrole göre önemli ölçüde baskılayarak antitümör etkinlik göstermiştir. Ek olarak, CUR ve SeNP'lerin sinerjistik antioksidan aktivitesi nedeniyle, NF implantın, normal fibroblast hücrelerinin yapışmasını ve çoğalmasını belirgin şekilde kolaylaştırdığı ve aynı anda tümör taşıyan farelerde yara iyileşmesini hızlandırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, iki işlevli özelliklere sahip NF implantın, lokal tümör tedavisi için umut verici bir aday olduğunu göstermiştir (Zhang et al., 2022).

SONUÇ

Bu kitap bölümünde nanofibröz materyallerin üretiminin temel özelliklerini ve lokal kanser tedavisi için potansiyel bir terapötik araç olarak antikanser ilaçlar taşıyan NF materyaller ile gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalar sunulmuştur. Antikanser ilaçların sistemik uygulaması, genellikle ilk tercih edilen uygulamadır. Ancak birçok ilacın sadece küçük bir kısmı hedef bölgeye ulaşır ve kemoterapi sıklıkla yan etkilerle ilişkilendirilir. Bu nedenle, kemoterapötiklerin lokal uygulaması, özellikle solid tümörler söz konusu olduğunda faydalı olabilir. Tümör bölgesinde daha uzun süre elde edilen daha yüksek ilaç konsantrasyonu, gerekli toplam ilaç dozunu azaltacak ve sonuç olarak sistemik ilaç uygulamasına kıyasla ciddi yan etkileri baskılayacaktır. Bu olumlu özellikler, nanofiber bazlı temelli materyalleri, solid tümörlerin tedavisi için implante edilebilir ilaç taşıyıcı sistemler olarak uygun adaylar haline getirmektedir. Halihazırda elektrospinning yöntemiyle elde edilmiş nanofiberlerin klinikte yaygın olarak uygulanması ve kullanılması için bazı teknik ve sistematik zorluklar mevcuttur. Klinisyenlerin, kimyagerlerin, biyologların ve malzeme bilimcilerin ortak çabaları ile bu zorlukların üstesinden gelinerek uygun nanofiberlerin üretimi mümkün olabilecektir. Nanofiberler ile hücresel ve moleküler etkileşimlerin anlaşılması konusunda çalışmalar ilerledikçe bu araştırma alanının 3-D tümör modelleme, anti-neoplastik ilaç salımı ve kanser alanlarındaki önemli klinik ihtiyaçları uygun şekilde ele almak için pratik fırsatlar sunabilir.

KAYNAKLAR

Aggarwal, U., Goyal, A. K., Rath, G. 2017. "Development and characterization of the cisplatin loaded nanofibers for the treatment of cervical cancer". Materials Science and Engineering C, *75*.

Asadian-Birjand, M., Sousa-Herves, A., Steinhilber, D., Cuggino, J. C., Calderon, M. 2012. "Functional nanogels for biomedical applications". Current medicinal chemistry, *19*(29), 5029–5043.

Babadi, D., Dadashzadeh, S., Shahsavari, Z., Shahhosseini, S., ten Hagen, T. L. M., Haeri, A. 2022. "Piperine-loaded electrospun nanofibers, an implantable anticancer controlled delivery system for postsurgical breast cancer treatment". International Journal of Pharmaceutics, *624*, 121990.

Bhardwaj, N., Kundu, S. C. 2010. "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique". Biotechnology Advances.

Bhattarai, R. S., Bachu, R. D., Boddu, S. H. S., Bhaduri, S. 2019. "Biomedical applications of electrospun nanofibers: Drug and nanoparticle delivery". Pharmaceutics.

Bülbül, Y. E. 2019. "*Kemik doku mühendisliğine yönelik çok katmanlı karbon nanotüp katkılı poli (laktik asit) / polivinilpirolidon biyokompozit nanofiberlerin sentezlenmesi ve karakterizasyonu*". Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Chen, S., Boda, S. K., Batra, S. K., Li, X., Xie, J. 2018. "Emerging Roles of Electrospun Nanofibers in Cancer Research". Advanced Healthcare Materials, *7*(6), 1701024.

Chomoucka, J., Drbohlavova, J., Huska, D., Adam, V., Kizek, R., Hubalek, J. 2010. "Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering". Pharmacological research, *62*(2), 144–149.

Ding, J., Zhang, J., Li, J., Li, D., Xiao, C., Xiao, H., … Chen, X. 2019. "Electrospun polymer biomaterials". Progress in Polymer Science.

Ding, Q., Li, Z., Yang, Y., Guo, G., Luo, F., Chen, Z., … Shi, S. 2016. "Preparation and therapeutic application of docetaxel-loaded poly(d,l-lactide) nanofibers in preventing breast cancer recurrence". Drug Delivery, *23*(8).

Eatemadi, A., Daraee, H., Zarghami, N., Yar, H. M., Akbarzadeh, A. 2016. "Nanofiber: Synthesis and biomedical applications". Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology.

Ekrami, E., Khodabandeh Shahraky, M., Mahmoudifard, M., Mirtaleb, M. S., Shariati, P. 2022. "Biomedical applications of electrospun nanofibers in industrial world: a review". International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials.

Garkal, A., Kulkarni, D., Musale, S., Mehta, T., Giram, P. 2021. "Electrospinning

nanofiber technology: A multifaceted paradigm in biomedical applications". New Journal of Chemistry, *45*(46).

Haider, A., Haider, S., Kang, I. K. 2018. "A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology". Arabian Journal of Chemistry.

Irani, M., Nodeh, S. M. 2022. "PVA/κ-carrageenan/Au/camptothecin/pegylated-polyurethane/paclitaxel nanofibers against lung cancer treatment". RSC Advances, *12*(25), 16310–16318.

Islam, M. S., Ang, B. C., Andriyana, A., Afifi, A. M. 2019. "A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications". SN Applied Sciences.

Jacobs, V., Anandjiwala, R. D., Maaza, M. 2010. "The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers". Journal of Applied Polymer Science, *115*(5).

Jagtiani, E., Sabnis, A. S. 2022. "Recent advancements of electrospun nanofibers for cancer therapy". Polymer Bulletin. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.

Jaiswal, M., Dudhe, R., Sharma, P. K. 2015. "Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system". 3 Biotech, *5*(2), 123.

Janani, I., Lakra, R., Kiran, M. S., Korrapati, P. S. 2018. "Selectivity and sensitivity of molybdenum oxide-polycaprolactone nanofiber composites on skin cancer: Preliminary in-vitro and in-vivo implications". Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, *49*.

Jayakumar, R., Prabaharan, M., Nair, S. V., Tamura, H. 2010. "Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications". Biotechnology Advances, *28*(1), 142–150.

Jirsak, O., Kalinova, K., Stranska, D. 2006. "Nanofibre technologies and Nanospider applications". Içinde *VDI Berichte*.

Khodadadi, M., Alijani, S., Montazeri, M., Esmaeilizadeh, N., Sadeghi-Soureh, S., Pilehvar-Soltanahmadi, Y. 2020. "Recent advances in electrospun nanofiber-mediated drug delivery strategies for localized cancer chemotherapy". Journal of Biomedical Materials Research - Part A.

Liu, S., Zhou, G., Liu, D., Xie, Z., Huang, Y., Wang, X., … Jing, X. 2012. "Inhibition of orthotopic secondary hepatic carcinoma in mice by doxorubicin-loaded electrospun polylactide nanofibers". Journal of Materials Chemistry B, *1*(1), 101–109.

Lukáš, D., Sarkar, A., Martinová, L., Vodsed'álková, K., Lubasová, D., Chaloupek, J., … Komárek, M. 2009. "Physical principles of electrospinning (electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century)". Textile Progress.

Mishra, V. K., Bhattacharjee, B. N., Parkash, O., Kumar, D., Rai, S. B. 2014. "Mg-doped hydroxyapatite nanoplates for biomedical applications: A surfactant assisted microwave synthesis and spectroscopic investigations". Journal of Alloys and Compounds, *614*, 283–288.

Pearce, M. E., Melanko, J. B., Salem, A. K. 2007. "Multifunctional nanorods for biomedical applications". Pharmaceutical Research, *24*(12), 2335–2352.

Ramachandran, R., Junnuthula, V. R., Gowd, G. S., Ashokan, A., Thomas, J., Peethambaran, R., … Koyakutty, M. 2017. "Theranostic 3-Dimensional nano brain-implant for prolonged and localized treatment of recurrent glioma". Scientific Reports, *7*.

Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.-E., Lim, T.-C., Ma, Z. 2012. "*An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*". *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*.

Rejinold, N. S., Nair, A., Sabitha, M., Chennazhi, K. P., Tamura, H., Nair, S. V., Jayakumar, R. 2012. "Synthesis, characterization and in vitro cytocompatibility studies of chitin nanogels for biomedical applications". Carbohydrate Polymers, *87*(1), 943–949.

Sill, T. J., von Recum, H. A. 2008. "Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering". Biomaterials.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. 2021. "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". CA: A Cancer Journal for Clinicians, *0*(0), 1–41.

Tseng, Y. Y., Liao, J. Y., Chen, W. A., Kao, Y. C., Liu, S. J. 2013. "Sustainable release of carmustine from biodegradable poly[(d,l)-lactide-co- glycolide] nanofibrous membranes in the cerebral cavity: In vitro and in vivo studies". Expert Opinion on Drug Delivery, *10*(7).

Tseng, Y. Y., Su, C. H., Yang, S. T., Huang, Y. C., Lee, W. H., Wang, Y. C., … Liu, S. J. 2016. "Advanced interstitial chemotherapy combined with targeted treatment of malignant glioma in rats by using drug-loaded nanofibrous membranes". Oncotarget, *7*(37).

Tseng, Y. Y., Wang, Y. C., Su, C. H., Yang, T. C., Chang, T. M., Kau, Y. C., Liu, S. J. 2015. "Concurrent delivery of carmustine, irinotecan, and cisplatin to the cerebral cavity using biodegradable nanofibers: In vitro and in vivo studies". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, *134*.

Wang, C., Wang, J., Zeng, L., Qiao, Z., Liu, X., Liu, H., … Ding, J. 2019. "Fabrication of Electrospun Polymer Nanofibers with Diverse Morphologies". Molecules, *24*(5), 834.

Weinberg, B. D., Blanco, E., Gao, J. 2008. "Polymer implants for intratumoral drug delivery and cancer therapy". Journal of Pharmaceutical Sciences.

Westphal, M., Hilt, D. C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P. C., … Ram, Z. 2003. "A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma". Neuro-oncology, *5*(2), 79–88.

Yan, T., Shi, Y., Zhuang, H., Lin, Y., Lu, D., Cao, S., Zhu, L. 2021. "Electrospinning mechanism of nanofiber yarn and its multiscale wrapping yarn". Polymers, *13*(18).

Zong, S., Wang, X., Yang, Y., Wu, W., Li, H., Ma, Y., … Jing, X. 2015. "The use of cisplatin-loaded mucoadhesive nanofibers for local chemotherapy of cervical cancers in mice". European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, *93*.

BÖLÜM 5

PROTEAZ İLE AKTİVE OLAN RESEPTÖRLER

Doç. Dr. Selma CIRRIK[1]

[1] Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye. selmacrrk@yahoo.com, Orcid ID: 0000-0001-8474-0185

GİRİŞ

Proteaz ile aktive olan reseptörler (protease-activated receptors; PARs) PAR1, PAR2, PAR3 ve PAR4 olmak üzere 4 üyesi bulunan, G proteini ile eşleşmiş bir reseptör ailesidir. PAR'ler G proteini ile eşleşmiş diğer reseptörler ile yapısal benzerliklerine rağmen, kendi ligandlarını maskelenmiş bir halde yapılarında bulundurmaları ve aktivasyon şekilleri yönünden benzersizdir. Reseptörün bir proteaz ile kesilip yapısındaki ligandın açığa çıkarılması, reseptörün temel aktivasyon mekanizmasını oluşturmaktadır (Heuberger ve Schuepbach, 2019; Zhao ve ark., 2014). PAR sinyal yolağını aktive etmeleri nedeniyle proteazlar diğer fizyolojik görevlerinin yanı sıra, kimyasal haberci olarak da görülmektedir. Örneğin bir serin proteaz olan trombin, trombositlerdeki PAR1'de proteolitik kesim yoluyla reseptör aktivasyonuna ve trombosit agregasyonuna neden olan bir trombosit aktivatörüdür (Coughlin, 2000). Trombin gibi pıhtılaşma kaskadında yer alan bazı proteazların yanı sıra, inflamatuar hücrelerden ve sindirim sisteminden salgılanan proteazlar PAR'lerde proteolitik kesime ve aktivasyona neden olabilmektedir. PAR aktivasyonu hemostaz, yara iyileşmesi, inflamasyon, doku perfüzyonu ve peristaltizm dahil bazı fizyolojik olayların regülasyonuna katılmaktadır (Heuberger ve Schuepbach, 2019; Adams ve ark., 2011; Ramachandran ve Hollenberg, 2008; Ossovskaya ve Bunnett, 2004). Bu bölümde PAR'lerin aktivasyonu ve PAR aracılı sinyal iletiminin genel özellikleri ile bu reseptör ailesinin dahil olduğu fizyolojik olaylar hakkında bilgi verilecektir.

PAR aktivasyonu ve sinyal iletimi

G proteini ile eşleşmiş reseptörler (G-protein coupled receptors; GPCRs) hücre membranında bulunan ve çok sayıda hormon, nörotransmitter ve parakrin faktörün sinyal iletimine aracılık eden geniş bir reseptör ailesidir. İnsanda 800'den fazla GPCR tanımlanmıştır. Yedi adet transmembran domaini olan bu reseptörlerin ekstraselüler ligand bağlama bölgesinin yanı sıra, intraselüler alanda heterotrimerik G proteinleri için bir bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Klasik aktivasyon mekanizmasına göre, ligandın bağlanması reseptörde G proteinlerinin Gα alt birimlerini aktive eden konformasyonel bir değişikliğe neden olmaktadır. GTP bağlayan Gα alt birimi ve Gβγ dimeri membrandaki farklı efektörler ile etkileşmek üzere birbirinden ayrılmaktadır. Farklı G proteinleri (Gαs, Gαi, Gαq, Gα12/13 gibi) ile eşleşmiş olan reseptörler farklı

hücre içi sinyal yolaklarının aktivasyonuna ve farklı hücresel yanıtlara neden olmaktadır (Weis ve Kobilka, 2018; Neves ve ark., 2002).

Proteaz ile aktive olan reseptörler, tanımlanan 4 üyesi ile birlikte bir GPCR sınıf A (rhodopsin-like family) reseptör ailesidir (Heuberger ve Schuepbach, 2019). PAR ailesi üyeleri diğer GPCR'lerin temel yapısal özelliklerini paylaşmaktadır. Yani reseptör, yedi adet transmembran domain (TM1-VII) ile üç adet hücre içi ve üç adet hücre dışı ilmek (loop) bölgesinden oluşmaktadır (Macfarlane ve ark., 2001). Bu yapısal benzerliğe rağmen PAR'ler aktivasyon mekanizmaları yönünden diğer reseptörlerden farklıdır. GPCR'lerin çoğu, küçük hidrofilik moleküller tarafından geri dönüşümlü olarak aktive edilirken (Weis ve Kobilka, 2018), endojen veya ekzojen (bakteri, bitki, mantar veya böcek kaynaklı) proteazlar tarafından PAR'lerin spesifik olarak kesilip aktive edilmesi geri dönüşümsüz bir olaydır (Zhao ve ark., 2014; Gieseler ve ark., 2013).

PAR aktivasyonunda görev alan proteazlar (proteinazlar) çözünür formda veya hücre membranıyla ilişkili (ko-reseptörlere veya spesifik membran bölgelerine bağlı halde) olabilmektedir. Proteaz aktivitesi ile PAR'lerin ekstraselüler N-terminal bölgesinden gerçekleşen kesim, yeni bir N-terminal peptid bölgesinin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Hala reseptörün bir parçası olan bu yeni açığa çıkarılmış N-terminal peptid, reseptörün ekstraselüler 2. ilmek bölgesindeki (extracellular loop 2; ECL2) korunmuş bir alana bağlanarak reseptörün aktivasyonuna neden olan *"bağlı (tethered) ligand"* olarak fonksiyon görmektedir (Zhao ve ark., 2014; Gerszten ve ark., 1994; Vu ve ark., 1991). Bu etkileşim, diğer GPCR'lere çözünür ligandın bağlanmasında olduğu gibi, reseptörde konformasyonel değişiklikleri başlatıp G proteinlerine olan afinitesini değiştirmektedir (Macfarlane ve ark., 2001). Bir serin proteaz olan trombin PAR1, PAR3 ve PAR4'ü, bir diğer serin proteaz olan tripsin ise PAR2 ve PAR4'ü kendi spesifik oldukları bölgelerden keserek yukarıda tanımlandığı şekilde aktive etmektedir (Heuberger ve Schuepbach, 2019). Bununla birlikte, trombin ve tripsine ek olarak, PAR'leri N-terminal spesifik bölgelerinden kesebilen çok sayıda proteaz tanımlanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1: PAR'lerde kesim yapabilen proteazlar

PAR tipi	**Proteaz**
PAR1	Trombin, aPC, FVIIa, FXa, tripsin, kimaz, MMP-1,-2,-3,-8,-9,-12,-13, katepsin G, nötrofil elastaz, proteinaz-3, plazmin, kallikrein-4,-5,-6,-14, granzim A, B, K ve kalpain-1.
PAR2	Tripsin, triptaz, aPC, FXa, FVIIa, kimaz, matriptaz, katepsin G, katepsin S, nötrofil elastaz, proteinaz-3, plazmin, testisin, kallikrein-4,-5,-6,-14, kalpain-2
PAR3	Trombin, aPC, FXa, tripsin
PAR4	Trombin, tripsin, katepsin G, kallikrein-14

Örneğin PAR1 aktivasyonuna neden olan proteazlar arasında faktör Xa (FXa), plazmin, kallikreinler, aktif protein C (aPC), matriks metalloproteinaz-1 (MMP1), nötrofil elastazı (NE) ve nötrofil proteinaz-3 (PR3) bulunmaktadır (Tablo 1). Bu proteazlar, PAR1 üzerinde trombin veya tripsin ile aynı noktalardan kesim yaparak ortak bir sinyal yolağını aktive edebileceği gibi, farklı bölgelerden kesim yaparak farklı ligandların açığa çıkmasına da neden olabilmektedir. Örneğin PAR1'in N-terminal alanında MMP1 (Trivedi ve ark., 2009) ve aPC (Mosnier ve ark., 2012) aktivitesiyle açığa çıkan ligand, serin proteazlar tarafından ortaya çıkarılandan farklıdır. Aynı reseptörün nötrofil enzimlerinden PR3 ve NE tarafından kesilmesiyle ortaya çıkan ligandlar hem birbirinden hem de MMP1 ve aPC aktivitesiyle açığa çıkandan farklıdır (Mihara ve ark., 2013). Bu farklı *bağlı ligandların* önemi reseptöre bağlandıklarında farklı sinyal yolaklarını aktive edebilme yetenekleridir (örneğin, kalsiyum artışıyla değil mitojenle aktive olan protein kinazların aktivasyonuyla). Kesim bölgesine özgü ortaya çıkan hücresel yanıtlar, alternatif (bias) sinyalleşme olarak da adlandırılmakta ve kesim bölgesi yönünden farklılık gösteren farklı proteazların aynı PAR aracılığı ile kendilerine özgü hücresel yanıt oluşturmalarına olanak sağlamaktadır (Zhao ve ark., 2014).

PAR'leri aktive eden proteazların aksine, sinyal iletimi ile ilgili olmayan bölgelerinden reseptör kesimi yapan başka proteazlar da vardır. Böyle bir kesim, örneğin PAR1'in trombin aktivasyon bölgesini de ortadan kaldıracak şekilde katepsin G tarafından budanması, reseptörün trombine cevaben aktivasyonunu engellemektedir (Heuberger ve Schuepbach, 2019; Renesto ve ark., 1997). Proteaz spesifik bölgesini kaybeden PAR'ler artık proteolitik olarak aktive edilemezler, ancak hala ECL2 ligand bağlama bölgeleri olduğundan komşu PAR'lerden gelen ligandları bağlama şansları vardır (reseptör dimerizasyonu) (Heuberger ve Schuepbach, 2019; Ludeman ve ark., 2005). Alternatif olarak, budanmış PAR'ler, kendi *bağlı ligandlarını* taklit eden çözünür peptitleri (sentetik agonistler) de bağlayabilmektedir. Her iki mekanizma da reseptör aktivasyonu ile sonuçlanacaktır (Chen ve ark., 1994; Scarborough ve ark.,1992).

Diğer GPCR'ler gibi, PAR'ler de ligand bağlanmasını takiben G proteinleri (Gαq, Gα12/13, Gαi gibi) aracılığıyla hücre içi sinyal yolaklarını aktive etmektedir (Gieseler ve ark., 2013; Russo ve ark., 2009; Coughlin, 2005). Birçok durumda belirli bir proteaz veya sentetik agonist bu yolakların birden fazlasını aktive edebilmesine rağmen, bazı durumlarda proteazlar ve sentetik agonistler tek bir yolağı aktive etmektedir (Zhao ve ark., 2014). Yukarıda açıklandığı gibi, G proteini aracılı sinyal iletimi için, reseptörün kendisi (yeni açığa çıkmış N-terminal bölgesi) heterotrimerik G proteininin Gα alt birimine GTP bağlanmasını uyaracak bir ligand olarak görev yapmaktadır. Gα alt birimine GTP'nin bağlanması Gβγ dimer alt biriminden ayrılmasına neden olmakta, sonraki olaylar ise Gα tipine göre değişmektedir (Gieseler ve ark., 2013). Örneğin Gα12/13'ün aracılık ettiği sinyal yolağında GTPaz RhoA aktivasyonu ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi söz konusudur. Gαi aracılı yolakta adenilat siklaz inhibisyonu ve cAMP üretimindeki azalış hücresel etkilerde rol oynamaktadır. Gαq aktivasyonu ise fosfolipaz C'nin uyarılmasına ve inositol trifosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) üretimine neden olarak hücrede kalsiyum artışına ve protein kinaz C'nin (PKC) aktivasyonuna neden olmaktadır (Lucena ve McDougall, 2021; Chiu ve ark., 2008). Gαq aktivasyonu aynı zamanda mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK) aktive etmekte ve Ras sinyalini indüklemektedir. Rho yolağını öncelikle Gα12/13 olmak üzere, Gαq da aktive edebilmektedir. Gβγ alt birimi, α alt birimine bağlandığında negatif düzenleyici olarak işlev görmekte (Heuberger

ve Schuepbach, 2019) ayrıca, fosfoinositid-3 kinazı, diğer lipid modifiye edici enzimleri, protein kinazları, MAPK kaskadını ve iyon kanallarını da aktive edebilmektedir (Angiolillo ve ark., 2010).

PAR ailesi üyelerinden PAR1 ve PAR2 Gαq, Gα12/13 ve Gαi aracılı sinyal yolaklarını, PAR4 ise Gαq ve Gα12/13 aracılı sinyal yolaklarını aktive edebilmektedir. Diğer aile üyelerinin aksine PAR3'ün doğrudan sinyal oluşturamadığı ancak PAR1 ve PAR4 aktivasyonunda görev aldığı düşünülmektedir (Zhao ve ark., 2014; McLaughlin ve ark., 2007; Nakanishi-Matsui ve ark., 2000).

PAR'lerin G proteininden bağımsız sinyal iletiminde β-arrestinler rol oynamaktadır. aPC ile aktive edilen PAR1, endotel hücrelerinde β-arrestin aracılı sitoprotektif etki yapmaktadır (Soh ve Trejo, 2011). β-arrestinler reseptörün duyarsızlaşmasında da görev almaktadır. PAR'ün agonisti kendi N-terminal dizisi olduğu için, agonistin reseptörden ayrılması veya difüze olup uzaklaşması söz konusu değildir. Bu nedenle reseptörlerin duyarsızlaştırılması ve etkinin sonlandırılması farklı şekillerde düzenlenmektedir. Örneğin PAR-1 reseptörleri, G-proteiniyle eşleşmiş reseptör kinaz (GRK) 3 veya 5 tarafından fosforile edilerek ve β-arrestin 1 aracılı duyarsızlaştırılarak G-proteinlerinden ayrılmaktadır (McDougall ve Muley, 2015).

Aktif ve fonksiyonel proteazların mevcudiyeti, PAR sinyal iletiminin başlayabilmesi için temel bir gereksinimidir. Bağışıklık hücrelerinin çok sayıda endojen proteaz için temel kaynak olması ve inflamatuar yanıtın farklı evrelerine farklı hücre tiplerinin baskın olması PAR'leri aktive eden baskın proteaz düzeylerinin ve dolayısıyla PAR aktivitesinin, farklı patofizyolojik durumlardan etkilenmesine neden olmaktadır. Örneğin, mikrobiyal enfeksiyona ilk yanıt veren hücreler olan nötrofiller, elastaz, katepsin G ve proteinaz-3 üretirken (Pham, 2006) kronik inflamasyona aracılık eden makrofajlar plazmin, MMP'lar ve katepsin S salgılamaktadır (Wynn ve Barron, 2010). Gerçekten de herhangi bir zamanda farklı proteazlar PAR'leri farklı bölgelerinden keserek benzersiz sonuçlar ortaya koyabilmektedir. Bu nedenle, PAR'lerin aktivitesi, fizyolojik ve patolojik koşullara göre farklılık gösteren proteazların varlığına bağlı olarak değişebilmektedir (Zhao ve ark., 2014).

PAR aktivitesinde reseptör etkileşimlerinin önemi

GPCR'ler başlangıçta monomerik birimler olarak düşünülse de bunların birbirleriyle ya da diğer reseptör tipleri ile dimerize olabildikleri gösterilmiştir (Bai, 2004). Benzer şekilde PAR'ler kendi aile üyeleri arasında homodimer veya heterodimer oluşturabildikleri gibi diğer membran reseptörleriyle de etkileşime girebilmektedir (Gieseler ve ark., 2013; Lin ve ark., 2013). Örneğin PAR1, 2 ve 4'ün homodimer oluşturabildikleri bilinmektedir. PAR'lerin diğer membran reseptörleriyle heterodimer oluşturması *"transaktivasyon"* kavramına daha yakındır. Transaktivasyon, bir GPCR'ün aktivasyonunun, hücre membranındaki başka bir reseptörü *de novo* protein sentezi olmadan aktive etmesi ve reseptörün hücre içi sinyal yolaklarını uyarması anlamına gelmektedir (Little ve ark., 2011). Özellikle endotelyal hücrelerde ve genel olarak kardiyovasküler sistemde PAR1-PAR2 heterodimerlerinin rolü gösterilmiştir. Bu etkileşimde, trombin etkisiyle PAR1'de açığa çıkarılan *bağlı ligandın* PAR2'nin transaktivasyonuna neden olduğu görülmektedir. Bu sayede normalde trombin ile doğrudan aktive edilemeyen PAR2 sinyal yolağı (Tablo1), PAR1 aracılı transaktivasyon ile dolaylı yoldan uyarılmaktadır (Blackhart ve ark., 1996).

Transaktivasyon mekanizması sadece PAR reseptörleri arasında işleyen bir yol değildir. Aksine, PAR'ler diğer GPCR'ler, tirozin kinaz ve serin/treonin kinaz aktivitesi gösteren reseptörler, prostanoid reseptörleri, toll-benzeri resepörler ve iyon kanalı reseptörleri dahil çok sayıda PAR-olamayan reseptörle etkileşim halindedir. (Lee-Rivera ve ark., 2022; Gieseler ve ark., 2013). Bu tarz etkileşimler PAR'ın tek başına ortaya koyduğundan çok daha geniş kapsamlı etkileri başlatmakta ve PAR'lere atfedilen hücresel fonksiyonların çeşitliliğini arttırmaktadır.

PAR ARACILI GERÇEKLEŞEN FİZYOLOJİK OLAYLAR

- **Trombositler**

Trombositler, pıhtılaşmanın kritik aracıları olan kan hücrelerdir. Trombin trombositlerdeki PAR sinyal yolağını başlatarak hücre içi kalsiyum artışına, agregasyona, granülerin salgılanmasına ve hemostaz için gerekli olan prokoagülan aktivitenin indüklenmesine neden olmaktadır. İnsan trombositlerinde PAR1 ve PAR4 ekspresyonu saptanmıştır ve bunların her ikisi

de trombin aracılı trombosit aktivasyonuna aracılık edebilmektedir (Coughlin, 2000; Vu ve ark., 1991). Yine de trombositlerdeki ana trombin reseptörü PAR1 olup, PAR4 aracılı trombosit aktivasyonu için daha yüksek trombin konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Coughlin, 2005; Coughlin, 2000).

Trombositlerde PAR1 aktivasyonu vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) salınımına, PAR4 aktivasyonu ise endostatin salınımına neden olmaktadır. PAR aktivasyonu ile salgılanan bu faktörler anjiogenezin düzenlenmesi, yara iyileşmesi ve tümör büyümesi gibi süreçlere dahil olmaktadır (Ramachandran ve Hollenberg, 2008).

- **Dolaşım sistemi**

Endotel hücreleri ve vasküler düz kas hücrelerinde tüm PAR tipleri eksprese edilmektedir. Proteazlar bu hücreler üzerinden damar direnci ve kan akımını, plazma proteinlerinin ve granülositlerin damar dışına çıkışını ve anjiyogenezi kontrol edebilmektedir.

Trombin aracılı PAR1 aktivasyonu endotel hücre kültüründe prostasiklin ve nitrik oksit (NO) artışına (Garcia ve ark., 1993), hücre retraksiyonuna ve endotel hücre tabakasında geçirgenlik artışına (Malik ve Fenton, 1992) von Willebrand faktör (vWF) ve P-selektin mobilizasyonuna neden olmaktadır (Coughlin, 2005). Organ banyosu preparatlarında yapılan çalışmalar, endotelyal PAR1 ve PAR2 aktivasyonunun NO üretiminde artışa ve vasküler gevşemeye neden olduğunu göstermiştir (Hamilton ve ark., 2001; Al-Ani ve ark., 1995). Ancak, genetik olarak PAR ekspresyonu olmayan farelerin dolaşım sisteminde belirgin bir anormallik olmaması, normal fizyolojik koşullarda PAR'lerin kan akımına önemli bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir (Antoniak ve ark., 2017; Ossovskaya ve Bunnett, 2004). Bununla birlikte, inflamasyon ve sepsis gibi proteaz seviyesinin yüksek olduğu durumlarda PAR'lerin dolaşım sistemine olan etkileri önem kazanmaktadır. Örneğin endotoksin verilen sıçanlarda vasküler sistemde PAR2 ekspresyon artışı ve PAR2 aktivatörlerine cevaben hipotansif bir yanıt gözlenmektedir (Cicala ve ark., 1999). PAR1'in endotel geçirgenliğini arttırıcı etkisi inflamatuar koşullarda plazmanın damar dışına çıkışı ve ödem oluşumunda önemli görünmektedir (Ossovskaya ve Bunnett, 2004).

PAR1 aktivatörleri endotel hücrelerde VEGF reseptör ekspresyonunda artışa neden olarak VEGF'nin endoteldeki mitojenik etkilerini

güçlendirmektedir (Tsopanoglou ve ark., 1999). Böylece trombin hem trombositlerden VEGF salgısını arttırarak hem de endotelin VEGF'ye yanıtını arttırarak pro-anjiogenik etkiler ortaya koyabilmektedir.

- **Bağışıklık sistemi**

PAR'ler monosit, makrofaj, mast hücresi, T hücresi, eozinofil ve nötrofil gibi çok sayıda immun hücrede eksprese edilmektedir. Bağışıklık sistemindeki PAR'ler temel olarak inflamatuar hücrelerden sitokin salgısını düzenlemektedir (Ramachandran ve Hollenberg, 2008). Örneğin trombin monositlerden IL-8, IL-6 ve monosit kemoatraktan protein 1 salgısını (Naldini ve ark., 2000; Colotta ve ark., 1994), doğal katil hücrelerden IL-2 salgısını uyarmaktadır (Naldini ve ark., 1996). PAR2 aktivasyonu eozinofillerde degranülasyon ve süperoksit üretimine (Miike ve ark., 2001), nötrofillerde ise şekil değişikliği ve CD11b/CD18 ekspresyonuna neden olmaktadır (Howells ve ark., 1997).

Lökositlerin endotel üzerindeki yuvarlanma hareketi ve adezyonu, endotel hücre geçirgenliğinde artış ve lökositlerin damar dışına çıkışı gibi inflamatuar yanıtlarda PAR1, PAR2 ve PAR4 rol oynamaktadır. Vasküler yanıtlara benzer şekilde, inflamasyon ve sepsis gibi proteaz üretiminin arttığı koşullarda, PAR aktivasyonu ve immünmodülatör etkisi önem kazanmaktadır (Ramachandran ve Hollenberg, 2008).

- **Solunum sistemi**

Solunum sistemindeki epitel hücreleri, düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve fibroblastlarda PAR ekspresyonu saptanmıştır. PAR'ler düz kas hücrelerinin kasılmasına veya gevşemesine neden olarak hava yolu tonusunun düzenlenmesine katılmaktadır (Lan ve ark., 2002). Ayrıca, proinflamatuar ve profibrotik mediatörlerin salgılanmasını uyararak (Mercer ve ark., 2007), hücre dışı matriks bileşenlerinin üretimi ve hücre mitogenezini uyararak (Moffatt ve ark., 2004) akciğer dokusunun yeniden şekillenmesinde rol oynarlar.

Bleomisin ile indüklenen bir pulmoner fibroz modelinde PAR1'in önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Hatta trombin inhibitörlerinin kullanımı bağ dokusu büyüme faktörünün ekspresyonunda ve kolajen birikiminde azalışa neden olarak anti-fibrotik etki göstermiştir (Howell ve ark., 2002, 2001). Bununla birlikte PAR1'in aPC ile uyarılmasının bleomisin ile indüklenen pulmoner fibrozda koruyucu olduğu rapor edilmiştir (Yasui ve ark., 2001). Bu

sonuçlar aktive edildiği proteaza bağlı olarak PAR1'in akciğerlerde fibrozis oluşumuna aracılık edebileceği gibi koruyucu olabileceğini de düşündürmektedir.

- **Sinir sistemi**

Korteks, amigdala, talamus, hippokampus, hipotalamus, substansia nigra ve striatum gibi farklı beyin bölgelerinde hem nöronlarda hem de glial hücrelerde PAR ekspresyonu gösterilmiştir (Price ve ark., 2021; Pompili ve ark., 2019). PAR1 aktivasyonu astrositlerde proliferasyona, morfolojik değişikliklere, nöroinflamatuar sitokinlerin ve nörotrofik faktörlerin salgılanmasına neden olmaktadır (Pompili ve ark., 2019). PAR1 benzer şekilde hem *in vivo* hem *in vitro* koşullara mikroglia aktivasyonuna neden olmaktadır. Trombin, PAR1'i aktive ederek sinir hücrelerinde nöritlerin morfolojisini ve büyümesini etkilemektedir (Olianas ve ark., 2007; Suidan ve ark., 1992). PAR1 ayrıca hippokampusta NMDA reseptörlerinin etkilerini güçlendirerek sinaptik fonksiyonları da etkileyebilmektedir (Gingrich ve ark., 2000). Trombin aracılı PAR1 aktivasyonunun nöronal hücreleri ve astrositleri hipoglisemiden veya oksidatif stres kaynaklı hücre ölümünden koruduğu gösterilmiştir (Vaughan ve ark., 1995). PAR'lar nöronal sağkalımı etkiliyor gibi görünse de hücre ölümüne neden olduklarını gösteren çalışmalar da vardır (Noorbakhsh ve ark., 2003). Dahası PAR'ların Alzheimer hastalığı, HIV ile ilişkili demans ve multipl sklerozun patofizyolojisi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Noorbakhsh ve ark., 2003).

Periferik sinir sistemindeki PAR işlevi üzerine yapılan çalışmalar, bu reseptörlerin nörojenik inflamasyonda, hiperaljezi, analjezi, kaşıntı ve sinir rejenerasyonunda rol oynayabileceğini göstermiştir **(**Ramachandran ve Hollenberg, 2008; Ossovskaya ve Bunnett, 2004).

- **Gastrointestinal sistem**

Gastrointestinal sistemde bütün PAR tipleri eksprese edilmektedir ve bunlar sindirim sürecinde salgılanan proteazlar, mikrobiyata kaynaklı proteazlar veya bağışıklık hücrelerinden salgılanan proteazlar aracılı aktive olabilmektedir. Sindirim kanalındaki endotel hücreleri, epitel hücreleri, düz kas hücreleri, miyofibroblastlar kadar enterik nöronlarda da PAR ekspresyonu gösterilmiştir (Ramachandran ve Hollenberg, 2008; Vergnolle, 2005).

Gastrointestinal sistemde özellikle PAR1 ve PAR2 aktivasyonunun iyon taşınması (örneğin klor sekresyonu), bağırsak geçirgenliği, motilite ve inflamatuar yanıtla ilgili olduğu bildirilmiştir (Ramachandran ve Hollenberg, 2008; Vergnolle, 2005).

- **Boşaltım sistemi**

Böbrekte PAR 1, 2 ve 4'ün ekspresyonu gösterilmiş ve bunların glomerüler, mikrovasküler ve inflamatuar yanıtların regülasyonuna katıldığı bildirilmiştir. Örneğin PAR2 aktivasyonu, perfüze sıçan böbreğinde vazodilatasyona ve perfüzyon artışına neden olurken (Gui ve ark., 2003; Trottier ve ark., 2002), PAR1 aktivasyonu perfüzyonda belirgin bir azalışa neden olmaktadır (Gui ve ark., 2003). FXa aracılı PAR2 aktivasyonunun mezangial hücre proliferasyonuna aracılık ettiği gösterilmiştir (Tanaka ve ark., 2005). İnsan glomerüler epitel hücrelerinde ve mezengial hücrelerde eksprese edilen PAR'lerin kresentik glomerülonefritin patogenezine katıldığı, glomerüler fibrin birikimi ve makrofaj infiltrasyonunda rolü olduğu bildirilmiştir (Palygin ve ark., 2016).

SONUÇ

Proteazlar, intestinal lümende diyet proteinlerinin sindirilmesinden hücre döngüsünün kontrolüne kadar çok çeşitli biyolojik süreçlere katılmaktadır. PAR1'in tanımlanmasıyla proteazların aynı zamanda bir kimyasal haberci gibi davranarak hücre içi sinyal yolaklarını aktive edebildiği anlaşılmıştır (Ossovskaya ve Bunnett, 2004). Bu bölüm PAR sinyal yolağının aktivasyonu ve PAR aracılı gerçekleşen fizyolojik olaylar hakkında genel bir bakış sağlamaktadır.

Şimdiye kadar dört tane PAR üyesi tanımlanmış ve bunların aktivasyon mekanizmaları, hangi proteazlara duyarlı oldukları incelenmiş ve böylece PAR ailesini tanıma yolunda önemli bilgilere ulaşılmıştır. Ancak PAR'lerin proteazlara ve hücreye özgü yanıtları, diğer reseptörler ile etkileşimleri ve bunların hücreye özgü sonuçları tam olarak bilinmeyen ve araştırılması gereken konulardır.

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalardan PAR'lerin dolaşım sistemi, solunum sistemi, sinir sistemi, sindirim sistemi ve boşaltım sistemi fonksiyonlarının regülasyonunda rol oynayabileceklerine dair sonuçlar elde

edilmiştir (Ramachandran ve Hollenberg, 2008; Ossovskaya ve Bunnett, 2004). Bununla birlikte PAR'lerin, normal fizyolojik koşullardan ziyade tromboz, kanama, inflamasyon, kanser veya doku hasarı gibi patolojik koşullarda daha önemli olduğu düşünülmektedir. Zira bu koşullar pıhtılaşma ve fibrinolitik sistem proteazları ile inflamatuar hücre kaynaklı proteazların aktive olduğu, dolayısı ile PAR sinyal yolağının normalden daha etkin olduğu koşullardır. Bu nedenle, özellikle trombüs oluşumu ile ilişkili kardiyovasküler hastalıklarda ve inflamatuar hastalıklarda PAR sinyal yolağının rolü üzerinde durulmaktadır. Ayrıca PAR agonistlerinin yara iyileşmesi ve tamirinde, antagonistlerinin ise alevlenmiş inflamasyonu ve ağrıyı engellemedeki potansiyel etkileri üzerine araştırmalar devam etmektedir. Bu çalışmaların sonuçları PAR sinyal yolağı ile ilgili anlayışımızı arttıracaktır.

KAYNAKÇA

Al-Ani, B., Saifeddine, M., & Hollenberg, M. D. (1995). Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH2, in rat vascular and gastric smooth muscle. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, *73*(8), 1203–1207.

Angiolillo, D. J., Capodanno, D., & Goto, S. (2010). Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *European heart journal*, *31*(1), 17–28.

Antoniak, S., Cardenas, J. C., Buczek, L. J., Church, F. C., Mackman, N., & Pawlinski, R. (2017). Protease-Activated Receptor 1 Contributes to Angiotensin II-Induced Cardiovascular Remodeling and Inflammation. *Cardiology*, *136*(4), 258–268.

Bai M. (2004). Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cellular signalling*, *16*(2), 175–186.

Blackhart, B. D., Emilsson, K., Nguyen, D., Teng, W., Martelli, A. J., Nystedt, S., Sundelin, J., & Scarborough, R. M. (1996). Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family. *The Journal of biological chemistry*, *271*(28), 16466–16471.

Chen, J., Ishii, M., Wang, L., Ishii, K., & Coughlin, S. R. (1994). Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode. *The Journal of biological chemistry*, *269*(23), 16041–16045.

Chiu, Y. C., Fong, Y. C., Lai, C. H., Hung, C. H., Hsu, H. C., Lee, T. S., Yang, R. S., Fu, W. M., & Tang, C. H. (2008). Thrombin-induced IL-6 production in human synovial fibroblasts is mediated by PAR1, phospholipase C, protein kinase C alpha, c-Src, NF-kappa B and p300 pathway. *Molecular immunology*, *45*(6), 1587–1599.

Cicala, C., Pinto, A., Bucci, M., Sorrentino, R., Walker, B., Harriot, P., Cruchley, A., Kapas, S., Howells, G. L., & Cirino, G. (1999). Protease-activated receptor-2 involvement in hypotension in normal and endotoxemic rats in vivo. *Circulation*, *99*(19), 2590–2597.

Colotta, F., Sciacca, F. L., Sironi, M., Luini, W., Rabiet, M. J., & Mantovani, A. (1994). Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. *The American journal of pathology*, *144*(5), 975–985.

Coughlin S. R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, *407*(6801), 258–264.

Coughlin S. R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, *3*(8), 1800–1814.

Garcia, J. G., Patterson, C., Bahler, C., Aschner, J., Hart, C. M., & English, D. (1993). Thrombin receptor activating peptides induce Ca2+ mobilization, barrier dysfunction, prostaglandin synthesis, and platelet-derived growth factor mRNA expression in cultured endothelium. *Journal of cellular physiology*, *156*(3), 541–549.

Gerszten, R. E., Chen, J., Ishii, M., Ishii, K., Wang, L., Nanevicz, T., Turck, C. W., Vu, T. K., & Coughlin, S. R. (1994). Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. *Nature*, *368*(6472), 648–651.

Gieseler, F., Ungefroren, H., Settmacher, U., Hollenberg, M. D., & Kaufmann, R. (2013). Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell communication and signaling: CCS*, *11*, 86.

Gingrich, M. B., Junge, C. E., Lyuboslavsky, P., & Traynelis, S. F. (2000). Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *20*(12), 4582–4595.

Gui, Y., Loutzenhiser, R., & Hollenberg, M. D. (2003). Bidirectional regulation of renal hemodynamics by activation of PAR1 and PAR2 in isolated perfused rat kidney. *American journal of physiology. Renal physiology*, *285*(1), F95–F104.

Hamilton, J. R., Moffatt, J. D., Frauman, A. G., & Cocks, T. M. (2001). Protease-activated receptor (PAR) 1 but not PAR2 or PAR4 mediates endothelium-dependent relaxation to thrombin and trypsin in human pulmonary arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology*, *38*(1), 108–119.

Heuberger, D. M., & Schuepbach, R. A. (2019). Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thrombosis journal*, *17*, 4.

Howell, D. C., Goldsack, N. R., Marshall, R. P., McAnulty, R. J., Starke, R., Purdy, G., Laurent, G. J., & Chambers, R. C. (2001). Direct thrombin inhibition reduces lung collagen, accumulation, and connective tissue growth factor mRNA levels in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*, *159*(4), 1383–1395.

Howell, D. C., Laurent, G. J., & Chambers, R. C. (2002). Role of thrombin and its major cellular receptor, protease-activated receptor-1, in pulmonary fibrosis. *Biochemical Society transactions*, *30*(2), 211–216.

Howells, G. L., Macey, M. G., Chinni, C., Hou, L., Fox, M. T., Harriott, P., & Stone, S. R. (1997). Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. *Journal of cell science*, *110 (Pt 7)*, 881–887.

Kaneider, N. C., Leger, A. J., Agarwal, A., Nguyen, N., Perides, G., Derian, C., Covic, L., & Kuliopulos, A. (2007). 'Role reversal' for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nature immunology*, *8*(12), 1303–1312.

Lan, R. S., Stewart, G. A., & Henry, P. J. (2002). Role of protease-activated receptors in airway function: a target for therapeutic intervention?. *Pharmacology & therapeutics*, *95*(3), 239–257.

Lee-Rivera, I., López, E., & López-Colomé, A. M. (2022). Diversification of PAR signaling through receptor crosstalk. *Cellular & molecular biology letters*, *27*(1), 77.

Lin, H., Liu, A. P., Smith, T. H., & Trejo, J. (2013). Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors. *Pharmacological reviews*, *65*(4), 1198–1213.

Little, P. J., Burch, M. L., Al-aryahi, S., & Zheng, W. (2011). The paradigm of G protein receptor transactivation: a mechanistic definition and novel example. *TheScientificWorldJournal*, *11*, 709–714.

Lucena, F., & McDougall, J. J. (2021). Protease Activated Receptors and Arthritis. *International journal of molecular sciences*, *22*(17), 9352.

Ludeman, M. J., Kataoka, H., Srinivasan, Y., Esmon, N. L., Esmon, C. T., & Coughlin, S. R. (2005). PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. *The Journal of biological chemistry*, *280*(13), 13122–13128.

Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., & Plevin, R. (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacological reviews*, *53*(2), 245–282.

Malik, A. B., & Fenton, J. W., 2nd (1992). Thrombin-mediated increase in vascular endothelial permeability. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, *18*(2), 193–199.

McDougall, J. J., & Muley, M. M. (2015). The role of proteases in pain. *Handbook of experimental pharmacology*, *227*, 239–260.

McLaughlin, J. N., Patterson, M. M., & Malik, A. B. (2007). Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(13), 5662–5667.

Mercer, P. F., Deng, X., & Chambers, R. C. (2007). Signaling pathways involved in proteinase-activated receptor1-induced proinflammatory and profibrotic mediator release following lung injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1096*, 86–88.

Mihara, K., Ramachandran, R., Renaux, B., Saifeddine, M., & Hollenberg, M. D. (2013). Neutrophil elastase and proteinase-3 trigger G protein-biased signaling through proteinase-activated receptor-1 (PAR1). *The Journal of biological chemistry*, *288*(46), 32979–32990.

Miike, S., McWilliam, A. S., & Kita, H. (2001). Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *167*(11), 6615–6622.

Moffatt, J. D., Page, C. P., & Laurent, G. J. (2004). Shooting for PARs in lung diseases. *Current opinion in pharmacology*, *4*(3), 221–229.

Mosnier, L. O., Sinha, R. K., Burnier, L., Bouwens, E. A., & Griffin, J. H. (2012). Biased agonism of protease-activated receptor 1 by activated protein C caused by noncanonical cleavage at Arg46. *Blood*, *120*(26), 5237–5246.

Nakanishi-Matsui, M., Zheng, Y. W., Sulciner, D. J., Weiss, E. J., Ludeman, M. J., & Coughlin, S. R. (2000). PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*, *404*(6778), 609–613.

Naldini, A., & Carney, D. H. (1996). Thrombin modulation of natural killer activity in human peripheral lymphocytes. *Cellular immunology*, *172*(1), 35–42.

Naldini, A., Carney, D. H., Pucci, A., Pasquali, A., & Carraro, F. (2000). Thrombin regulates the expression of proangiogenic cytokines via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *General pharmacology*, *35*(5), 255–259.

Neves, S. R., Ram, P. T., & Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5573), 1636–1639.

Noorbakhsh, F., Vergnolle, N., Hollenberg, M. D., & Power, C. (2003). Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nature reviews. Neuroscience*, *4*(12), 981–990.

Olianas, M. C., Dedoni, S., & Onali, P. (2007). Proteinase-activated receptors 1 and 2 in rat olfactory system: layer-specific regulation of multiple signaling pathways in the main olfactory bulb and induction of neurite retraction in olfactory sensory neurons. *Neuroscience*, *146*(3), 1289–1301.

Ossovskaya, V. S., & Bunnett, N. W. (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiological reviews*, *84*(2), 579–621.

Palygin, O., Ilatovskaya, D. V., & Staruschenko, A. (2016). Protease-activated receptors in kidney disease progression. *American journal of physiology. Renal physiology*, *311*(6), F1140–F1144.

Pham C. T. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nature reviews. Immunology*, *6*(7), 541–550.

Pompili, E., Fabrizi, C., Fornai, F., & Fumagalli, L. (2019). Role of the protease-activated receptor 1 in regulating the function of glial cells within central and peripheral nervous system. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, *126*(10), 1259–1271.

Price, R., Mercuri, N. B., & Ledonne, A. (2021). Emerging Roles of Protease-Activated Receptors (PARs) in the Modulation of Synaptic Transmission and Plasticity. *International journal of molecular sciences*, *22*(2), 869.

Ramachandran, R., & Hollenberg, M. D. (2008). Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *British journal of pharmacology*, *153 Suppl 1*(Suppl 1), S263–S282.

Renesto, P., Si-Tahar, M., Moniatte, M., Balloy, V., Van Dorsselaer, A., Pidard, D., & Chignard, M. (1997). Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood*, *89*(6), 1944–1953.

Russo, A., Soh, U. J., & Trejo, J. (2009). Proteases display biased agonism at protease-activated receptors: location matters!. *Molecular interventions*, *9*(2), 87–96.

Scarborough, R. M., Naughton, M. A., Teng, W., Hung, D. T., Rose, J., Vu, T. K., Wheaton, V. I., Turck, C. W., & Coughlin, S. R. (1992). Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *The Journal of biological chemistry*, *267*(19), 13146–13149.

Soh, U. J., & Trejo, J. (2011). Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through β-arrestin and dishevelled-2 scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(50), E1372–E1380.

Suidan, H. S., Stone, S. R., Hemmings, B. A., & Monard, D. (1992). Thrombin causes neurite retraction in neuronal cells through activation of cell surface receptors. *Neuron*, *8*(2), 363–375.

Tanaka, M., Arai, H., Liu, N., Nogaki, F., Nomura, K., Kasuno, K., Oida, E., Kita, T., & Ono, T. (2005). Role of coagulation factor Xa and protease-activated receptor 2 in human mesangial cell proliferation. *Kidney international*, *67*(6), 2123–2133.

Trivedi, V., Boire, A., Tchernychev, B., Kaneider, N. C., Leger, A. J., O'Callaghan, K., Covic, L., & Kuliopulos, A. (2009). Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. *Cell*, *137*(2), 332–343.

Trottier, G., Hollenberg, M., Wang, X., Gui, Y., Loutzenhiser, K., & Loutzenhiser, R. (2002). PAR-2 elicits afferent arteriolar vasodilation by NO-dependent and NO-independent actions. *American journal of physiology. Renal physiology*, *282*(5), F891–F897.

Tsopanoglou, N. E., & Maragoudakis, M. E. (1999). On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *The Journal of biological chemistry*, *274*(34), 23969–23976.

Vaughan, P. J., Pike, C. J., Cotman, C. W., & Cunningham, D. D. (1995). Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *15*(7 Pt 2), 5389–5401.

Vergnolle N. (2005). Clinical relevance of proteinase activated receptors (pars) in the gut. *Gut*, *54*(6), 867–874.

Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I., & Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, *64*(6), 1057–1068.

Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2018). The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annual review of biochemistry*, *87*, 897–919.

Wynn, T. A., & Barron, L. (2010). Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Seminars in liver disease*, *30*(3), 245–257.

Yasui, H., Gabazza, E. C., Tamaki, S., Kobayashi, T., Hataji, O., Yuda, H., Shimizu, S., Suzuki, K., Adachi, Y., & Taguchi, O. (2001). Intratracheal administration of activated protein C inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *163*(7), 1660–1668.

Zhao, P., Metcalf, M., & Bunnett, N. W. (2014). Biased signaling of protease-activated receptors. *Frontiers in endocrinology*, *5*, 67.

BÖLÜM 6

İNTESTİNAL BARİYERİN YAPISI VE GEÇİRGENLİĞİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Doç. Dr. Selma CIRRIK[1]

[1] Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye. selmacrrk@yahoo.com, Orcid ID: 0000-0001-8474-0185

GİRİŞ

İntestinal sistem, vücut iç ortamı ile dış ortam arasındaki en büyük arayüzlerden birisidir. İntestinal bariyer su, iyon ve makromolekül alışverişini düzenleyen, aynı zamanda çevresel toksinler, diyet antijenleri ve bakteriler dahil lüminal içeriğin, alttaki bağışıklık hücreleriyle ve vücudun geri kalanı ile etkileşimini engelleyen, seçici bir fiziksel ve immünolojik bariyerdir. Bariyerin temel bileşenleri arasında antimikrobiyel peptidler içeren bir mukus tabakası, sürekli yenilenen bir epitel hücre hattı, hücreler arasındaki sıkı bağlantılar ve hatta bağırsak mikrobiyomu gibi çeşitli koruyucu mekanizmalar bulunmaktadır (Capaldo ve ark., 2017; Cornick ve ark., 2015). Bariyer bütünlüğündeki kusurlar, bağışıklık hücrelerini güçlü bir şekilde aktive edip intestinal dokunun kronik inflamasyonuna neden olmakta ve bu durum çölyak hastalığı, inflamatuar bağırsak hastalıkları, enfeksiyöz ishal ve huzursuz bağırsak sendromu gibi gastrointestinal hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Usuda ve ark., 2021; Makki ve ark., 2018). Bariyer fonksiyonunun bozulması mikrobiyota kaynaklı moleküllerin (lipopolisakkarit (LPS) ve bakteriyel toksinler gibi) kana geçişi anlamına geldiğinden, inflamatuar yanıt lokal olmaktan çıkıp sistemik bir yanıta da dönüşebilmektedir (Usuda ve ark., 2021; Quigley, 2016).

Yapılan çalışmalar intestinal bariyerin dinamik bir sistem olduğunu, özellikle farklı diyet bileşenleri ile bariyerin kendini yenileme kapasitesi ve geçirgenliğinin değiştiğini göstermiştir (Camilleri ve ark., 2019). Bu durum sadece gastrointestinal hastalıklar için değil, düşük düzeyde-kronik inflamasyonun gözlendiği obezite, diyabet, kronik yorgunluk sendromu, otizm spektrum bozukluğu, majör depresif bozukluk ve şizofreni gibi pek çok hastalık açısından intestinal permeabilite konusunu ön plana çıkarmıştır (Castillo-Rodriguez ve ark., 2018; Grochowska ve ark., 2018; Hansen ve ark., 2015; Hold ve ark., 2014). Bu bölümde intestinal bariyerin yapısı ve özellikleri tanımlandıktan sonra diyet lifi, yüksek yağlı diyet ve stres gibi bariyer bütünlüğü ve geçirgenliğini etkileyen temel faktörler üzerinde durulmaktadır.

İNTESTİNAL BARİYERİN TEMEL BİLEŞENLERİ

- **Bağırsak mukozası**

Mukoza, gastrointestinal sistemin en iç tabakası olup sindirim, emilim ve salgılama fonksiyonlarının çoğunun gerçekleştiği bir epitel hücre katmanı, onun altında son derece vaskülarize bir interstisyel doku olan lamina propria ve mukozaya destek ve hareketlilik sağlayan muskularis mukoza katmanlarından oluşmaktadır. Epitel hücre katmanı, oldukça organize viskoelastik bir glikoprotein ağ olan ve intestinal bariyerin önemli bir bileşeni olan mukus tabakası ile kaplanmıştır. Mukus, esas olarak, özelleşmiş epitel hücreleri olan Goblet hücreleri tarafından salgılanan müsin proteinlerinden (özellikle müsin 2) oluşmaktadır (Capaldo ve ark., 2017). Mukus tabakası bütün intestinal sistem boyunca aynı özellikte değildir. Örneğin kalın bağırsakta iki alt katmandan oluşmaktadır. Bunlardan lüminal boşluğa bakan dış katman daha kalın ve gevşek bir mukus tabakası olup çok sayıda bakteri ve bakteri kaynaklı molekül içermektedir. Daha sağlam ve yapışkan bir özellik gösteren iç mukus katmanı ise az sayıda bakteri barındırmaktadır. İnce bağırsaktaki mukus tabakası kalın bağırsaktakinden oldukça farklı olup tek katmanlı ve daha akışkan bir özellik göstermektedir (Usuda ve ark., 2021; Quigley, 2016). Jele benzeyen mukus tabakası, su ve küçük moleküller için geçirgen olduğundan emilim için bir engel teşkil etmez. Ancak patojen mikroorganizmalar dahil, lümen içeriğinin epitel hücrelerle doğrudan temasını engellediğinden fiziksel bir bariyer görevi görmektedir. Ayrıca, antimikrobiyal peptitlerin ve IgA'nın salgılanması ile mukus tabakası antimikrobiyel özellik kazanmaktadır (Chairatana ve Nolan, 2017; Cornick ve ark., 2015).

Bağırsak epiteli; enterositler, enteroendokrin hücreler, Goblet hücreleri ve Paneth hücreleri olmak üzere hepsi bağırsak kriptlerindeki progenitör hücrelerden gelişmiş dört farklı hücre tipinden oluşmaktadır (Capaldo ve ark., 2017). Bunların içinde sindirim ve emilimde en büyük sorumluluğu üstlenen enterositler, çoğunluğu oluşturmaktadır. Enteroendokrin hücreler salgıladıkları hormonlar ile sindirim fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alırken, mukus salgılayan Goblet hücreleri ile antimikrobiyal peptit salgılayan Paneth hücreleri intestinal bariyerin güçlenmesinde görev almaktadır (Cornick ve ark., 2015). Plazma hücreleri tarafından üretilen IgA'nın transsitozu ve lümene salgılanması bu bariyer işlevini daha da güçlendirmektedir. Epitel tabakasının

altındaki lamina propriada bulunan makrofajlar, fagositoz yapıp sitokin salgılayarak doğal bağışıklık yanıtının oluşmasına, dentritik hücreler ise bağırsaktan mezenterik lenf düğümlerine göç edip naif T hücrelerini uyarmak suretiyle adaptif immün yanıtın başlamasına aracılık etmektedir (Chairatana ve Nolan, 2017; Cornick ve ark., 2015).

- **Sıkı bağlantılar**

Epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantılar paraselüler madde geçişinin kontrolüne katılan, boyut ve yük seçiciliği gösteren ve böylece intestinal bariyer geçirgenliğinin belirlenmesinde önemli rol oynayan yapılardır. Sıkı bağlantılar, epitelin apikal yüzeyine yakın bölgede, bitişik hücreleri birbirine bağlayan ve etkileşime giren bir transmembran protein ağından oluşmaktadır. Bu transmembran proteinler arasında klaudin proteinleri, sıkı bağlantılarla ilişkili MARVEL alanı içeren proteinler (tight junction-associated MARVEL domain-containing proteins; TAMPs) ve bağlantısal-adezyon molekülleri (junctional adhesion molecules; JAMs) ile çeşitli sitoplazmik adaptör ve iskele proteinleri bulunmaktadır (Allam-Ndoul ve ark., 2020; Capaldo ve ark., 2017).

Sıkı bağlantıların yapısındaki klaudin proteinlerinin kurduğu cis- ve trans-homofilik etkileşimler, seçici iyon geçirgenliğini sağlayan bir bariyer veya por oluşturduğundan trans-epitelyal transportun ana belirleyicileridir (Tsukita ve ark., 2019). TAMP protein ailesinden okludin, triselülin ve MarvelD3 gibi proteinler, esas olarak hücre zarı boyunca cis-homofilik etkileşimler kurmaktadır. JAM ailesinin membranın bir kez kat eden transmembran üyeleri ise sıkı bağlantıları düzenleyen çok sayıda hücre içi ve hücre dışı moleküler etkileşim kurmaktadır (Allam-Ndoul ve ark., 2020).

Sıkı bağlantı proteinleri, adaptör ve iskele molekülleri aracılığıyla aktin bazlı hücre iskeletine bağlanmaktadır. Zonula oklüdens (ZO) ailesine ait iskele proteinleri (ZO-1, ZO-2 ve ZO-3) bu bağlantılarda rol oynayan multidomainli proteinlerdir. ZO-1, çoğu transmembran sıkı bağlantı proteini (klaudinler, TAMP'ler ve JAM'ler) ve hücre iskeleti bileşenleri arasında bağlantılar kurduğundan, sıkı bağlantı oluşumunu ve hücre polarizasyonunu koordine etmede kritik önemlidir (Capaldo ve ark., 2017; Ikenouchi ve ark., 2007).

Bu kompleks multiprotein yapıları, lümendeki potansiyel olarak zararlı patojenlere ve moleküllere karşı önemli bir bariyer oluşturmaktadır. Sıkı bağlantılar son derece dinamik yapılar olup diyet ve mikrobiyota gibi değişen

çevresel koşullara uyum sağlamak için sürekli olarak yeniden şekillenmektedir (Allam-Ndoul ve ark., 2020; Suzuki, 2020). Bununla birlikte, çevresel ve hücresel olaylar, bağırsak bariyerini kısmen veya tamamen bozarak, bağırsak geçirgenliğinde kronik bir artışa neden olabilmektedir. Bu durumda bariyer zararlı çevresel bileşenlerin sistemik dolaşıma girmesine izin verecektir.

- **Bağırsak mikrobiyotası**

Doğumdan itibaren sindirim kanalını kolonize etmeye başlayan bağırsak mikrobiyotası mantarlar, virüsler ve bakteriler dahil çeşitli mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Yetişkin bağırsak mikrobiyotası 250'den fazla farklı bakteri türünden oluşan, yaklaşık 1013 bakteri hücresini barındırmaktadır (Sender ve ark., 2016). İnsanda intestinal bakteriler esas olarak Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria ve Actinobacteria filumdandır (Rinninella ve ark., 2019; Vieira-Silva ve ark., 2016; Ley ve ark., 2006). Bu kommensal bakteriler doğrudan ve dolaylı mekanizmalar kullanarak intestinal bariyeri güçlendirmektedir (Adak ve Khan, 2019). Örneğin alan ve besin için rekabete girerek patojenik mikroorganizmalar tarafından kolonizasyona doğruda engel olurlar. Ayrıca, toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) başta olmak üzere, çeşitli patojen tanıma reseptörleri kommensal bakteriler tarafından sürekli olarak uyarılmaktadır. Bu yolla mikrobiyota üyeleri goblet hücrelerinden müsin üretimini ve Paneth hücrelerinden antimikrobiyal peptit üretimini sürekli olarak teşvik etmektedir (Cornick ve ark., 2015). Kommensal bakteriler doğal bağışıklık yanıtının yanı sıra adaptif bağışıklık yanıtını da uyarmakta ve böylece IgA üretimini ve anti-inflamatuar faktörlerin ekspresyonu da arttırmaktadır (Hiippala ve ark., 2018). Ayrıca, mikrobiyota üyeleri tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitleri kolonositler için enerji kaynağı (özellikle bütirat) olmaları, sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu ve mukus üretimini düzenleyebilmeleri gibi mekanizmalarla bariyer bütünlüğü ve fonksiyonlarının korunmasına katkıda bulunmaktadır (Chopyk ve Grakoui, 2020).

İNTESTİNAL GEÇİRGENLİĞİ ETKİLEYEN TEMEL FAKTÖRLER

- **Diyet lifi**

İntestinal bariyer fonksiyonunu güçlendirmede diyet liflerinin katkısı dikkat çekicidir. Diyet liflerinde bulunan, konağın sindiremediği ancak mikrobiyotanın rahatlıkla fermente edebildiği kompleks karbonhidratlar bulunmaktadır. Bunlar "mikrobiyotanın erişebildiği karbonhidratlar" (Microbiota-accessible carbohydrates; MACs) olarak adlandırılmaktadır (Camilleri ve ark., 2019). MAC'ların sağlıklı hayvanlara veya intestinal bariyer bütünlüğü bozulmuş hayvanlara verilmesi, sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu arttırarak kolonun bariyer fonksiyonunda iyileşme sağlamaktadır (Monk ve ark., 2017; Hung ve Suzuki, 2016). Diyet içeriğinde MAC bulunması ile fonksiyonel bağırsak bariyerinin korunması arasındaki ilişki, en azından kısmen, lümende kısa zincirli yağ asitlerinin üretimine atfedilmektedir (Makki ve ark., 2018). Kolonositler için birincil enerji kaynağı olmaları yönüyle önem taşıyan kısa zincirli yağ asitleri, epitel hücre proliferasyonu ve mukus salgısında artış gibi farklı mekanizmalarla intestinal bariyer bütünlüğünü korumaktadır (Chen ve ark., 2017; Fukuda ve ark., 2011; Sakata, 1987).

Farklı bakteri türleri, farklı tipte kısa zincirli yağ asitleri üretmektedir. İnsan kolonunda en bol bulunan kısa zincirli yağ asitleri ise yaklaşık 60:20:20 molar oranı ile asetat, propiyonat ve bütirattır (Usuda ve ark., 2021; Morrison ve Preston 2016; Canfora ve ark., 2015). Lümendeki kısa zincirli yağ asitleri taşıyıcı proteinlerle veya basit difüzyonla kolonositler tarafından alınmaktadır. Mikrobiyota tarafından üretilen kısa zincirli yağ asitleri arasında bağırsak epitel bütünlüğüne olan katkısı yönünden bütirat daha önemli gözükmektedir (Usuda ve ark., 2021; Mathewson ve ark., 2016). Bütirat kolonositler için majör enerji kaynağı olmasının yanı sıra klaudin-1 ve ZO-1 gibi sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu, müsin 2 ekspresyonunu ve antibikrobiyel peptit üretimini uyararak da epitelin bariyer fonksiyonunu desteklemektedir (Liang ve ark., 2022; Liu ve ark., 2021; Feng ve ark., 2018a; 2018b; Zhao ve ark., 2018). Yapılan çalışmalar mikrobiyota tarafından üretilen diğer kısa zincirliği yağ asitlerinin de bariyer fonksiyonuna katkısını göstermektedir. Örneğin asetat, intestinal epitel hücrelerinde IL-18 üretimini arttırarak etki ediyor gibi

gözükmektedir. Zira IL-18 knockout farelerin kolite neden olan kimyasallara karşı daha duyarlı oldukları gözlenmiştir (Impellizzeri ve ark., 2018; Sivakumar ve ark., 2002). Farelerde dekstran sülfat sodyum (DSS) ile oluşturulan bir kolit modelinde de propionatın etkisi gösterilmiştir. Bu modelde, artan bağırsak geçirgenliği propiyanat tedavisi ile önemli ölçüde azalmıştır. Propiyanat bu etkisini sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu arttırarak göstermiştir (Tong ve ark., 2016). Yapılan in vitro çalışmalar da asetat, propiyonat ve bütiratın sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu veya dağılımını değiştirerek epiteliyal bariyeri desteklediklerini göstermektedir (Feng ve ark., 2018b).

Yapılan çalışmalar diyetsel lif düzeyinin bağırsaktaki mikrobiyota kompozisyonunu da değiştirebileceğini göstermiştir. Liften yoksun bir diyet mukus glikanlarının tüketilmesine neden olan, müsin parçalayıcı bakteri popülasyonunda artışa neden olmaktadır (Usuda ve ark., 2021; Desai ve ark., 2016). Sonuçta, konağın salgıladığı mukus glikanların mikrobiyal tüketimindeki artış, mukus tabakasının incelmesine neden olmaktadır. Diyetsel lif azalışına bağlı mukozal incelme aynı zamanda mukozal ve sistemik inflamasyon belirteçlerinde artışa neden olmaktadır (Desai ve ark., 2016).

- **Yüksek yağlı diyet**

Doymuş yağ asitlerince zengin batı tarzı diyet tüketimi, insanlarda artmış intestinal permeabilite ile karakterize inflamatuar bağırsak hastalığı (IBH) gelişme riskini arttırmaktadır (Rohr ve ark., 2020; Hou ve ark., 2011; Chapman-Kiddell ve ark., 2010). IBH görülme sıklığı ile ülkelerin sanayileşme düzeyi arasında önemli bir pozitif korelasyon vardır ki sanayileşmiş toplumlardaki diyetler, işlenmiş yağlar ve şekerler açısından daha zengin olma eğilimindedir (Ananthakrishnan, 2015). Yüksek yağlı diyetin etkileri deneysel modellerde de incelenmiştir. Bu çalışmalarda, diyet ayarlaması genel olarak total enerjinin düşük yağlı diyetlerde (kontrol) %8-15'i, yüksek yağlı diyetlerde ya %40-50'si (Batı tarzı diyet modeli) ya da %60-80'i (diyetle indüklenen obezite modeli) yağlardan elde edilecek şekilde ayarlanmaktadır (Hariri ve Thibault, 2010). Yüksek yağlı diyet fare ve sıçanlarda intestinal permeabilite artışına neden olmaktadır. Diyete bağlı bu değişim klaudin-1, klaudin-2, klaudin-3 ve ZO-1 dahil bazı sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonlarındaki azalış ile birliktedir (Mujawdiya ve ark., 2020; Oliveira ve ark., 2019). Yapılan

in vitro çalışmalar, diyet yağlarının hücre içi sinyal yolaklarını değiştirerek etki edebileceğini de göstermiştir. Örneğin tipik bir Batı tarzı diyette yüksek oranda bulunan γ-linolenik asit (18:3, n-6) ve dokosaheksaenoik asit (22:6, n-3) Caco2 hücrelerinde (in vitro enterosit modeli) protein kinaz C aracılı aktin ve sıkı bağlantı proteinlerinin dağılımını değiştirerek permeabilite artışına neden olmaktadır (Usami ve ark., 2003).

Yüksek yağlı diyetle beslenme, bağırsak mikrobiyota kompozisyonunda değişime neden olmaktadır. Örneğin Akkermansia muciniphila (A. muciniphila) yoğunluğu, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde önemli ölçüde azalmaktadır (Everard ve ark., 2013). Dahası bu hayvanlara 4 hafta boyunca yapılan A. muciniphila tedavisi, mukus tabakasının büyümesini stimüle ederek, bariyer fonksiyonundaki bozulmayı azaltmaktadır. Ayrıca, yüksek yağlı diyetin sülfat azaltıcı bakterilerde artışa neden olarak ve kolonositlerde bütirat oksidasyonunu inhibe ederek de bariyer fonksiyonunu bozduğu bildirilmiştir (Camilleri ve ark., 2019; Carbonero ve ark., 2012). Aslında, bağırsak mikrobiyotasının sağlıksız değişimi olarak tanımlanan disbiyoz IBH (Hold ve ark., 2014), nöropsikiyatrik bozukluklar (Grochowska ve ark., 2018), kronik böbrek hastalıkları (Castillo-Rodriguez ve ark., 2018) obezite, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar (Hansen ve ark., 2015) gibi bağırsak geçirgenliğinin yüksek olduğu hastalıklar ile ilişkili bulunmuştur.

Diyet yağı hem safra asidi sentezini hem de safra kesesinde safranın çıkışını uyarmaktadır. Safra asitleri doğrudan yaptıkları etkilerinin yanı sıra, G proteini ile eşleşmiş safra asidi reseptörü (GPBAR1 veya TGR5) aracılığıyla ve farnesoid X reseptörü (FXR) aracılığıyla da etki etmektedir (Fiorucci ve ark., 2009). Bazı safra asitlerinin apoptozu indükleyerek ve sıkı bağlantı proteinlerini değiştirerek bağırsak bariyerini bozabildiği gösterilmiştir (Raimondi ve ark., 2008; Araki ve ark., 2001). Buna karşılık, ursodeoksikolik asit gibi hidrofilik safra asitlerinin oksidatif stres azalışı dahil çeşitli mekanizmalar aracılığı ile bağırsak bariyer bütünlüğünü desteklediği de gösterilmiştir (Perrone ve ark., 2010; Kullmann ve ark., 1997). Deneysel çalışmalar TGR5 ve FXR'nin bağırsak bariyer bütünlüğüne katkıda bulunduğunu göstermektedir (Ding ve ark., 2015; Cipriani ve ark., 2011).

- **Diyet proteini**

Yüksek oranda protein tüketiminin inflamatuar bağırsak hastalığı gelişme riskini arttırdığını gösteren epidemiyolojik kanıtlar vardır (Kakodkar ve ark., 2017). Diyet kompozisyonunun farelerde bağırsak geçirgenliği ve kolit gelişimi üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmada, diyetteki protein artışına paralel olarak intestinal geçirgenlik artışı ile mikrobiyota bağımlı ve bağımsız olarak kolit şiddetinde artış gösterilmiştir (Llewellyn ve ark., 2018). Hayvanlarda ve in vitro koşullarda yapılan çalışmalar, yüksek protein diyetine bağlı hasarın protein fermentasyon ürünlerine bağlı olabileceğini göstermektedir. Zira, protein fermentasyonu son ürünlerinden özellikle H2S, amonyak ve daha az ölçüde fenollerin kolon epitel yapısında ve metabolik fonksiyonlarında bozulma, mukus bariyerinde incelme ve kolon permeabilitesinde artış dahil toksik etkileri gösterilmiştir (Yao ve ark., 2016).

Proteinlerin aksine triptofan ve glutamin gibi bazı amino asitlerin bağırsak bariyerini desteklediği anlaşılmaktadır. Bunlardan glutamin, hayvanlarda ve insanlarda bağırsak bariyer fonksiyonunun sürdürülmesinde görev alan diyetsel bir faktör olarak öne çıkmaktadır. Glutamin eksikliğinin villuslarda atrofiye, sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunda azalışa ve bağırsak geçirgenliğinde artışa neden olduğu, aksine glutamin takviyesinin çeşitli deneysel hasar modellerinde bariyer fonksiyonunda iyileşme sağladığı bildirilmiştir (Achamrah ve ark., 2017). Triptofan her ne kadar sıkı bağlantıları ve intestinal bariyeri desteklese de diyetteki aşırı seviyelerinin olumsuz etkili olabileceği bildirilmiştir (Suzuki, 2020).

- **Diyetsel fruktoz**

Farelerde yapılan bir çalışmada yüksek fruktoz diyetinin sıkı bağlantı proteinlerinde, mukus kalınlığında ve antimikrobiyal protein üretiminde azalışa bağlı olarak bağırsak geçirgenliğini arttırdığı ve LPS translokasyonunda artışa sebep olduğu görülmüştür (Volynets ve ark., 2017). Yüksek düzeyde fruktoz tüketiminin hem doğrudan hem de dolaylı olarak bağırsak geçirgenliğinde artışa neden olduğu ve sistemik endotoksin düzeylerini artırdığı bildirilmiştir (Thuy ve ark., 2008).

- **Alkol**

Etanol ve onun oksidatif metaboliti olan asetaldehitin gastrointestinal epiteldeki etkileri, permeabilite artışına neden olabilmektedir. Alkolün epitel hücrelerinde yaptığı doğrudan hasarın yanı sıra, sıkı bağlantı proteinleri ve adherens bağlantı proteinlerinin ekspresyonunda neden olduğu değişiklikler ile bağırsak mikrobiyota profilinde neden olduğu değişikliklerin bariyer fonksiyonunda bozulmaya ve permeabilite artışına neden olduğu düşünülmektedir (Elamin ve ark., 2013).

- **Vitaminler ve mineraller**

Yağda çözünen vitaminlerden A vitamini ve D vitamininin intestinal bariyer üzerindeki koruyucu etkilerini gösteren çalışmalar vardır (Suzuki, 2020). Örneğin sıçanlarda 4 hafta boyunca A vitamininin diyetten çıkartılması ince bağırsakta ZO-1, okludin ve klaudin-1 gibi sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunda azalmaya ve villus hasarına neden olmuş, A vitamininin yerine konması ise 2 haftanın sonunda bu problemlerin ortadan kalkmasını sağlamıştır (Xiao ve ark., 2019). Benzer şekilde, D vitamini de sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu düzenleyerek etki ediyor gözükmektedir. Örneğin D vitamini uygulaması kolit ve çölyak hastalığı gibi sıkı bağlantıların bozulduğu ve intestinal geçirgenliğin arttığı deneysel modellerde koruyucu etki göstermiştir (Dong ve ark., 2018; Stio ve ark., 2016). D vitamininin diyetten çıkartılması ise deneysel bir kolit modelinde sıkı bağlantılardaki kusurun daha da şiddetli olmasına neden olmuştur (Assa ve ark., 2015).

Çinko bağırsak bariyerini destekleme ve koruma yönünden diğer minerallerin arasında öne çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar yüksek doz çinko takviyesinin, yetersiz beslenme ve kolitin neden olduğu bağırsak bariyer kusurlarını azalttığını göstermektedir (Sturniolo ve ark., 2002; Rodriguez ve ark., 1996).

- **Stres**

Hem preklinik çalışmalar hem de bazı epidemiyolojik veriler, stresi intestinal permeabilite artışı ile ilişkilendirmektedir. Örneğin, sıçanlarda kronik sudan kaçınma stresi sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunda değişime ve bağırsak geçirgenliğinde artışa neden olmaktadır (Zheng et al., 2013).

Yenidoğan fare ve sıçanlarda anneden ayrılma stresi hem akut hem de kronik dönemde bağırsak geçirgenliğini artırmaktadır (Riba ve ark., 2018; Moussaoui ve ark., 2017). İzolasyon stresi ve hareketsizlik stresi gibi diğer stres modellerinde de bağırsak geçirgenliğindeki artış ve sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonundaki değişimler gösterilmiştir (Lauffer ve ark., 2016). İnsanda toplum önünde konuşma gibi akut psikolojik bir stres dahi intestinal geçirgenliği arttırabilmektedir (Vanuytsel ve ark., 2014). Gerçekten de stres gastrointestinal sistem fonksiyonlarını etkileyen, geçirgenliğin yanı sıra huzursuz bağırsak sendromu ve inflamatuar bağırsak hastalığı gibi bozuklukların seyrinde rol oynayan önemli bir faktör olarak görülmektedir (Ilchmann-Diounou ve Menard, 2020; Sgambato ve ark., 2017; Videlock ve ark., 2009).

- **Bağırsak bariyerini etkileyen diğer faktörler**

Yukarıda özetlenen faktörlerin dışında obezite, egzersiz, sigara tüketimi, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar ve yaşlılık gibi pek çok faktörün intestinal bariyer bütünlüğünde bozulmalara neden olabileceğine dair bulgular vardır (Camilleri ve ark., 2019). Bariyer bütünlüğü ve fonksiyonlarını etkileyen faktörler üzerinde yoğun çalışmalar devam etmektedir.

SONUÇ

İntestinal sistem, yaklaşık 250 m2'lik yüzey alanı ile insan vücudunda dış çevre ile temasta olan en geniş yüzeylerden birisidir. Bu sistem diyetle alınan toksinlerden, mikroorganizmalara ve antijenlere kadar pek çok faktör için ilk savunma hattı olup, bu faktörlerin vücuda girişini büyük ölçüde engellemektedir. Ancak sindirim ürünleri, su ve iyonların seçici olarak kana geçişini sağladığından seçici bir bariyer olarak tanımlanmaktadır. İntestinal bariyer, lüminal yüzeyini kaplayan mukus tabakası, onun altındaki epitel hücre tabakası, epitel hücrelerini birbirine bağlayarak paraselüler madde geçişini sınırlayan protein yapılı bağlantı kompleksleri, immün sistem elemanları ve bağırsak mikroflorasından oluşan çok katmanlı bir bariyer sistemidir (Capaldo ve ark., 2017; Cornick ve ark., 2015).

Dinamik bir sistem olan intestinal bariyer lif, yağ, protein, fruktoz, vitaminler, mineraller ve alkol gibi farklı diyet bileşenlerinin yanı sıra stres gibi diyet dışı faktörlerin de etkisiyle yeniden şekillenmekte ve bu durum intestinal

permeabilitenin de değişmesine neden olmaktadır (Camilleri ve ark., 2019). Geçirgenliğin artması mutlaka işlev bozukluğu anlamına gelmese de belirli patolojik koşullar altında, epitel bariyerin kendini yenileme kapasitesinin kaybolması geçirgenliğin giderek artmasına ve intestinal dokunun inflamatuar hasarına neden olabilmektedir. Dahası, geçirgenlik artışı sistemik bir inflamatuar yanıtı da başlatabildiğinden, bu durum kişiyi sadece bağırsak hastalıklarına karşı değil, aynı zamanda sistemik hastalıklara karşı da daha duyarlı hale getirebilmektedir (Usuda ve ark., 2021; Castillo-Rodriguez ve ark., 2018; Grochowska ve ark., 2018; Quigley, 2016; Hansen ve ark., 2015; Hold ve ark., 2014). Bu açıdan bakıldığında intestinal geçirgenlik artışına neden olan faktörlerden uzak durulması hem gastrointestinal sağlık hem de genel sağlık açısından önemli gözükmektedir. Yukarıda bahsedilen faktörlerin bir kısmı intestinal bariyerin korunması ve güçlendirilmesine olan katkıları nedeniyle genel sağlık için faydalı gibi görünse de bu konuda yorum yapılabilmesi için henüz in vivo çalışmalar da klinik çalışmalar da nispeten yetersizdir. Bu alanda detaylı araştırmaların devam etmesi, intestinal bariyerin regülasyonunda terapötik potansiyeli olan faktörlerin kesin olarak tanımlanabilmesi için gereklidir.

KAYNAKÇA

Achamrah, N., Déchelotte, P., & Coëffier, M. (2017). Glutamine and the regulation of intestinal permeability: from bench to bedside. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, *20*(1), 86–91.

Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, *76*(3), 473–493.

Allam-Ndoul, B., Castonguay-Paradis, S., & Veilleux, A. (2020). Gut Microbiota and Intestinal Trans-Epithelial Permeability. *International journal of molecular sciences*, *21*(17), 6402.

Ananthakrishnan A. N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, *12*(4), 205–217.

Araki, Y., Fujiyama, Y., Andoh, A., Nakamura, F., Shimada, M., Takaya, H., & Bamba, T. (2001). Hydrophilic and hydrophobic bile acids exhibit different cytotoxicities through cytolysis, interleukin-8 synthesis and apoptosis in the intestinal epithelial cell lines. IEC-6 and Caco-2 cells. *Scandinavian journal of gastroenterology*, *36*(5), 533–539.

Assa, A., Vong, L., Pinnell, L. J., Rautava, J., Avitzur, N., Johnson-Henry, K. C., & Sherman, P. M. (2015). Vitamin D deficiency predisposes to adherent-invasive Escherichia coli-induced barrier dysfunction and experimental colonic injury. *Inflammatory bowel diseases*, *21*(2), 297–306.

Camilleri, M., Lyle, B. J., Madsen, K. L., Sonnenburg, J., Verbeke, K., & Wu, G. D. (2019). Role for diet in normal gut barrier function: developing guidance within the framework of food-labeling regulations. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, *317*(1), G17–G39.

Canfora, E. E., Jocken, J. W., & Blaak, E. E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature reviews. Endocrinology*, *11*(10), 577–591.

Capaldo, C. T., Powell, D. N., & Kalman, D. (2017). Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, *95*(9), 927–934.

Carbonero, F., Benefiel, A. C., Alizadeh-Ghamsari, A. H., & Gaskins, H. R. (2012). Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease. *Frontiers in physiology*, *3*, 448.

Castillo-Rodriguez, E., Fernandez-Prado, R., Esteras, R., Perez-Gomez, M. V., Gracia-Iguacel, C., Fernandez-Fernandez, B., Kanbay, M., Tejedor, A., Lazaro, A., Ruiz-Ortega, M., Gonzalez-Parra, E., Sanz, A. B., Ortiz, A., & Sanchez-Niño, M. D. (2018). Impact of Altered Intestinal Microbiota on Chronic Kidney Disease Progression. *Toxins*, *10*(7), 300.

Chairatana, P., & Nolan, E. M. (2017). Defensins, lectins, mucins, and secretory immunoglobulin A: microbe-binding biomolecules that contribute to mucosal immunity in the human gut. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *52*(1), 45–56.

Chapman-Kiddell, C. A., Davies, P. S., Gillen, L., & Radford-Smith, G. L. (2010). Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, *16*(1), 137–151.

Chen, T., Kim, C. Y., Kaur, A., Lamothe, L., Shaikh, M., Keshavarzian, A., & Hamaker, B. R. (2017). Dietary fibre-based SCFA mixtures promote both protection and repair of intestinal epithelial barrier function in a Caco-2 cell model. *Food & function*, *8*(3), 1166–1173.

Chopyk, D. M., & Grakoui, A. (2020). Contribution of the Intestinal Microbiome and Gut Barrier to Hepatic Disorders. *Gastroenterology*, *159*(3), 849–863.

Cipriani, S., Mencarelli, A., Chini, M. G., Distrutti, E., Renga, B., Bifulco, G., Baldelli, F., Donini, A., & Fiorucci, S. (2011). The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. *PloS one*, *6*(10), e25637.

Cornick, S., Tawiah, A., & Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue barriers*, *3*(1-2), e982426.

Desai, M. S., Seekatz, A. M., Koropatkin, N. M., Kamada, N., Hickey, C. A., Wolter, M., Pudlo, N. A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V. B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T. S., Núñez, G., & Martens, E. C. (2016). A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*, *167*(5), 1339–1353.e21.

Ding, L., Yang, L., Wang, Z., & Huang, W. (2015). Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, *5*(2), 135–144.

Dong, S., Singh, T. P., Wei, X., Yao, H., & Wang, H. (2018). Protective Effect of 1,25-Dihydroxy Vitamin D3 on Pepsin-Trypsin-Resistant Gliadin-Induced Tight Junction Injuries. *Digestive diseases and sciences*, *63*(1), 92–104.

Elamin, E. E., Masclee, A. A., Dekker, J., & Jonkers, D. M. (2013). Ethanol metabolism and its effects on the intestinal epithelial barrier. *Nutrition reviews*, *71*(7), 483–499.

Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2013). Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(22), 9066–9071.

Feng, W., Wu, Y., Chen, G., Fu, S., Li, B., Huang, B., Wang, D., Wang, W., & Liu, J. (2018b). Sodium Butyrate Attenuates Diarrhea in Weaned Piglets and Promotes Tight Junction Protein Expression in Colon in a GPR109A-Dependent Manner. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, *47*(4), 1617–1629.

Feng, Y., Wang, Y., Wang, P., Huang, Y., & Wang, F. (2018a). Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, *49*(1), 190–205.

Fiorucci, S., Mencarelli, A., Palladino, G., & Cipriani, S. (2009). Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders. *Trends in pharmacological sciences*, *30*(11), 570–580.

Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., & Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, *469*(7331), 543–547.

Grochowska, M., Wojnar, M., & Radkowski, M. (2018). The gut microbiota in neuropsychiatric disorders. *Acta neurobiologiae experimentalis*, *78*(2), 69–81.

Hansen, T. H., Gøbel, R. J., Hansen, T., & Pedersen, O. (2015). The gut microbiome in cardio-metabolic health. *Genome medicine*, *7*(1), 33.

Hariri, N., & Thibault, L. (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews*, *23*(2), 270–299.

Hiippala, K., Jouhten, H., Ronkainen, A., Hartikainen, A., Kainulainen, V., Jalanka, J., & Satokari, R. (2018). The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation. *Nutrients*, *10*(8), 988.

Hold, G. L., Smith, M., Grange, C., Watt, E. R., El-Omar, E. M., & Mukhopadhya, I. (2014). Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World journal of gastroenterology*, *20*(5), 1192–1210.

Hou, J. K., Abraham, B., & El-Serag, H. (2011). Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *The American journal of gastroenterology*, *106*(4), 563–573.

Hung, T. V., & Suzuki, T. (2016). Dietary Fermentable Fiber Reduces Intestinal Barrier Defects and Inflammation in Colitic Mice. *The Journal of nutrition*, *146*(10), 1970–1979.

Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., & Tsukita, S. (2007). Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *The Journal of cell biology*, *176*(6), 779–786.

Ilchmann-Diounou, H., & Menard, S. (2020). Psychological Stress, Intestinal Barrier Dysfunctions, and Autoimmune Disorders: An Overview. *Frontiers in immunology*, *11*, 1823.

Impellizzeri, D., Siracusa, R., Cordaro, M., Peritore, A. F., Gugliandolo, E., Mancuso, G., Midiri, A., Di Paola, R., & Cuzzocrea, S. (2018). Therapeutic potential of dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS)-induced colitis in mice by targeting IL-1β and IL-18. *Biochemical pharmacology*, *155*, 150–161.

Kakodkar, S., & Mutlu, E. A. (2017). Diet as a Therapeutic Option for Adult Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology clinics of North America*, *46*(4), 745–767.

Kullmann, F., Arndt, H., Gross, V., Rüschoff, J., & Schölmerich, J. (1997). Beneficial effect of ursodeoxycholic acid on mucosal damage in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *European journal of gastroenterology & hepatology*, *9*(12), 1205–1211.

Lauffer, A., Vanuytsel, T., Vanormelingen, C., Vanheel, H., Salim Rasoel, S., Tóth, J., Tack, J., Fornari, F., & Farré, R. (2016). Subacute stress and chronic stress interact to decrease intestinal barrier function in rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, *19*(2), 225–234.

Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, *124*(4), 837–848.

Liang, L., Liu, L., Zhou, W., Yang, C., Mai, G., Li, H., & Chen, Y. (2022). Gut microbiota-derived butyrate regulates gut mucus barrier repair by activating the macrophage/WNT/ERK signaling pathway. *Clinical science (London, England: 1979)*, *136*(4), 291–307.

Liu, P., Wang, Y., Yang, G., Zhang, Q., Meng, L., Xin, Y., & Jiang, X. (2021). The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis. *Pharmacological research*, *165*, 105420.

Llewellyn, S. R., Britton, G. J., Contijoch, E. J., Vennaro, O. H., Mortha, A., Colombel, J. F., Grinspan, A., Clemente, J. C., Merad, M., & Faith, J. J. (2018). Interactions Between Diet and the Intestinal Microbiota Alter Intestinal Permeability and Colitis Severity in Mice. *Gastroenterology*, *154*(4), 1037–1046.e2.

Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell host & microbe*, *23*(6), 705–715.

Mathewson, N. D., Jenq, R., Mathew, A. V., Koenigsknecht, M., Hanash, A., Toubai, T., Oravecz-Wilson, K., Wu, S. R., Sun, Y., Rossi, C., Fujiwara, H., Byun, J., Shono, Y., Lindemans, C., Calafiore, M., Schmidt, T. M., Honda, K., Young, V. B., Pennathur, S., van den Brink, M., & Reddy, P. (2016). Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease. *Nature immunology*, *17*(5), 505–513.

Monk, J. M., Lepp, D., Wu, W., Pauls, K. P., Robinson, L. E., & Power, K. A. (2017). Navy and black bean supplementation primes the colonic mucosal microenvironment to improve gut health. *The Journal of nutritional biochemistry*, *49*, 89–100.

Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut microbes*, *7*(3), 189–200.

Moussaoui, N., Jacobs, J. P., Larauche, M., Biraud, M., Million, M., Mayer, E., & Taché, Y. (2017). Chronic Early-life Stress in Rat Pups Alters Basal Corticosterone, Intestinal Permeability, and Fecal Microbiota at Weaning: Influence of Sex. *Journal of neurogastroenterology and motility*, *23*(1), 135–143.

Mujawdiya, P. K., Sharma, P., Sharad, S., & Kapur, S. (2020). Reversal of Increase in Intestinal Permeability by *Mangifera indica* Seed Kernel Extract in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, *13*(8), 190.

Oliveira, R. B., Canuto, L. P., & Collares-Buzato, C. B. (2019). Intestinal luminal content from high-fat-fed prediabetic mice changes epithelial barrier function in vitro. *Life sciences*, *216*, 10–21.

Perrone, E. E., Chen, C., Longshore, S. W., Okezie, O., Warner, B. W., Sun, C. C., Alaish, S. M., & Strauch, E. D. (2010). Dietary bile acid supplementation improves intestinal integrity and survival in a murine model. *Journal of pediatric surgery*, *45*(6), 1256–1265.

Quigley E. M. (2016). Leaky gut - concept or clinical entity? *Current opinion in gastroenterology*, *32*(2), 74–79.

Raimondi, F., Santoro, P., Barone, M. V., Pappacoda, S., Barretta, M. L., Nanayakkara, M., Apicella, C., Capasso, L., & Paludetto, R. (2008). Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, *294*(4), G906–G913.

Riba, A., Olier, M., Lacroix-Lamandé, S., Lencina, C., Bacquié, V., Harkat, C., Van Langendonck, N., Gillet, M., Cartier, C., Baron, M., Sommer, C., Mallet, V., Zill, M., Robert, H., Laurent, F., Ellero-Simatos, S., Théodorou, V., & Ménard,

S. (2018). Early life stress in mice is a suitable model for Irritable Bowel Syndrome but does not predispose to colitis nor increase susceptibility to enteric infections. *Brain, behavior, and immunity*, *73*, 403–415.

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, *7*(1), 14.

Rodriguez, P., Darmon, N., Chappuis, P., Candalh, C., Blaton, M. A., Bouchaud, C., & Heyman, M. (1996). Intestinal paracellular permeability during malnutrition in guinea pigs: effect of high dietary zinc. *Gut*, *39*(3), 416–422.

Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A., & Parthasarathy, S. (2020). Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, *11*(1), 77–91.

Sakata T. (1987). Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *The British journal of nutrition*, *58*(1), 95–103.

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology*, *14*(8), e1002533.

Sgambato, D., Miranda, A., Ranaldo, R., Federico, A., & Romano, M. (2017). The Role of Stress in Inflammatory Bowel Diseases. *Current pharmaceutical design*, *23*(27), 3997–4002.

Sivakumar, P. V., Westrich, G. M., Kanaly, S., Garka, K., Born, T. L., Derry, J. M., & Viney, J. L. (2002). Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut*, *50*(6), 812–820.

Stio, M., Retico, L., Annese, V., & Bonanomi, A. G. (2016). Vitamin D regulates the tight-junction protein expression in active ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, *51*(10), 1193–1199.

Sturniolo, G. C., Fries, W., Mazzon, E., Di Leo, V., Barollo, M., & D'inca, R. (2002). Effect of zinc supplementation on intestinal permeability in experimental colitis. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, *139*(5), 311–315.

Suzuki T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, *91*(1), e13357.

Thuy, S., Ladurner, R., Volynets, V., Wagner, S., Strahl, S., Königsrainer, A., Maier, K. P., Bischoff, S. C., & Bergheim, I. (2008). Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen

activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *The Journal of nutrition*, *138*(8), 1452–1455.

Tong, L. C., Wang, Y., Wang, Z. B., Liu, W. Y., Sun, S., Li, L., Su, D. F., & Zhang, L. C. (2016). Propionate Ameliorates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis by Improving Intestinal Barrier Function and Reducing Inflammation and Oxidative Stress. *Frontiers in pharmacology*, *7*, 253.

Tsukita, S., Tanaka, H., & Tamura, A. (2019). The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends in biochemical sciences*, *44*(2), 141–152.

Usami, M., Komurasaki, T., Hanada, A., Kinoshita, K., & Ohata, A. (2003). Effect of gamma-linolenic acid or docosahexaenoic acid on tight junction permeability in intestinal monolayer cells and their mechanism by protein kinase C activation and/or eicosanoid formation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *19*(2), 150–156.

Usuda, H., Okamoto, T., & Wada, K. (2021). Leaky Gut: Effect of Dietary Fiber and Fats on Microbiome and Intestinal Barrier. *International journal of molecular sciences*, *22*(14), 7613.

Vanuytsel, T., van Wanrooy, S., Vanheel, H., Vanormelingen, C., Verschueren, S., Houben, E., Salim Rasoel, S., Tóth, J., Holvoet, L., Farré, R., Van Oudenhove, L., Boeckxstaens, G., Verbeke, K., & Tack, J. (2014). Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut*, *63*(8), 1293–1299.

Videlock, E. J., Adeyemo, M., Licudine, A., Hirano, M., Ohning, G., Mayer, M., Mayer, E. A., & Chang, L. (2009). Childhood trauma is associated with hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, *137*(6), 1954–1962.

Vieira-Silva, S., Falony, G., Darzi, Y., Lima-Mendez, G., Garcia Yunta, R., Okuda, S., Vandeputte, D., Valles-Colomer, M., Hildebrand, F., Chaffron, S., & Raes, J. (2016). Species-function relationships shape ecological properties of the human gut microbiome. *Nature microbiology*, *1*(8), 16088.

Volynets, V., Louis, S., Pretz, D., Lang, L., Ostaff, M. J., Wehkamp, J., & Bischoff, S. C. (2017). Intestinal Barrier Function and the Gut Microbiome Are Differentially Affected in Mice Fed a Western-Style Diet or Drinking Water Supplemented with Fructose. *The Journal of nutrition*, *147*(5), 770–780.

Xiao, L., Cui, T., Liu, S., Chen, B., Wang, Y., Yang, T., Li, T., & Chen, J. (2019). Vitamin A supplementation improves the intestinal mucosal barrier and facilitates the expression of tight junction proteins in rats with diarrhea. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *57*, 97–108.

Yao, C. K., Muir, J. G., & Gibson, P. R. (2016). Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *43*(2), 181–196.

Zhao, Y., Chen, F., Wu, W., Sun, M., Bilotta, A. J., Yao, S., Xiao, Y., Huang, X., Eaves-Pyles, T. D., Golovko, G., Fofanov, Y., D'Souza, W., Zhao, Q., Liu, Z., & Cong, Y. (2018). GPR43 mediates microbiota metabolite SCFA regulation of antimicrobial peptide expression in intestinal epithelial cells via activation of mTOR and STAT3. *Mucosal immunology*, *11*(3), 752–762.

Zheng, G., Wu, S. P., Hu, Y., Smith, D. E., Wiley, J. W., & Hong, S. (2013). Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, *25*(2), e127–e139.

BÖLÜM 7

CESTOD LARVALARI İLE OLAN ENFEKSİYONLAR

Doç. Dr. Ülkü KARAMAN[1]
Doç. Dr. Necati ÖZPINAR[2]

[1]Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu/Türkiye. ulkukaraman44@hotmail.com, Orcid ID: 0000-0001-7027-1613
[2]Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Acil Yardım Afet Yönetimi Bölümü, Hatay/Türkiye. necatiozpinar@gmail.com, Orcid ID: 0000-0002-7317-885X

GİRİŞ

Cestodların vücutları segmentli ve yassı olup vücut boşlukları, dolaşım ve solunum sistemleri ile sindirim sistemleri bulunmaz. Hermofrodit olan bu parazitlerin büyüklüyü 3mm ile yaklaşık 15 metre arasındadır. Besinlerini ozmozla aln parazitte vücut, Skoleks (Baş), Proliferasyon bölgesi (Boyun) ve strobiladan (Gövde) oluşur. Strobila da segmentlerden (proglottid, halka) meydana gelmiştir. Yumurtaları oval, çift çeperli, yumurtlandığı sırada bazı türlerin içlerinde 3 çift çengelli embriyo (larva, onkosfer) bulunur bazı türlerde dış ortamda gelişir. Her birinin yumurtası kendine özgü olup *Diphyllobothrium latum* yumurtası kapaklıdır.

Sestodların erişkin veya larvalarının parazitlenmesine ve hastalık oluşturmasına cestodiosis denir. Bazı sestodların larvaları insanda enfeksiyona neden olabilirler. İnsanlara yerlerşen sestod larvaları çoğunlukla dokulara yerleşir ve patolojik etkiye neden olurlar. İnsanda enfensiyona neden olan sestod larvaları cyclophylidea ve pseudophylidea olarak iki grupta incelenir.

a) ***Cyclophyllidea***

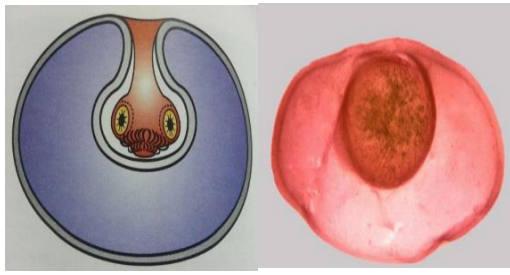
1) Cysticercus , 2) Coenurus , 3) Hidatik kist, 4) Strobilocercus,
5) Cysticercoid

b) ***Pseudophyllidea***

1) Coracidium, 2) Procercoid, 3) Plerocercoid

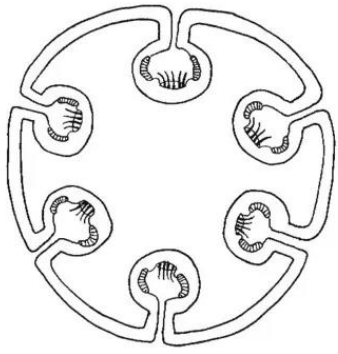
a) **Cyclophyllidea larvaları**

1. ***Cysticercus:*** İnce eperli, suyla dolu küçük bir kese ve içinde invagine tek scolex'ten oluşan larvadır (0,5-1 cm). Taenia cinsindeki türlerde bu larva türü bulunur (Şekil 1). **Örneğin:** *Taenia saginata* adlı tenyanın erişini insan-barsaklarına yerleşir. Larvasına Cysticercus bovis denir sığırların kaslarına yerleşir (Garsia ve ark, 2020).



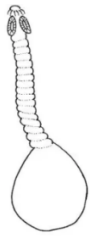
Şekil 1. Cysticercus larvası
(http://www.examnnotes.com/Microbiology/Taenia%20solium.html
https://www.chegg.com/flashcards/biom-441-lab-cestodes-cfcaddc7-59b3-4a19-bc10-11f5794f5e21/deck)

2. ***Coenurus:*** İnce çeperli, içi su ile dolu, büyücek kese olup (ceviz/tavuk yumurtası büyüklüğünde) içinde çok sayıda invagine scolex bulunur. Scolexlerin hiçbiri kist sıvısının içine dökülez hepsi çimlenme zarına tutulu halde bulunur. Kese içinde kız kistlere rastlanılmaz (Şekil 2). **Örneğin:** Erişkini köpeklerin ince bağırsağına yerleşen *Multiceps multiceps* 'in larvasına coenurus cerebralis denir**.** Genellikle sığırların beyinlerine yerleşir (Varcasia ve ark, 2022).



Şekil 2. Coenurus larvası
(https://veteriankey.com/platyhelminthes-flatworms/)

3. ***Strobilocercus:*** İnvagine olmamış bir scolex ve henüz döllenme organları gelişmemiş halkalar (strobila) taşıyan larva formudur.
Örneğin: *Taenia taeniaeformis'*in larvası (Hutchison, 1959)



Şekil 3. Strobilocercus larvası
(https://veteriankey.com/platyhelminthes-flatworms/)

4. ***Hidatik kist:*** (Echinococcus) Su ile dolu ve çapı 20-25 cm'ye ulaşabilen bir kesedir. Çeperi biri lamelli tabaka, diğeri ise çimlenme yeteneğinde ki tabakalardan oluşmuştur. Kist sıvısı içerisine protoscolexler dökülerek hidatik kumu oluştururlar. Kistin içerisinde kız kistler ve bunlar içinde protosolexler oluşur. Bu tabakadan yüzbinlerce invagine scolex (protoscolex) meydana gelir. ***Ör:*** Erişkinleri köpeklerin ince barsaklarına yaşayan *Echinococcus granulosus*'un larvasına hidatik kist denip memelilerin karaciğer, akciğer ve diğer organlarına yerleşir (Eryıldız, 2010).



Şekil 4. Echinococcus larvası; 1: konağın fibröz dokusu, 2: kistin germinal mebranı, 3: kist sıvısı, 4: kız kistler, 5: anne-kız kistler, 6: hidatik kum (protoscolexler)
(https://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0006/109986/hydatids-you-too-can-be-affected.pdf)

5. ***Cysticercoid:*** Büyük, invagine scolex ve kesesi bulunmayan kuyruk taşıyan larva formudur. Cercocystis (kuyruklu) ve cryptocystis (kuyruksuz) formları vardır. *Ör:* Erişkini köpeklerin ince bağırsaklarında

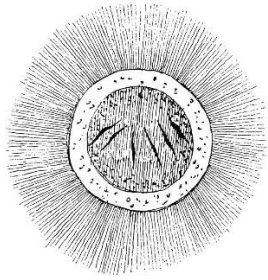
yaşayan *Dipylidium caninum'*un larvasına cysticercoid denir ve pire ve bitlerde gelişir (Turgay ve Sönmez Tamer, 2007)



Şekil 5. Cysticercoid larva (https://quizlet.com/1846llobothriosis70095/eemb-111-parasitology-cyclophyllidea-flash-cards/)

b) **Pseudophyllidea larvaları** (Özbilgin ve Öztan, 2007; Le Bailly ve Bourchet, 2013; Yoneva ve ark, 2014; Durani ve ark, 2022)

1. **Cor*acidium:*** **S**uda serbest yüzebilen, kirpikli, 3 çift çengelli larvadır.



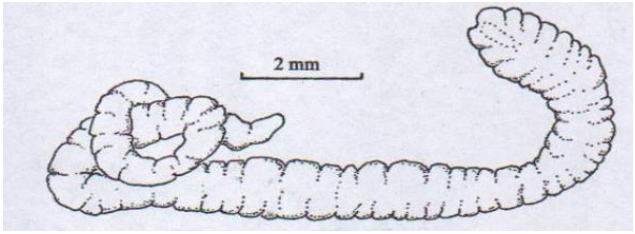
Şekil 6. Corasidium larva (https://www.dreamstime.com/illustration/diphyllobothrium.html)

2. ***Procercoid:*** Coracidium'dan sonraki larva formu olup Coracidium'un girdiği kabukluda aldığı formdur. Tek parça, uzunca olup, posteriorunda boğumla ayrılmış, 3 çift çengel taşıyan yuvarlak bir baş kımsı taşır. Önde cephalic invaginasyon bulnur.



Şekil 7. Procercoid larva (https://uomustansiriyah.edu.iq/media/lectures/2/2_2020_02_18!05_03_15_PM.pdf)

3. ***Plerocercoid:*** Uzun, tek parça, ön ucunda yetişkine benzer 2 bothria taşır. Embriyonik çengeller bu larva formunda bulunmaz.
   Örneğin*:* Erişkini köpeklerin ince bağırsaklarında yaşayan *Diphyllobothrium latum*'un Procercoid larvaları kabuklunun vücut boşluğunda Plerocercoid larvası da tatlı su balıklarının kan ve diğer organlarında bulunur.



Şekil 8. Plerocercoid larva (https://uomustansiriyah.edu.iq/media/lectures/2/2_2020_02_18!05_03_15_PM.pdf)

CESTOD LARVALARI İLE OLUŞAN ENFEKSİYONLAR

İnsanlarda cestod larvalarının neden olduğu enfeksiyonlar 4 başlık altında incelenebilir.

1. Cycticercocis, 2. Echinococcosis, 3. Coenurosis, 4. Sparganosis

1. Cycticercocis

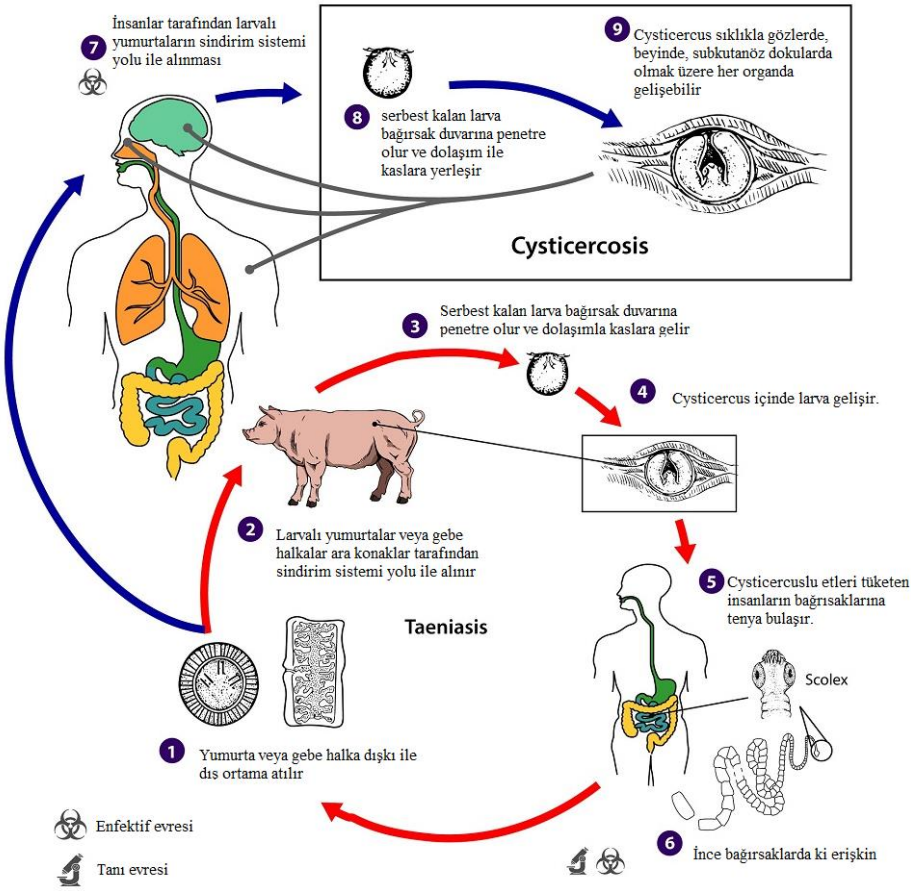
*Taenia solium'*un erişkini ince bağırsaklara larvası da insanın değişik organlarına yerleşir. İnsan bu parazit için hem ara konak hem de son konak olurken domuz arakonaktır. Larvasına Cysticercus cellulosae denir. Larvanın insanın değişik organlarında yerleşmesi sonucu oluşan ve değişik patolojik bozukluklara

neden olmasına cycticercosis denir (Garcia ve ark, 2003;Turgay ve Yolasığmaz, 2007).

Aristo Cysticercus'ların hayvanlar arasında sadece domuzlarda görüldüğünü belirtmiştir. Canlı organizmalar oldukları ise 17. ve 18. yüzyıllarda anlaşılmış olup 19. yüzyılda Taenia'ların larval evreleri oldukları saptanmıştır. Hindistan, Doğu Avrupa, Orta ve Güney Amerika'da görülmektedir. Yurdumuzda İmroz Adasında görüldüğü bildirilmiştir. Parazit sıklıkla insan ve domuz da nadir olarak da sıçan, köpek, koyun ve kedide görülür (Turgay ve Yolasığmaz, 2007; Garcia ve ark, 2020)

Enfeksiyon kaynağı Taeniosis'li insanlar olup hastalığın görülme sıklığında cinsiyetin ve yaşın bir rolü yoktur. Parazit her yaştaki insanı enfekte edebilir (Garcia ve ark, 2020).

Bulaşım yumurtaların kirli eller, su veya yiyecekler ile alınmasıyla, otoinfeksiyonla ve iç bulaşmayla gerçekleşir. Taenia yumurtasının alınımından sonra yumurta içinden çıkan larva jejinum, mezenter ven veya lenf damarlarını delerek kan dolaşımına geçerler. Kan yoluyla beyine, retinaya, deri altına, kalp kası ve çizgili kaslara yerleşerek gelişir ve cysticercusa dönüşür (Şekil 9). Yerleştiği yere göre nörocycticercosis, oftalmik cycticercosis, subkutanöz cycticercosis, ve muscular cycticercosis olarak adlandırılırlar. Kliniği vücutta yerleşen larva sayısına göre asemptomatik seyredebildiği gibi ağır bir enfeksiyon olarak da kendini gösterebilir (Sarti ve ark, 1992; Zimic ve ark, 2012).



Şekil 9. *Taenia solium* evrim döngüsü
(https://www.cdc.gov/dpdx/cysticercosis/modules/Cysticercosis_LifeCycle_lg.jpg)

Kas tutuluşları: Kasta yerleşen larva sayısı fazla olduğunda miyozit ve eozinofili ile birlikte kaslarda şişlik, atrofi ve fibröz gelişebilir. Asemptomatik olabildiği gibi kaslarda şiddetli ağrılara da neden olabilir. Bildirilen cysticercosis olgularının %7sini oluşturmaktadır (Turgay ve Yolasığmaz, 2007)

Deri altı tutuluşları: Deri altında bezelye büyüklüğünde ağrısız, hareketli bir veya çok sayıda nodül oluşturmaktadır. Lipom ile karıştırılabilir. Çıkarılan materyalin incelenmesi sonucu tanı konulabilir (Turgay ve Yolasığmaz, 2007).

Göz tutuluşları: gözde genellikle retina tabakasına, ön ve arka kameraya yerleşebilir. Hastada ekzoftalmi, şaşılık, göz kapaklarında ve konjunktiva da ağrılar, göz hareketlerinin yavaşlaması, iritis, baş ağrıları ve hızlı gelişen görme bozuklukları görülebilir. Göze yerleşen cycticercuslar oftalmoskopla görülebilir (Gurha ve ark, 1999).

Sinir sistemi tutuluşları: İnsan vakalarının %60'ında görülür. Larva ependim veya meninkslerdeki küçük damalara yerleşerek cycticercusa veya cycticercus rasemosea dönüşür. Cycticercus rasemose üzüm salkımına benzeyen kistik bir yapıdır. Yerleşim yerine ve yerleşen parazit sayısına göre farklı klinik tabloya neden olur. Baş ağrısı, baş dönmesi ve kusma sık görülür. Daha nadirende afazi ve epileptik krizler ortaya çıkmaktadır (Bustos ve ark, 2016).

Tanı parazitin yerleştiğine göre değişir. Larva cerrahi olarak çıkartılıp larvanın mikroskopta incelenmesi ile tanıya gidilebilir. Ayrıca biyopsi yapılmadığı durumlarda serolojik ve radyolojik yöntemlerden yararlanılır. Tanıda tomografi, manyetik rasonans, lezyonların görülmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir (Rodriguez ve ark, 2012).

Tedavisi bulunduğu bölgeye göre değişir. Cerrahi veya medikal tedaviden yararlanılır. Albendazol medikal tedavide sıklıkla tercih edilir (Garcia ve ark, 2016).

Parazitten korunmak için enfeksiyonlu insanların bulunup tedavi edilmesi gerekir. Ayrıca parazitin bulaşımı ve korunma yöntemleri ile ilgili halk sağlığı eğitimleri yapılmalıdır. Hijyen kuralları ve yiyeceklerin temizliği bulaşımın önlemesinde önemlidir. Domuz etlerinin kontrolü yapıldıktan sonra satışının gerçekleştirilmesi sağlanmalıdır (Turgay ve Yolasığmaz, 2007).

2. Echinococcosis

Larvalarının insanda enfeksiyona neden olan türleri *Echinococcus granulosus, Echinococcus multilocularis, Echinococcus oligarthus* ve *Echinococcus vogeli*'dir. Sestodların genel özelliklerini gösterirler. *Echinococcus granulosus*'un larval şeklinin insanda ve diğer ara konaklarda yaptığı hastalığa kistik echinococcosis veya kist hidatik adı verilir. *Echinococcus multilocularis*'in larvası alveolar echinococcosise, *Echinococcus oligarthus* polikistik forma ve

Echinococcus vogeli da unikistik forma neden olur (Özbilgin ve Kilimcioğlu, 2007).

Echinococcus granulosus

Echinococus granulosus 1695 yılında Hartmann tarafından köpeklerde tespit edilmiş olup Hipokrat zamanından beri larvası bilinmektedir. Parazitin larvası köpek ve köpekgillerin ince bağırsağında yerleşir. Larvası insanlarda ve koyun, sığır gibi otçul hayvanların karaciğer, akciğer ve diğer organlarında kist hidatik hastalığına neden olur (Özbilgin ve Kilimcioğlu, 2007; Eryıldız, 2010).

Erişkin parazitin boyu 2-11mm, eni en çok 0.6 mm olup vücudu baş (skolex) boyun ve halkalardan oluşmuştur. Başta çengelleri ve çekmenleri bulunur ve gövde 3-4 halkadan oluşmuştur. Halkalar genç, olgun ve gebe olarak adlandırılır. Gebe halkada genital organlar körelmiş olup uterus halka boyunca uzanır ve kısa yan dallar verir. Bu dalların her biri kör olarak sonlanır. Uterusun içinde 200-800 arası yumurta bulunabilir. Gebe halka koparak dışkı ile dış ortama atılır. Dış ortamda parçalanan halkadan larvalı yumurtalar çevreye yayılır.

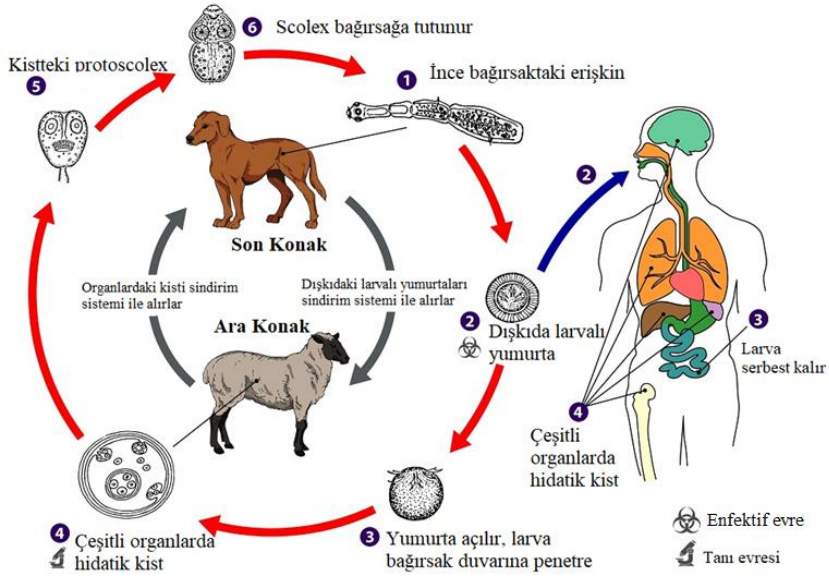
Parazitin yumurtası oval ve yaklaşık 32-36/25-30µm dur. İçinde 3 çift çengelli onkosfer olan yumurta kahverenkli çift çeperli ve ışınsal çizgili görünümdedir ve ışık mikroskobunda taenia yumurtaları ile karışabilir. Yumurtaların dış ortamda düşük ısıda yaklaşık 2.5 yıl canlı kalabilir (Özbilgin ve Kilimcioğlu, 2007; Ertürk ve ark, 2021).

Larvalı yumurtalar ara konaklar tarafından sıklıkla sindirim sistemi yolu ile alınır. Mide ve ince bağırsaklarda serbest kalan onkosfer bağırsak mukozasından geçerek mezenterik dolaşım ile portal ven yoluyla karaciğere gelir. Parazitin toksik etkisi ile karaciğer hücrelerinde lizise neden olur. Embriyon yaklaşık 14 gün içinde kese şeklini alır. Kesenin iç kısmında fibroblast ve lökositler dış kısmında dejenere olan karaciğer hücreleri ve kan damarları bulunur. Yaklaşık 21 günden sonra kesenin içinde sıvı birikmeye başlayarak katmanlar oluşur. Kist hidatik uniloküler bir kist olup içinde kist sıvısı (kaya suyu) bulunur. Kistin iç tabakasında aseksüel tomurcuklanma yolu ile çimlenme kapsüllerini meydana getiren germinal tabaka, dışta elastik fakat dayanıklı hücresiz bir laminar tabaka bulunur. En dışta konak dokusu tarafından oluşturulan fibröz adventisiyal tabaka vardır (Şekil 10). Karaciğerde yerleşemeyen larvalar akciğerlere, kalbe ve dolaşım yoluyla çeşitli

organlara yerleşebilir (Thompson ve Lymbery, 1988; Eckert ve Deplazes, 2004; Ertürk ve ark, 2021).

E. granulosus'un bulaşım şekli, korunma yolları, tehlikesi gibi konularda insanların yeterince bilgi sahibi olmamaları, Sosyo-ekonomik yetersizlikler, kasaplık hayvanların denetimden uzak, gelişigüzel yerlerde bilgisizce kesilmesi, yeterli sayıda ve gerekli koşullarda mezbahaların bulunmaması ve kesilen ya da ölen hayvanlara ait kistli organların köpeklere yedirilmesi epidemiyolojisini etkilemektedir (Eryıldız, 2010).

E. granulosus'un yayılışı son konak ve ara konaklara, evcil hayvanlar ile yırtıcılar arasındaki ilişkilere, insanların kültürel ve sosyo-ekonomik düzeylere göre ve iklim koşullarına göre değişiklik göstermektedir. Parazit İskandinav ülkelerinin batı kesimleri, Kanada, Alaska, eski Sovyetler Birliği ülkeleri, Avrupa'nın Akdeniz'e kıyısı olan İspanya, İtalya, Yugoslavya, Yunanistan, Türkiye, Polonya, Macaristan, Ukrayna, İngiltere ve İrlanda gibi Batı Avrupa ülkelerinde rastlanılmaktadır (Eryıldız, 2010; Ertürk ve ark, 2021).



Şekil 10. *E. granulosus*'un evrim döngüsü (https://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/modules/Echinococcus_gran_LifeCycle_lg.jpg)

Parazitin bulaşımında sindirim sistemi yolu ile alınmasından farklı yollarda bulunmaktadır. Bir köpeğin enfeksiyonu bulaştırması için bağırsağında *E. granulosus*'un bulunması şart olmayıp enfekte köpeğin anüsünü koklarken yumurtaları burnuna ve tüylerine bulaştırması sonucu bunları okşama sırasında insanı enfekte etmesi de söz konusudur. Diğer bir bulaşım şekli ise solunum yoluyladır. Nadir de olsa kan yoluyla bulaşma görülebilir. Vücudun herhangi bir yerindeki kesik veya yaradan bulaşabildiği gibi, köpeğin ısırması ve ısırılan yerden yumurtanın girmesiyle de gerçekleşebilir. Transplasental bulaşımın da olabileceği bildirilmiştir (Eryıldız, 2010; Ertürk ve ark, 2021).

Parazit 5-10mm çapına yaklaşık olarak 5 ayda gelir. Büyüme 10-20 yıl devam eder. Kistin büyüklüğü arttıkça çevresindeki dokulara bası yaparak atrofiye neden olabilir. İnsanda hidatik kist genellikle tek olup primer kist denir. Primer kistler fertildirler. Yani içlerinde protoskoleksler bulunur. Kist duvarının faklı sebeplerle perfore olması sonucu anaflaktik reaksiyon gelişebilir ve konak ölebilir. Eğer bu perforasyon sonucu konak ölmezse konakta çevreye yayılan çevre doku ve organlara dağılması veya kan yoluyla değişik organlara taşınan yavru veziküller ve protoskoleksler sekonder kistler oluşur. Ayrıca sekonder kistlere operasyon esnasında iatrojenik sebeplerle kistin perforasyonu sonucu da oluşabilir. Kist hidatik uzun yıllar hiçbir belirti vermeden gelişimini devam edebilir. Klinik belirtiler iki grupta toplanabilir (Özbilgin ve Kilimcioğlu, 2007; Ertürk ve ark, 2021);

Genel belirtiler: Genel olarak helmintiyazlarda görülebilen generalize ürtiker, eozinofili ve çocuklardaki gelişme geriliği gözlenebilir.

Özel Belirtiler: Kistin bulunduğu organa ait belirtiler gözlenir. Kist bulunduğu organlarda büyüyerek mekanik hasara neden olur. Kemik kist hidatiği sıklıkla omurga ve iliak kemiklerde görülür. Kemik ağrılarına ve kemiğin küçük bir travma ile kendiliğinden kırılmasına yol açabilir. Karaciğerde parankime yerleşenlere tümöral tip, safra kanallarındaki kistlere bilier tip kist hidatik denilir. Hastalarda uzun yıllar bulantı, kusma ve bazen krizler şeklinde gelen karın ağrılarına neden olabilir. Kistlerin neden olduğu en önemli komplikasyonlar; komşu organlara mekanik baskı, perforasyon ve kistin bakteriyel enfeksiyonudur. Safra yollarında basıya bağlı tıkanma sarılığı ve portal hipertansiyon oluşabilir. Parazit yavaş geliştiği için tanı geç konulur. Hastada quincke ödemi, ürtiker, sürekli devam eden öksürük, hemoptizi ve astım tipinde dispne gibi belirtiler

görülebilir. Karaciğerdeki bir kist akciğerde sekonder kistlerin oluşumuna neden olabilir. Akciğerdeki kistler de bazen küçük bir travma ile perfore olur ve bronşlara açılabilir; bu durumda hasta sürekli öksürükle kist sıvısını ve paraziter artıkları ağızdan çıkarabilir ve hastada anaflaktik şok gelişebilir (Özbilgin ve Kilimcioğlu, 2007; Ertürk ve ark, 2021).

Parazit tedavi edilmediği durumlarda birkaç yıl içinde parazit ölebilir bu durumda sıvı kaybolur ve yeni bir doku gelişir. Ya da kist çeperi bakteriler tarafından sarılırak parazitin beslenmesini güçleştirir ve kist ölür. Kist enfekte de olabilir ve kendiliğinden drene de olabilir. Bazı durumlarda travma ile büyük ve ince çeperli kistler perfore olur ve anafilaktik şok gelişebilir veya sekonder kist oluşabilir (McManus ve ark, 1999).

Parazitin klinik bulguları ve hastanın anemnezi ile tanısı konulabilir. Ancak kesin tanı laboratuvar incelemeleriyle olur. Kist hidatiğin sıklıkla görüldüğü yerlerde, eozinofili ile birlikte tümör benzeri yavaş büyüyen kitle tanıda yol göstericidir. Laboratuvar tanısında serolojik yöntemler (IHA, IFAT, ELISA) kullanılır. Görüntüleme yöntemleri içinde ultrasonografi önceliklidir. Tedavisinde cerrahi ve medikal yöntemler kullanılmaktadır (Thompson ve Lymbery, 1988).

Korunmada köpeklerin taranarak enfeksiyon tespit edilenlerin tedavisinin yapılması gerekir. Yine hayvan kesim yerlerinin veteriner hekim kontrolünde olması, kaçak kesimlerin önlenmesi, mezbahalarda kesim sonrası kist hidatikli organların tamamen imha edilmesi ve özellikle kırsal kesimde ölen koyun vb. hayvanların cesetlerinin veya organlarının imha edilmesi önemlidir. Kurban kesimlerinde kistli organların köpeklere verilmesinin önlenmesi ve başıboş, sahipsiz dolaşan köpeklere karşı önlemler alınması gereklidir. Ayrıca köpeklerin özellikle sebze bahçeleri, çocuk bahçeleri, parklara dışkılamalarının önlenmesi ve halkın kist hidatik konusunda bilinçlendirilmesi korunmada gereklidir (Eckert ve Deplazes, 2004).

Echinococcus multilocularis

Echinococcus multilocularis'in erişkinleri *E. granulosus*'tan daha küçük olup 1.2-4.5 mm dir. Parazitin kesin konağı vulpex (kızıl) ve alopex (kutup) cinsi tilkiler, kurtlar, çakallar, köpek ve kediler olabilir (Özbilgin ve İnceboz, 2007).

Morfolojik olarak bazı farklılıklar dışında oldukça benzerlerdir. Gebe halkadaki uterus kese biçimindedir. Parazit için Arvicolidae, Soricidae (sivri

faregiller), Talpidae (köstebekgiller), Sciuridae (sincapgiller), Cricetidae (hamstergiller) ailelerine ait kemirgenler ve insanlar arakonaktır (Markel ve ark, 1999; Merdivenci, 1982; Özbilgin ve İnceboz, 2007).

Ara konak tarafından alınan yumurtalar midede bulunan sindirim süreci ve diğer faktörlerle onkosferin yumurtadan çıkar ve sonrasında enzimler aracılığıyla aktive olarak intestinal villusların epitelyal sınırına penetre olur. Sonrasında onkosfer venöz ve lenfatik damarlara girerek çoğu karaciğerde gelişir, bazıları akciğerler veya diğer organlara gidebilir ve orada yerleşir (Markel ve ark, 1999; Merdivenci, 1982; Özbilgin ve İnceboz, 2007).

İnsan parazit için uygun bir ara konak değildir. *Echinococcus multilocularis*'in metasestodu *E. granulosus*'dan daha kompleks ve oldukça farklı oluşur. Metasestod sınırlayıcı bir konak-parazit bariyerinin yani adventisyel tabakanın bulunmaması nedeniyle multiveziküler yapıda olup genellikle sıvıdan çok yarı katı matriks içerir ve çok sayıda küçük veziküllerden oluşmuştur. Metasestod formu multiveziküler olup sünger görünümündedir. Küçük kesecikler *E. granulosus*'dan farklı olarak jel kıvamında bir madde ile doludur. Kist, dokulara düzensiz infiltrasyon yaparak büyüyen ve metastazlar yapabilen habis tümör karakterinde bir metasestoddur. Parazit insan vücudunda düzensiz infiltrasyonlar yaparak büyür ve metastazlar yapar. Kistler Karaciğer, akciğer, periton, beyin, böbrek ve dalak gibi organlara yerleşebilir. Sıklıkla karaciğere yerleşir. İlk yerleşim yerinden diğer organlara da metastazlar yapabilir (Markel ve ark, 1999; Merdivenci, 1982; Özbilgin ve İnceboz, 2007).

Yerleştiği organa göre klinik belirtileri değişir. Ayrıca genel belirtiler de bulunmaktadır. Tanısında görüntüleme, serolojik, histolojik ve moleküler yöntemlerden yararlanılır. Tedavisinde cerrahi yöntemler ve medikal tedaviden yararlanılır (Markel ve ark, 1999; Merdivenci, 1982; Özbilgin ve İnceboz, 2007).

Echinococcus oligarthrus

Erişkin *Echinococcus oligarthrus* 1.9-2.9 mm uzunluğundadır ve vücutları üç halkadan oluşmaktadır. Parazitin kesin konağı puma (*Felis concolor*), jaguar (*F. onca*), jaguarundi (*F. yagouaroundi*) ve Geoffroy kedisidir (*F. geoffroyi*). Gebe uterusu kese şeklinde olup Aguti (Dasyprocta) ve diğer rodentler ara konaktırlar. Ara konakta subkutanöz kaslarda larva oluşur. Metasestod polikistiktir olup içi sıvı

ile doludur. Kistler septalı olup laminer tabaka *E. vogeli*'den çok daha incedir (Markel ve ark, 1999).

Echinococcus vogeli

Parazitin kesin konağı çalı köpeği (*Speothos venaticus*) evcil köpekler; pakalar olup (*Cuniculus paca*) insanlar nadiren enfeksiyona yakalanırlar. Erişkin parazit 3.9-5.6 mm uzunluğunda olup olgun halka dikdörtgendir ve boyu eninden fazladır. Genital delik olgun ve gebe halkanın orta arka kısmında olup gebe uterus yan kısmen uzun ve tübüler yapıdadır. *Echinococcus vogeli*'nin metasestodu polikistik yapıda olup çok odacıklı kümeler oluşturma eğilimindedir ve içi sıvıyla doludur. Larva ara konağın sıklıkla karaciğerde tespit edilmiştir. İnsanlarda *E. vogeli* kistleri Parazit daha az sıklıkla akciğerler, plevra, perikardium, kalp, interkostal kaslar, diyafram, mide, omentum ve mezenterlerde de tespit edilmiştir (Markel ve ark, 1999).

3. Coenurosis

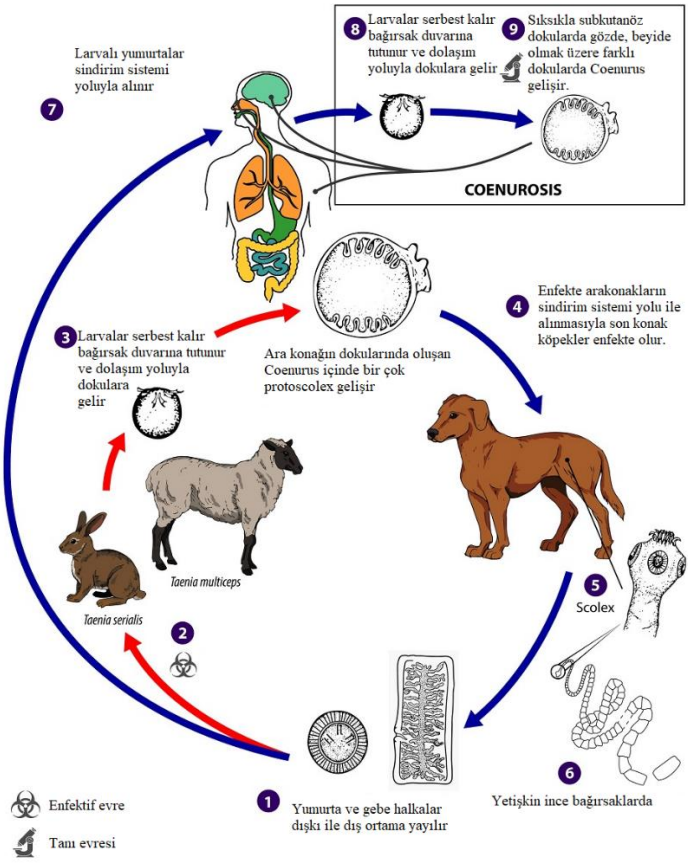
Multiceps türlerinin, larvalarının insana yerleşmesiyle oluşan patolojik durumdur. Enfeksiyona neden olan türler, *Taenia* (=*Multiceps*) *multiceps, T. serialis, T. brauni ve T. glomeratus*. *T. multiceps* diğer türlere göre daha sıklıkla görülür. Diğer Taenia türlerine göre bu sestodlar ince bağırsaklarda erişkin hale gelemez. Larval formu insanlarda doku enfeksiyonlarına neden olur (Özbilgin ve Limoncu, 2007; Doğanay ve Vural, 2012)

Bulaşmada enfeksiyonlu son konakların dışkısı rol oynar. Yumurtalar ara konak tarafından alındığında larvalar ince bağırsaklarda açılır, ince bağırsak duvarını geçerek kan dolaşımı ile beyin ve göze gelerek kese şeklinde coenurus larvalarını oluşturur. Larva halindeki metasestodlar çok sayıda invagine olmuş protoskoleksler içeren ve birkaç santimetre büyüklüğüne ulaşan kiste coenurosis denir (Şekil 11).

Taenia multiceps ve *T. serialis* için kesin konaklar Canidae ailesinin üyeleridir. *T. serialis* için köpekler ve tilkiler konak koyunlar, *T. multiceps* için ortak bir ara konaktır. *T. serialis* için tavşanlar, ancak diğer birçok otçul tür de ara konak olabilir.

Parazit enfeksiyonu Avrupa, Güney Amerika, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada'nın koyun yetiştirilen bölgelerinde de görülebilir. İnsan olgularının çoğu Afrika'dan bildirilmiştir. *T. brauni* ve *T. glomerulatus* vakaları da Afrika'da saptanmıştır.

İnsanlarda coenurus nadir olarak görülebilir. Yumurtaların kirli eller, su veya yiyecekler ile alınmasıyla Deri altı tutuluşu: Deri altında yerleşen Coenurus kist formundadır ve yumurta büyüklüğüne ulaşabilir. Görünüşü fibrom veya lipom gibidir.



Şekil 11. Coenurosis evrim döngüsü
https://www.cdc.gov/dpdx/coenurosis/modules/Coenurosis_LifeCycle_lg.jpg

Göz coenurusunda değişen derecelerde görme bozukluğuna karaciğerde yerleştiğinde tıkanma sarılığı görülebilir.

Serebral tutulumda serebral bir tümörü anımsatır. Klinik, larvanın oturduğu yere göre değişir; baş ağrısı, görme bozuklukları, afazi, epileptik krizler görülebilir. Beyin üst kısmında yerleşmiş Coenurosis de Prognoz nispeten iyidir. Vezikül sinir dokusundan izoledir. Beyin alt kısmında yerleşmiş coenurosis de prognoz kötüdür. Veziküller salkım şeklindedir ve cerrahi ile tamamen çıkarılmaları mümkün değildir.

Taenia taenieformis

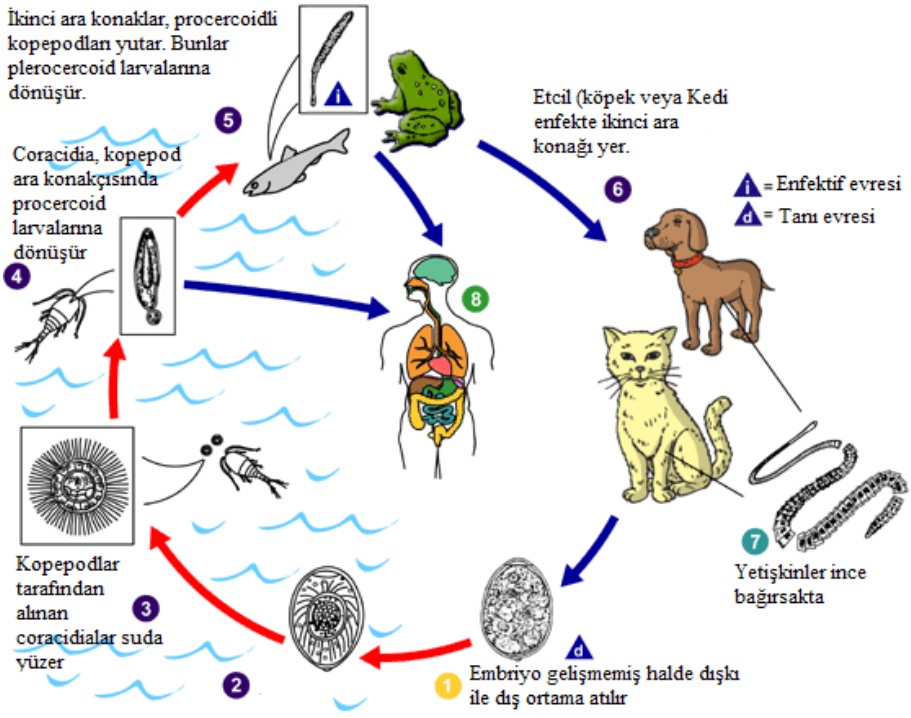
Erişkini kedilerde larval formu ise kemelerde bulunur. Parazitin larval döneminin (Strobilocercus) karaciğer dokusunda yerleştiği iki insan olgusu vardır (anonim 1, 2022).

Taenia crassiceps

Erişkini tilkilerin sindirim kanalında yaşarken larvası kemirgenlerin ve köstebeklerin derialtında veya periton boşluğunda gelişir. Parazitin larval döneminin (Cyticercus longicollis) insan gözünde enfeksiyon yaptığı bildirilmiştir. Ayrıca AIDS'li bir hastanın derialtı ve intermuskular bölgesindeki tümörde de larvalar görülmüştür (Ntoukas ve ark, 2013).

4. Sparganosis

Pseudophyllidae takımının Diphyllobothriidae familyasının Spirometra cinsi türlerinin ve *Sparganum proliferum*'un ikinci dönem Plerocercoid (sparganum) larvalarının insan vücuduna yerleşmesi sonucu oluşan zoonotik hastalığa sparganosis denir (Özbilgin ve Limoncu, 2007). Sparganum sözcüğü türü belli olmayan sestodların plerocercoid larvaları için kullanılır (Yazar ve ark, 2016). Sparganosis etkenleri *S*pirometra *mansoni, S. ranarum, S. Mansonoides, S. theileri* ve *S. erinacei* dahil Spirometra cinsindeki cestodlar ve ayrıca *Sparganum proliferum*'dur. Bu parazitlerde kedi, köpek ve diğer etçil hayvanlar son konak olup kopepodlar (su pireleri) birinci ara konak, insan, balık, su yılanı, tarla faresi, reptiller ve memeliler ikinci ara konaklardır (Özbilgin ve Limoncu, 2007; Arrabal ve ark, 2020).



Şekil 12. Spirometra türlerinin evrim döngüsü
(https://www.cdc.gov/dpdx/sparganosis/index.html)

Yumurtalar son konaktan dışkı ile atılır. Suda yumurta içerisinde corasidium gelişir ve konağı terk eder. İlk ara konak su pireleri tarafından alınarak procercoid larva haline dönüşür. İkinci ara konaklar enfekte su pirelerini yutarak vücutlarında plerocercoid larva gelişir. İnsanlar rastlantısal olarak su pirelerini yuttukları zaman, plerocercoid içeren kurbağa, yılan ve bazı küçük memelilerin etlerini az pişmiş veya pişmemiş olarak yediklerinde veya enfekte kurbağa, yılan, balık etlerini ülser, açık yara ve göze koyduklarında enfekte olurlar (Şekil 12) (Özbilgin ve Limoncu, 2007).

Sparganosis olguları tropik ve sub tropik iklim bölgelerinde**,** Çin, Kore, Japonya, Tayvan, Güney Asya, Amerika ve Doğu Afrika'da da rapor edilmiştir (Özbilgin ve Limoncu, 2007).

Sparganosis için sürüngenler, kurbağalar, kuşlar, ayılar, tilkiler, domuzlar ve Afrika yeşil maymunları rezervuar olarak belirtilmiştir. İnsanlar ikinci arakonak veya paratenik konaktırlar (Özbilgin ve Limoncu, 2007).

Larvalar konak dokusunda göç ederken enfalamasyona neden olurlar. Deri, kas, periton, plevra ve mesaneye, genitoüriner sisteme , plevral veya karın boşluğuna , skrotuma , omuriliğe veya beyne de göç edebilir. Deri altında palpasyonla ele gelebilen sert nodüller olur (Özbilgin ve Limoncu, 2007; Fairly ve King 2020).

Serebral sparganozun klinik ve radyolojik görünümü bir tümöre benzeyebilir. Baş ağrısı, nöbet, hemiparezi ve mental retardasyon görülebilir. Gözde ağrı, batmalar, göz hareketlerinin kısıtlanması ve kapaklarının kapanmaması, ekzoftalmi, konjunktuvit, kornea ülserleri, göz kapaklarında ağrısız ve yumuşak şişlikler alın, yanak ve şakakta ise sert şişlikler görülür (Özbilgin ve Limoncu, 2007, Pittella, 2013).

Sparganum proliferum insan vücuduna girdikten sonra, plerocercoid sürekli dallanma ve tomurcuklanma geçirir ve çok sayıda plerocercoid üretir. Ortaya çıkan bu yeni plerocercoidler subkutan bölgeye göç eder ve kemik dahil insan vücudunun tüm dokularını istila eder (Özbilgin ve Limoncu, 2007; Strait ve ark, 2012; Arrabal ve ark, 2020).

Parazitin tanısı biyopsi veya cerrahi, radyolojik, serolojik olarak yapılır. Tedavide nodül cerrahi olarak çıkartılır ve medikal tedavi yapılır (Özbilgin ve Limoncu, 2007).

KAYNAKLAR

Anonim 1. (2022) *Taenia taeniaeformis* erişim tarihi 2022, erişim adresi: https://www.aavp.org/wiki/cestodes/cyclophyllidea/taeniidae/taenia-taeniaeformis/

Arrabal, J.P, Perez, M. G., Arce, L.F., Kamenetzky L. (2020). First identification and molecular phylogeny of Sparganum proliferum from endangered felid (Panthera onca) and other wild definitive hosts in one of the regions with highest worldwide biodiversity. International Journal for Parasitology: *Parasites and Wildlife* 13:142–149

Bustos, J.A, Garcia, H.H, Del Brutto, O.H. (2016). Antiepileptic drug therapy and recommendations for withdrawal in patients with seizures and epilepsy due to neurocysticercosis. *Expert Rev Neurother* 16:1079–1085.

Doğanay, A., Vural, G. (2012). Coenurosis. *Turkiye Klinikleri J Vet Sci* 3(2):83-7

Durani, M.I., Basit, H., Blazar, E. (2022). Diphylobothrium latum. *StatPearls Publishing.* Erişim adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540971/

Eckert, J., Deplazes. P. (2004). Biological, epidemiological, and clinical aspects of Echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 17(1):107-35.

Ertük, Ö., Aydın, S., Karaman, Ü., Odabaş Alver, D, (2021). Genel Mikrobiyoloji (335-342) Ankara, Meteksan Matbaacılık ve Teknik Sanayi Tic. Anonim Şirketi

Eryıldız, C. (2010) *Echinococcus granulosus izolatlarının genotiplendirilmesi* (uzmanlık Tezi) Trakya Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne

Fairley JF, King CH. (2020). Tapeworms (Cestodes), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Ninth Edition. 289, 3463-3472.e2 https://www.clinicalkey.com/#!/browse/book/3-s2.0-C2016100010X

Fairley, J.F., King, C.H. (2020) Tapeworms (Cestodes), Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Ninth Edition. 289, 3463-3472.e2 https://www.clinicalkey.com/#!/browse/book/3-s2.0-C2016100010X

Garcia, H.H., Gonzales, A.E., Ewans, C.A.W., Gilman, R.H. (2003) *Taenia solium* cysticercosis. *Lanset* 16; 362(9383): 547–556.

Garcia, H.H., Gonzales, A.E., Gilman, R.H., for the Cysticercosis Working Group in Peru. (2020). *Taenia solium* Cysticercosis and Its Impact in Neurological Disease. *Clinical Microbiology Reviews* 33(3):e00085-19

Garcia, H.H., Lescano, A.G., Gonzales, I., Bustos, J.A., Pretell, E.J., Horton, J., et al. (2016). Cysticercosis Working Group in Peru. 2016. Cysticidal efficacy of combined treatment with praziquantel and albendazole for parenchymal brain cysticercosis. *Clin Infect Dis* 62:1375–1379.

Gurha, N., Sood, A., Dhar, J., Gupta, S. (1999). Optic nerce cysticercosis in the optic canal, *Acta Ophthalmol Scand* 77(1):107-109

Hutchison, W.M. (1959). Studies on Hydatigera (Taenia) taeniaeformis. ll. Growth of the adult phase. *Exp Parasitol,* 8: 557-567.

Le Bailly, M., Bouchet, F. (2013). Diphyllobothrium in the past: Review and new records. *Int J Paleopathol* 3(3):182-187.

Markell EK, John DT, Krotoski WA. (1999). Markell and Voge's medical parasitology. (234-68) içinde.8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co,

McManus. D.P., Zhang, W., Li, J., Bartley, P.B. Echinococcosis. Lancet 2003;362(9392):1295-304.

Merdivenci, A, Aydınlıoğlu, K. (1982). Hidatidoz (Hidatik kist hastalığı). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 1-279.

Özbilgin, A., İnceboz, T. (2007). Alveolar Echinococcosis, Özcel, M., Özbel, Y., Ak, M. (Ed.), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları (567-582) içinde, İzmir, Meta Basım

Özbilgin, A., Kilimcioğlu, A.A. (2007). Kistik Echinococcosis, Özcel, M., Özbel, Y., Ak, M. (Ed.), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları (541-561) içinde, İzmir, Meta Basım

Özbilgin, A., Limoncu, E. (2007). İnsanlarda Hastalık Oluşturan Diğer Cestod Larva Enfeksiyonları, Özcel, M., Özbel, Y., Ak, M. (Ed.), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları (595-599) içinde, İzmir, Meta Basım

Özbilgin, A., Östan, İ, (2007). Diphyllobothriosis. Özcel, M., Özbel, Y., Ak, M. (Ed.), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları (681-689) içinde, İzmir, Meta Basım

Pittella JEHP. (2013). Neuroparasitology and Tropical Neurology, Handbook of Clinical Neurology, Edited by Hector H. Garcia, Herbert B. Tanowitz, Oscar H. Del Brutto. Volume 114, p: 2-414. https://www.sciencedirect.com/handbook/handbook-of-clinical-neurology/vol/114/suppl/C

Pittella, JEHP. (2013). Neuroparasitology and Tropical Neurology, Handbook of Clinical Neurology, Edited by Hector H. Garcia, Herbert B. Tanowitz, Oscar H. Del Brutto. Volume 114: 2-414. https://www.sciencedirect.com/handbook/handbook-of-clinical-neurology/vol/114/suppl/C

Rodriguez, S., Wilkins, P., Dorny, P. (2012). Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. *Pathog Glob Health* 106:286–298.

Sarti, E., Schantz, P.M., Plancarte, A., Wilson, M., Gutierrez, I.O., Lopez, A.S., Roberts, J., Flisser, A. (1992). Prevalence and risk factors for Taenia solium taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 46:677–685.

Strait Karen, Else JG, Eberhard ML. (2012). Chapter 4 - Parasitic Diseases of Nonhuman Primates. Nonhuman Primates in Biomedical Research (Second Edition). Volume2:

Diseases. American College of Laboratory Animal Medicine 2012, Pages 197-297. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381366-4.00004-3

Strait, Karen, Else, J.G, Eberhard, M.L. Chapter 4- Parasitic Diseases of Nonhuman Primates. Nonhuman Primates in Biomedical Research (Second Edition). Volume2: Diseases. American College of Laboratory Animal Medicine 2012, Pages 197-297. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381366-4.00004-3

Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (1988). The nature, extent and significance of variation within the genus Echinococcus. *Adv Parasitol* 27:209-58.

Turgay, N., Sönmez Tamer, G. (2007). Hymenolepiosis, Özcel, M., Özbel, Y., Ak, M. (Ed.), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları (709-716) içinde, İzmir, Meta Basım

Turgay, N., Yolasığmaz, A. Taeniosis. (2007). Özcel, M., Özbel, Y., Ak, M. (Ed.), Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları (691-708) içinde, İzmir, Meta Basım

Varcasia, A., Tamponi, C., Ahmed, F., Cappai, M.G., Porcu, F., Mehmood, N. (2022). *Taenia multiceps* coenurosis: a review. *Parasites & Vectors* 15(84):1-18.

Yazar, S., Kuk, S, Miman Ö., Saygı, G. (2016). Saygı'nın Temel Tıbbi Parazitolojisi, Kayseri, Erciyes Üniversitesi Ofset tesisleri

Yoneva, A., Kuchta, R., Scholz, T. (2014). First study of vitellogenesis of the broad fish tapeworm Diphyllobothrium latum (Cestoda, Diphyllobothriidea), a human parasite with extreme fecundity. *Parasitol Int* 63(6):747-53.

Zimic, M., Pajuelo, M., Gilman, R.H., Gutierrez A.H., Rueda, L.D., Flores, M., and Cysticercosis Working Group in Peru. (2012). The highly antigenic 53/25 kDa Taenia solium protein fraction with cathepsin-L like activity is present in the oncosphere/cysticercus and induces non-protective IgG antibodies in pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 145:171–178.

İnternet adresleri

http://www.examnnotes.com/Microbiology/Taenia%20solium.html

https://www.chegg.com/flashcards/biom-441-lab-cestodes-cfcaddc7-59b3-4a19-bc10-11f5794f5e21/deck

https://veteriankey.com/platyhelminthes-flatworms/

https://veteriankey.com/platyhelminthes-flatworms/

https://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0006/109986/hydatids-you-too-can-be-affected.pdf

https://quizlet.com/1846llobothriosis70095/eemb-111-parasitology-cyclophyllidea-flash-cards/

https://www.dreamstime.com/illustration/diphyllobothrium.html

https://uomustansiriyah.edu.iq/media/lectures/2/2_2020_02_18!05_03_15_PM.pdf

https://uomustansiriyah.edu.iq/media/lectures/2/2_2020_02_18!05_03_15_PM.pdf
https://www.cdc.gov/dpdx/cysticercosis/modules/Cysticercosis_LifeCycle_lg.jpg
https://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/modules/Echinococcus_gran_LifeCycle_lg.jpg
https://www.cdc.gov/dpdx/coenurosis/modules/Coenurosis_LifeCycle_lg.jpg
https://www.cdc.gov/dpdx/sparganosis/index.html

BÖLÜM 8

İNTESTİNAL PROTOZOONLARDA METRONİDAZOLE KARŞI DİRENÇ GELİŞİMİ

Arş. Gör. Dr. Selahattin AYDEMİR[1], Öğr. Gör. Fethi BARLIK[2],
Öğr. Gör. Dr. Rahmi YILDIZ[3], Murat SAYGIN[4],
Milad TORKAMANIAN AFSHAR[5], Prof. Dr. Zeynep TAŞ CENGİZ[6]

[1] Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye. saydmr23@gmail.com, Orcid ID: 0000-0002-0941-2779.
[2] Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO, Sağlık Teknikerliği Bölümü, Van, Türkiye. fethibarlik@yyu.edu.tr, Orcid ID: 0000-0003-2012-7255
[3] Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Gevaş MYO, Veterinerlik Bölümü, Van, Türkiye. rahmiyildiz@yyu.edu.tr, Orcid ID: 0000-0003-2089-0664
[4] Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye. muraysaygın@gmail.com, Orcid ID: 0000-0002-7115-802X
[5] Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye. mtamilad@gmail.com, Orcid ID: 0000-0003-1978-4127
[6] Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye. ztascengiz@gmail.com, Orcid ID: 0000-0002-5247-5644

GİRİŞ

İntestinal parazit enfeksiyonları, gelişmekte olan ülkelerdeki en büyük sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünya çapında yaklaşık 3,5 milyar insanın intestinal parazit enfeksiyonlarından etkilendiğini ve 450 milyon kişinin hastalık belirtileri gösterdiğini tahmin etmektedir (Menu ve ark., 2019). Özellikle, tropikal ve subtropikal bölgelerde yaşayan ekonomik yönden dezavantajlı çocuklar intestinal parazit enfeksiyonlarından en çok etkilenen gruptur (Chelkeba ve ark., 2020).

Kemoterapötik ilaçlar, semptomatik hastaları tedavi etmek ve asemptomatik kişilerin paraziti başka kişilere bulaştırmasını engellemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak günümüzde insan sağlığı için tehdit oluşturan intestinal parazitlerin sebep olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan birçok ilaca karşı direnç gelişmektedir. DSÖ'nün tanımına göre ilaç direnci, bir parazit türünün bir ilacın önerilene eşit ya da bireyin tolerans sınırları içerisinde olan daha yüksek dozlarda uygulanmasına ve emilmesine rağmen hayatta kalma ve/veya çoğalma yeteneğidir (Lalle ve Hanevik, 2018). Parazitlerin, yaşama adaptasyonu ve evrimi için gösterdiği bu direnç bir hayatta kalma mekanizması olsa da ilaç direncinin gelişmesi, protozoon parazitlerin yayılışını engellemede büyük bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna karşılık, ilaç direncinden sorumlu genler çoğu parazitte henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Patojen parazitlerde ilaç direnç mekanizmaları genelde, hedeflenen enzimlerdeki mutasyon olayları ve antiparaziter ilaçlar için hedef bölgelerin eksikliği gibi çeşitli mekanizmalara bağlıdır. Gen delesyonları, gen mutasyonları ve genlerin kimerizasyonu gibi çeşitli genetik değişimler de ilaç direnç mekanizmalarında çok önemli bir rol oynamaktadır (Garcia ve ark., 2017; Pramanik ve ark., 2019).

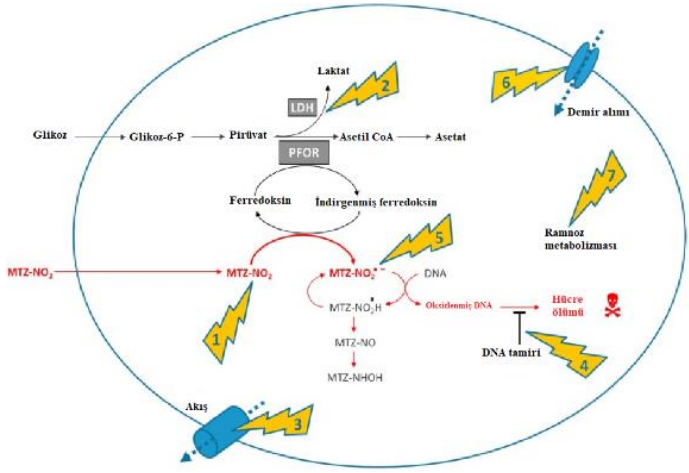
İNTESTİNAL PROTOZOON ENFEKSİYONLARININ TEDAVİSİNDE KULLANILAN METRONİDAZOL

Metronidazol (MTZ), anaerobik ve mikroaerofilik patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ve DSÖ tarafından temel ilaçlar listesine alınan 5-nitroimidazol grubuna ait bir ilaçtır (Leitsch, 2019). MTZ, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli* ve *Blastocystis*

spp. gibi intestinal protozoon parazitlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Coyle ve ark., 2012; Aydın ve ark., 2016).

MTZ, nitro grubunun indirgenmesiyle toksik forma dönüşür. MTZ'ün çok düşük redoks potansiyeli nedeniyle, bu indirgenme sadece kantitatif olarak güçlü bir indirgeyici fizyolojiye sahip olan mikroaerofilik ve anaerobik organizmalarda meydana gelir (Alauzet ve ark., 2019; Leitsch, 2019).

Hücre içerisinde çok düşük oksijen konsantrasyonlarında meydana gelen bir reaksiyon olan nitro grubuna indirgendikten sonra MTZ'ün yıkıcı potansiyeli açığa çıkar. MTZ, hücre içerisinde farklı mekanizmalarla etki gösterir (Şekil 1). Anaeroblarda, indirgenmiş MTZ (MTZ-NO_2), piruvat-ferredoksin/flavodoksin oksidoredüktaz (PFOR) sistemi tarafından indirgenen ferredoksin ya da flavodoksinden bir elektron aldığında indirgenir (MTZ-NO_2^-). Oluşan bu radikal, DNA'ya zarar vererek çift sarmal kırılmalarına sebep olur. DNA'sı hasar görmüş patojen parçalanır (Alauzet ve ark., 2019). Spesifik olarak MTZ, *E. histolytica* ve *G. intestinalis*'deki redoks enzimi tioredoksin redüktazı hedefler ve enzimin bir disülfid redüktaz olarak işlevini inhibe eder. Bütün bu olaylar şiddetli oksidatif strese neden olur. Ayrıca MTZ, *G. intestinalis*'in protein translasyonunda yer alan bir enzim olan uzama faktörü 1-γ'nın (EF1-γ) degradasyonuna da yol açar (Leitsch, 2019).



Şekil 1: Metronidazolün Etki Mekanizmaları
Kaynak: Leitsch, 2019

MTZ'ün insanlarda metalik tat, baş ağrısı, mide bulantısı, nadiren merkezi ya da periferik nörotoksisite, pankreatit ya da nötropeni gibi yan etkilere neden olduğu gözlemlenmiştir. Ancak en büyük endişe, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) MTZ'ü hayvanlar için kanserojen ve insanlar için olası kanserojen olarak listelemiş olmasıdır. MTZ ile tedavi edilen bireylerde DNA hasarı gözlemlenmiş olsa da bunun tam mekanizması henüz bilinmemektedir. Bu ilacın insanlarda kanserojen olup olmadığı sorusunu çözmek için uzun vadeli çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir (Garcia ve ark., 2017; Drinic ve ark., 2019).

Metronidazol Direnci Gelişen İntestinal Protozoonlar

Giardia intestinalis

Kamçılı bir protozoon olan *G. intestinalis* (Sinonim: *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*), insanların en önemli bağırsak patojenlerindendir biridir. Bu parazit, halk sağlığı yönünden önemli bir enfeksiyon olan giardiasise neden olur. Giardiasis, dünya çapında yılda yaklaşık olarak 280 milyon bireyi etkilemektedir. Endemik bölgelerde ve çevresel kontaminasyonun yüksek olduğu yerlerde hastalığın oranı %2 ila %30 arasında değişir. Gelişmiş ülkelerde ise bu oran %2-7 aralığındadır (Argüello-Garcia ve ark., 2020).

Giardiasis, bağışıklık sistemi sağlam yetişkin bireylerde asemptomatik ve genellikle kendi kendini sınırlayan bir enfeksiyon olsa da özellikle çocuklarda ve immünkompramize bireylerde ishal, mide bulantısı, şişkinlik ya da malabsorpsiyon gibi ciddi gastrointestinal semptomlara neden olabilir. Semptomatik bireylerde dışkı kötü kokulu ve yağlıdır. Enfeksiyon sonrası, laktoz intoleransı ya da irritabl barsak sendromu gibi semptomlar ortaya çıkabilmektedir (Hernandez-Luis ve ark., 2010; Argüello-Garcia ve ark., 2020).

G. intestinalis, tercihen ince bağırsağa yerleşir ve iki aşamalı bir yaşam döngüsüne sahiptir. Aside dirençli ve metabolik olarak inaktif olan kist formu, konak tarafından alınır ve mideden ince bağırsağa geçer. Burada, aktif olarak beslenip çoğalabilen ve patojenik form olan trofozoite dönüşür. Trofozoitler ya lümende serbestçe hareket eder ya da bağırsakta emici diskleri ile villüs epitellerine yapışarak emilim bozukluklarına neden olurlar. Bir süre sonra, trofozoitlerin belirli bir oranı kistlere dönüşerek dışkıyla atılır ve bu kistler başka konaklara bulaşarak enfeksiyona sebep olur (Leitsch, 2015; Rojas-Lopez ve ark., 2022).

Giardiasise karşı herhangi bir profilaksi ya da aşı mevcut olmadığından hem semptomatik hem de asemptomatik bireylerdeki enfeksiyonun tedavisi önemlidir. Prevalansın düşük olduğu bölgelerde, hastalığın seyrini kısaltmak için doğrulanmış giardiasis vakalarının tedavisi her zaman tavsiye edilir. Ayrıca etkili tedavi, enfeksiyon sonrası komplikasyon riskini azaltabilir. Tedavi, daha çok iki ilaç sınıfıyla sınırlıdır. Bunlar; nitroheterosiklik bileşikler (MTZ, nitazoksanid ve furazolidon gibi) ve benzimidazollerdir (albendazol ve mebendazol gibi). Paromomisin ve kinakrin de giardiasis tedavisinde kullanılır. Ancak kullanılan bu ilaçlar düşük etkinlik ve yüksek toksisite göstermeleri nedeniyle sorun teşkil etmektedir (Ansell ve ark., 2015; Lee ve ark., 2019; Argüello-Garcia ve ark., 2020).

Vakaların yaklaşık %90'ı MTZ ile tedavi edilebilir, ancak bu ilaçla tedavi edilemeyen inatçı giardiasis vakaları da vardır. Bu gibi durumlarda, MTZ ve albendazol ya da kombinasyonu ile tedavi rejimleri uygulanmaktadır (Leitsch, 2015; Peters ve ark., 2021).

Giardiasis tedavisinde kullanılan ilaçlar %100 iyileştirme sağlayamadığından parazitin bu ilaçlara karşı bir direnç kazandığı düşünülmektedir. İlaç direncinin yanı sıra, tekrarlayan enfeksiyon, yetersiz dozda ilaç verilmesi, immün sistem yetersizliği ve safra kesesi ya da pankreasta sekestrasyon (ilaç depolanması) gibi faktörler de tedavi başarısızlığından sorumlu olabilir. Dirençli giardiasisi olan hastalardan izole edilen *G. intestinalis*'in her zaman in vitro ilaç direnci göstermediği de bilinmektedir. Bu durum, belirli bir kemoterapinin başarısı üzerinde konağın bazı fizyolojik etkilerini akla getirmektedir. Bu nedenle, tekrarlayan semptomları olan kişilerin yeniden enfekte olmadıklarını ve giardiasis sonrasında gelişen laktoz intoleransı ya da irritabl bağırsak sendromundan muzdarip olmadıklarını ekarte etmek önemlidir (Leitsch, 2015; Lalle ve Hanevik, 2018).

MTZ direnci, diğer mikroaerofilik ve anaerobik patojenlerde olduğu gibi *G. intestinalis*'te de saptanmıştır. Nobarro ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, Londra Tropikal Hastalıklar Hastanesine 2008 yılında başvuran ve MTZ ile tedavi edilen giardiasisli hastaların %15,1'inde tedavinin başarısız olduğu bildirilmiştir. Bu oranın 2011 yılında %20,6, 2013 yılında ise %40,2'ye yükseldiği belirlenmiş ve artışın endişe verici olduğu vurgulanmıştır.

MTZ direnç mekanizmaları son 40 yılda geniş çapta çalışılmış ve farklı görüşler bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar direncin, MTZ'ün mikroaerofilik ve

anaerobik organizmalarda etki gösterebilmesini sağlayan indirgenme reaksiyonu enzimi olan PFOR aktivitesindeki azalmadan kaynaklandığını bildirmiştir. Ancak bozulmamış bir PFOR/ferredoksin yolağına sahip türlerde de MTZ direnci tespit edilmiştir. Bazı çalışmalar MTZ'e karşı direnç gelişiminde, MTZ metabolizmasında önemli rolü olan nitroredüktaz 1 ve 2'nin etkili olduğunu göstermiştir. Araştırmacılara göre nitroredüktaz 1, metronidazolü reaktif metabolitlere dönüştürürken, nitroredüktaz 2 ilacı toksik olmayan bir forma dönüştürmektedir. Dirençli suşlarda nitroredüktaz 2 aktivitesinin arttığı tahmin edilmektedir (Leitsch, 2015). Emery ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada ise MTZ direncinin poligenik varyasyonlarla geliştiği ve protein asetilasyon yolaklarındaki değişikliklerle ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Giardia A ve B genotiplerinin MTZ metabolizmasıyla ilişkili genlerinde (ferredoksinler, nitroredüktaz-1 ve 2) ve serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli olan bazı genlerinde (tioredoksin peroksidaz ve NADH oksidaz) yüksek oranda amino asit değiştiren tek nükleotit polimorfizmler saptanmıştır (Saghaug ve ark., 2019). Saptanan bu polimorfizmlerin MTZ direnci ile ilişkisi tartışmaya açıktır. Bu konuyla ilgili daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Entamoeba histolytica

E. histolytica insanlarda amoebiasise neden olan protozoon bir parazittir. Dünya genelinde 500 milyon insanı enfekte ettiği, 50 milyon dizanteri ve karaciğer apsesi vakasına ve her yıl 100.000 kişinin ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Bu parazitle enfekte bireyler çoğunlukla asemptomatiktir ancak semptomatik bireylerde ishal, kanlı mukuslu dışkı, kolon ve karaciğer apseleri görülebilmektedir. Tedavi edilmezse enfekte hastaların %3-9'unda ölümcül olabilen karaciğer apseleri görülmektedir (Dawah ve ark., 2016; Garcia ve ark., 2017).

Gastrointestinal semptomları olan hastalardan *Entamoeba dispar* ve *Entamoeba moshkovskii*'nin izole edildiğine dair vaka raporları olsa da bu iki türün patojen olduklarına dair ikna edici bir kanıt sunulmamıştır. Öte yandan, günümüzde, *E. moshkovskii* çocuklarda ishale neden olan bir protozoon parazit olarak da gösterilmektedir (El-Dib, 2017; Kantor ve ark., 2018).

E. histolytica'nın yaşam döngüsünde enfektif bir kist, metakist, metakistik trofozoit, invaziv hareketli trofozoit ve prekist formları bulunmaktadır. Enfeksiyon, dört çekirdekli olgun kistlerin fekal-oral yolla alınması ile gerçekleşmektedir. Olgun kistin duvarı, ince bağırsak lümeninde enzimler tarafından sindirilip ortaya dört çekirdekli metakistik formu çıkmaktadır. Metakistik form, çekirdek bölünmesi ve daha sonra sitoplazma bölünmesi geçirerek sekiz adet metakistik trofozoiti oluşturur. Bu küçük trofozoitler ise kolona yerleşerek sığıntı ya da patojen formda yaşamını sürdürecek olan trofozitlere dönüşür. Trofozoitlerin belirli bir bölümü iki çekirdekli ve daha sonra enfektif form olan dört çekirdekli kiste dönüşerek dışkı ile dış ortama atılır (El-Dib, 2017; Kantor ve ark., 2018).

E. histolytica insan kalın bağırsağının yüzeyinde ve bez kriptlerinde sığıntı bir hayat sürdürüp, gıda artıkları, bakteriler ve mukoza ile beslenebilir ya da patojen olarak dokulara saldırabilir. Kalın bağırsağın dışında çekum ve apendikste rastlanabilir. Trofozoitler, bir yüzey proteini olan lektin aracılığıyla kolon epitel hücrelerindeki galaktoz ve N-asetil galaktozamine (GalNAc) yapışır. Epitel hücrelere yapışan parazitin bulunduğu dokuya saldırmasıyla dokuda ödem, fibrin oluşumu ve nekroz görülür. Parazitler, bağırsak mukozasını geçerek submukozada yanlara yayılır. Böylece, oluşan nekroz ile kılcal damarlar açılarak kanama başlar. Submokozada bulunan trofozoitler, periton boşluğundan ya da venlerden geçerek karaciğere varabilir. Karaciğer dışında beyin, akciğer, safra kesesi, testis ve deri gibi organları da hedef alabilir (El-Dib, 2017; Kantor ve ark., 2018).

Amoebiasisin yaklaşık yüzde doksanı asemptomatiktir. Semptomatik olgular, genellikle subakut bir başlangıca sahiptir ve semptomlar, hafif ishalden şiddetli dizanteriye kadar değişebilir (Kantor ve ark., 2018). Özellikle tanı ve tedavi zamanında yapılmadığında, fulminan nekrotizan kolit, toksik megakolon ve fistülize edici perianal ülserasyonlar gibi olağandışı ve ciddi komplikasyonlar ortaya çıkabilir. Nekrotizan kolit gelişen hastaların ölüm oranı %40 olsa da tabloya karaciğer apsesi eşlik ederse ölüm oranı %89'a çıkar (Kantor ve ark., 2018; Fitri ve ark., 2022).

MTZ türevleri ve emetin esas olarak amoebiasisi tedavi ve kontrol etmek için kullanılır. MTZ, 50 yılı aşkın süredir amoebiasis tedavisinde kullanılmaktadır. Bu süreçte tedavinin başarısızlıkla sonuçlandığı vakalar da bildirilmiştir. Tedavide başarısız olduklarını bildiren ilk araştırmacılar 2000

yılında Hanna ve arkadaşları olmuştur (Drinic ve ark., 2019; Pramanik ve ark., 2019).

E. histolytica'nın ilaç direnci ciddi bir sorun olarak görülmese de MTZ'e karşı direncin arttığını gösteren raporlar vardır. Ayrıca *E. histolytica* suşları arasında ilaç duyarlılığında farklılıklar olduğu rapor edilmiştir. Bu da düşük ilaç dozlarının kullanıldığı olgularda ilaç direnci gelişebileceğini göstermektedir (Hemmati ve ark., 2016).

E. histolytica'nın MTZ direnç mekanizması ile ilgili sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada, dirençli bir suşta demir içeren süperoksit dismutaz (Fe-SOD) ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada direncin, artan peroksiredoksin ve azalan ferredoksin ekspresyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Ek olarak, iki çalışmada PFOR ifadesinde herhangi bir önemli değişiklik bulunmadığı bildirilmiştir (Penuliar ve ark., 2015).

E. histolytica'nın MTZ direnç mekanizmalarını aydınlatmak için ayrıntılı çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

Blastocystis spp.

Blastocystis spp., insanların gastrointestinal sistemine yerleşen en yaygın protozoon parazittir. Bu parazitin farklı alt tipleri (ST) vardır. *Blastocystis* ST'leri arasında ST1-ST4 insanlarda en yaygın görülen alt tiplerdir. *Blastocystis* spp.'nin prevalansı, az gelişmiş ülkeler ve özellikle tropikal ve subtropikal ülkelerde daha yüksektir (Deng ve ark., 2019).

Blastocystis spp.'nin yaşam döngüsü tam olarak anlaşılamamıştır. Kist formunun bu protozoonun enfektif formu olduğu düşünülmektedir. Bulaşma, kişiler ya da hayvanlar arasında fekal-oral yolla, doğrudan ya da dolaylı olabilmektedir (Popruk ve ark., 2021).

Organizmanın metabolik süreçleri hakkında çok az şey biliniyor olması ve neden-sonuç ilişkisi için hayvan deney modellerinin de eksik olması gibi sebeplerden dolayı, patojenik rolü belirsizdir. Patojenitesi tartışmalı olsa da *Blastocystis* spp.'nin ishal, karın ağrısı, şişkinlik, kabızlık ve cilt lezyonları gibi spesifik olmayan gastrointestinal sistem semptomlarına sebep olduğu bildirilmiştir. Daha çok bağışıklığı baskılanmış konaklarda ishal sebebi olarak görülür (Basak ve ark., 2014).

Blastocystis spp.'nin patojenitesine ilişkin değişken durumlar göz önüne alındığında, hangi hastaların *Blastocystis* spp. enfeksiyonu için tedavi görmesi gerektiği konusunda bir fikir birliği olmadığı görülür. Kalıcı ishali olan ya da Blastocystis dışında semptoma sebep olabilecek başka bir patojen tespit edilmeyen hastalarda bir antimikrobiyal tedavisinin başlatılması mantıklıdır. Bununla birlikte, tedavi modaliteleri hakkında artan veriler, *Blastocystis* spp.'nin başarılı antimikrobiyal eradikasyonunun basit olmaktan çok uzak olduğunu göstermektedir. Yakın zamana kadar *Blastocystis* spp. enfeksiyonuna karşı birçok farklı ilaç tedavisi uygulanmıştır. Ancak hiçbir tedavi ciddi randomize çalışmalarla desteklenmemiştir (Coyle ve ark., 2012).

Blastocystis spp. enfeksiyonlarında MTZ ilk tedavi seçeneği olarak kabul edilir. MTZ ile ilgili yapılan kontrollü çalışmalarda semptomların çözülme başarısının parazitin eradikasyonu ile ilgili olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak bu ilaçla Blastocystis'i yok etme başarısının %0 ila %100 arasında olduğu bildirilmiştir. MTZ, belirli hastalarda etkili olmasına rağmen şiddetli enfeksiyonu olanlarda tam eradikasyon sağlamayabilir ya da bazı dirençli alt tiplerle enfekte hastalarda etkinlik göstermeyebilir (Coyle ve ark., 2012). Çeşitli in vitro çalışmalar, *Blastocystis* spp.'nin MTZ ile tedavi edildiğinde direncin ortaya çıktığını göstermiştir (Wu ve ark., 2014). Bazı araştırmacılar ise dirençten ziyade MTZ'ün *Blastocystis* spp.'nin alt tiplerine karşı farklı etki gösterdiğini ve yoğun enfeksiyonlarda ilacın aktivitesinin yetersiz olduğunu savunmaktadır (Stensvold ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalar, *B. hominis* izolatlarının farklı coğrafi kökene sahip olanlarında MTZ'e karşı farklı direnç seviyelerinin olduğunu göstermiştir. Bu da paraziti ortadan kaldırmak için uygun dozajda etkili bir ilacın ya da ilaç kombinasyonlarının uygulanması gerektiğini düşündürmektedir. Göç dalgalarıyla beraber *B. hominis* gibi dirençli patojenler farklı topluluklara taşınabilmektedir. Dolayısıyla, yapılacak tedavilerin sürekli olarak güncellenmesi gerekmektedir (Rajamanikam ve ark., 2019).

SONUÇ

Yukarıda adı geçen intestinal protozoonlar ile enfekte hastaların tedavisinde ilk tercih olarak kullanılan MTZ'ün, gelişen direnç nedeniyle geçerliliğini yitirme tehlikesi dünya çapında büyük bir endişeye sebep olmaktadır.

İlaç direncinde yer alan bazı genler, proteinler ve hücresel yollar keşfedilmiş olsa da bu sorunun üstesinden gelmek ve yeni kemoterapötik stratejiler tasarlamak için dirençli intestinal protozoonların ortaya çıkmasından sorumlu mekanizmaların araştırılmasına devam edilmesi gerekmektedir. Dirençli protozoonlarla enfekte hastalar için alternatif tedavi seçenekleri bulmak ve etkili olmayan ilaçların kullanımını sonlandırabilmek için endemik bölgelerde direnç durumunu belirleyecek çalışmaların yapılması önemlidir. Ayrıca gelecekte daha ciddi problemlerle karşılaşmamak için ilaç ve ilaç kombinasyonlarının daha akılcı kullanılması ve yeni antiprotozoal ilaçların keşfi için çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

Alauzet, C., Lozniewski, A., & Marchandin, H. (2019). Metronidazole resistance and nim genes in anaerobes: A review. *Anaerobe*, *55*, 40-53.

Ansell, B. R., McConville, M. J., Ma'ayeh, S. Y., Dagley, M. J., Gasser, R. B., Svard, S. G., & Jex, A. R. (2015). Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnology advances*, *33*(6), 888-901.

Argüello-Garcia, R., Leitsch, D., Skinner-Adams, T., & Ortega-Pierres, M. G. (2020). Drug resistance in *Giardia*: mechanisms and alternative treatments for giardiasis. *Advances in Parasitology*, *107*, 201-282.

Aydin, M., Sayin, R. & Hamamci, M. (2016). Peripheral neuropathy as a rare syndrome related to metronidazole usage: Metronidazole may lead to persistent neuropathy . *Medical Science and Discovery*, 3 (5), 239-41.

Basak, S., Rajurkar, M. N., & Mallick, S. K. (2014). Detection of *Blastocystis hominis*: a controversial human pathogen. *Parasitology Research*, *113*(1), 261-265.

Chelkeba, L., Mekonnen, Z., Alemu, Y., & Emana, D. (2020). Epidemiology of intestinal parasitic infections in preschool and school-aged Ethiopian children: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, *20*(1), 1-16.

Coyle, C. M., Varughese, J., Weiss, L. M., & Tanowitz, H. B. (2012). *Blastocystis*: to treat or not to treat. *Clinical Infectious Diseases*, *54*(1), 105-110.

Dawah, I., Inabo, H., Abdullahi, I., & Machido, A. (2016). Differentiation of Ent*amoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* from diarrhoeic stools using Polymerase Chain Reaction in Kaduna, Nigeria. *International Journal of Medicine and Biomedical Research*, *5*(2), 61-66.

Deng, L., Chai, Y., Zhou, Z., Liu, H., Zhong, Z., Hu, Y., Peng, G. (2019). Epidemiology of *Blastocystis* sp. infection in China: a systematic review. *Parasite*, *26*.

Drinic, M., Raninger, A., Zraunig, A., Astelbauer, F., Leitsch, D., Obwaller, A., Duchene, M. (2019). Activity of methylgerambullin from Glycosmis species (Rutaceae) against *Entamoeba histolytica* and *Giardia duodenalis* in vitro. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *10*, 109-117.

El-Dib, N. A. (2017). *Entamoeba histolytica*: an overview. *Current tropical medicine reports*, *4*(1), 11-20.

Emery, S. J., Baker, L., Ansell, B. R., Mirzaei, M., Haynes, P. A., McConville, M. J., . . . Jex, A. R. (2018). Differential protein expression and post-translational modifications in metronidazole-resistant *Giardia duodenalis*. *Gigascience, 7*(4), giy024.

Fitri, L. E., Candradikusuma, D., Setia, Y. D., Wibawa, P. A., Iskandar, A., Winaris, N., & Pawestri, A. R. (2022). Diagnostic Methods of Common Intestinal Protozoa: Current and Future Immunological and Molecular Methods. *Tropical Medicine and Infectious Disease, 7*(10), 253.

García, C. G., Marchat, L. A., Lopez-Canovas, L., Ishiwara, D., Rodriguez, M. A., & Orozco, E. (2017). Drug resistance mechanisms in *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, and opportunistic anaerobic protozoa *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 613-628): Springer.

Hemmati, A., Choopani, A., Pourali, F., & Hosseini, S. M. J. (2016). Molecular epidemiology and drug resistance study of *Entamoeba histolytica* in clinical isolates from Tehran, Iran. *Journal of Applied Biotechnology Reports, 3*(4), 513-517.

Hernandez-Luis, F., Hernandez-Campos, A., Castillo, R., Navarrete-Vazquez, G., Soria-Arteche, O., Hernandez-Hernandez, M., & Yepez-Mulia, L. (2010). Synthesis and biological activity of 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole derivatives against some protozoa and *Trichinella spiralis*. *European Journal of Medicinal Chemistry, 45*(7), 3135-3141.

Kantor, M., Abrantes, A., Estevez, A., Schiller, A., Torrent, J., Gascon, J., Ochner, C. (2018). *Entamoeba histolytica*: updates in clinical manifestation, pathogenesis, and vaccine development. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2018*.

Lalle, M., & Hanevik, K. (2018). Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. *Infection and Drug Resistance, 11*, 1921.

Lee, S. M., Kim, M. S., Hayat, F., & Shin, D. (2019). Recent advances in the discovery of novel antiprotozoal agents. *Molecules, 24*(21), 3886.

Leitsch, D. (2015). Drug resistance in the microaerophilic parasite *Giardia lamblia*. *Current tropical medicine reports, 2*(3), 128-135.

Leitsch, D. (2019). A review on metronidazole: an old warhorse in antimicrobial chemotherapy. *Parasitology*, *146*(9), 1167-1178.

Menu, E., Mary, C., Toga, I., Raoult, D., Ranque, S., & Bittar, F. (2019). A hospital qPCR-based survey of 10 gastrointestinal parasites in routine diagnostic screening, Marseille, France. *Epidemiology & Infection*, *147*.

Nabarro, L., Lever, R., Armstrong, M., & Chiodini, P. (2015). Increased incidence of nitroimidazole-refractory giardiasis at the Hospital for Tropical Diseases, London: 2008–2013. *Clinical Microbiology and Infection*, *21*(8), 791-796.

Penuliar, G. M., Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2015). Phenotypic and transcriptional profiling in *Entamoeba histolytica* reveal costs to fitness and adaptive responses associated with metronidazole resistance. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 354.

Peters, T. E., Kreuels, B., Addo, M. M., Tannich, E., & Rothe, C. (2021). Risk factors for and management of metronidazole-refractory giardiasis in international travellers: A retrospective analysis. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *43*, 102090.

Popruk, S., Adao, D. E. V., & Rivera, W. L. (2021). Epidemiology and subtype distribution of *Blastocystis* in humans: a review. *Infection, Genetics and Evolution*, *95*, 105085.

Pramanik, P. K., Alam, M. N., Chowdhury, D. R., & Chakraborti, T. (2019). Drug resistance in protozoan parasites: an incessant wrestle for survival. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *18*, 1-11.

Rajamanikam, A., Hooi, H. S., Kudva, M., Samudi, C., & Kumar, S. (2019). Resistance towards metronidazole in *Blastocystis* sp.: A pathogenic consequence. *Plos One*, *14*(2), e0212542.

Rojas-Lopez, L., Marques, R. C., & Svard, S. G. (2022). *Giardia duodenalis*. *Trends in Parasitology*.

Saghaug, C. S., Klotz, C., Kallio, J. P., Brattbakk, H.-R., Stokowy, T., Aebischer, T., Hanevik, K. (2019). Genetic variation in metronidazole metabolism and oxidative stress pathways in clinical *Giardia lamblia* assemblage A and B isolates. *Infection and Drug Resistance*, *12*, 1221.

Stensvold, C. R., Smith, H. V., Nagel, R., Olsen, K. E., & Traub, R. J. (2010). Eradication of *Blastocystis* carriage with antimicrobials: reality or delusion? *Journal of Clinical Gastroenterology*, *44*(2), 85-90.

Wu, Z., Mirza, H., & Tan, K. S. W. (2014). Intra-subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in *Blastocystis* subtype-7. *Plos Neglected Tropical Diseases*, *8*(5), e2885.

BÖLÜM 9

HELİCOBACTER TÜRLERİNİN BEYİN-BAĞIRSAK AKSINDAKİ ROLÜ

Dr. Öğrt. Üyesi TUBA GÜL[1]

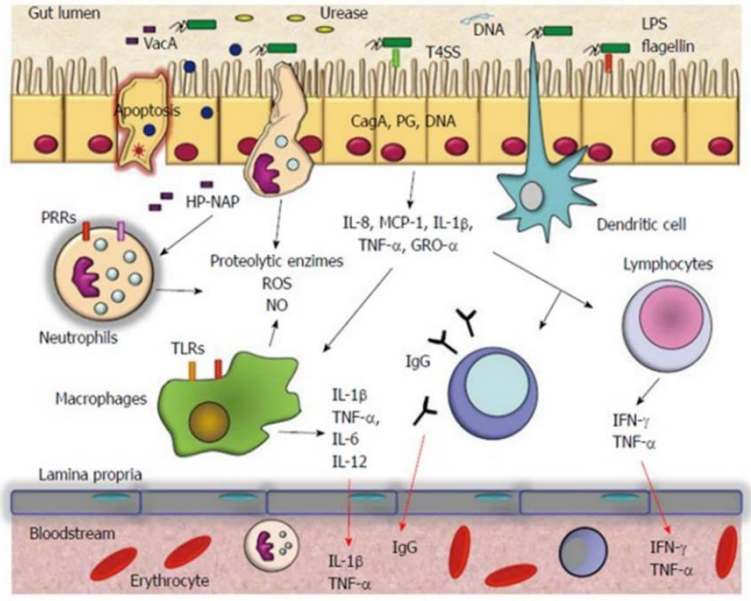
[1]Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Nöroloji Anabilim Dalı, Ordu/Türkiye. tglyzc@hotmail.com, Orcid ID: 0000-0001-6003-5975

GİRİŞ

İnsan mikrobiyotası, vücudumuzda yaşayan ve büyük çoğunluğu insan bağırsağında bulunan trilyonlarca simbiyotik mikrobiyal hücre içerir. Bu kommensal mikroplar, sağlığımız ve hayatta kalmamız için gıda sindirimi, bazı ilaçların aktivasyonu, enfeksiyonları önleme dahil olmak üzere gerekli olan çeşitli işlevleri yerine getirir ve bağışıklık sistemimizin olgunlaşmasında rol oynayabilirler. (Alvarez-Arellano ve ark, 2014)

Son çalışmalar sindirim sistemindeki mikrobiyotanın, yani mikrobiyom-bağırsak-beyin ekseni olarak adlandırılan; nöronal yol (enterik sinir sistemi ve vagus siniri), endokrin yol (örn. kortizol), metabolik yol (örn. zincirli yağ asitleri (SCFA'lar) ve triptofan) ve immünolojik yolun (örn. sitokinler ve immün hücreler) çeşitli mekanizmalarla etkilenmesi sonucunda, nörolojik aksın olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir. (Gorlé ve ark,2021).

H. pylori, mide, bağırsak ve karaciğeri kolonize eden, organizmada kalıcı olarak yaşayabilen Gram negatif bir bakteri olup, insan nüfusunun %50'sinden fazlasını kronik olarak enfekte ettiği gösterilmiştir. *H. pylori* enfeksiyonu, esas olarak sistemik enflamasyon, moleküler taklit ve ilaçların emilimine müdahale ederek; romatoid artrit, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, astım ve kanser, depresyon, anksiyete, Alzheimer Tipi Demans, Parkinson Hastalığı, Multipl skleroz (MS), vb. sistemik ve nörolojik hastalıkların gelişiminde rol alması ve hastalık progresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Enfekte ettiği bireyin genetik yapısına ve yaşam tarzına bağlı değişkenlik gösterebilen, şiddetli ya da hafif derecelerde, akut veya kronik inflamatuar yanıtlar ortaya çıkarmaktadır. *H. pylori* nötrofillerin, makrofajların, dentritik hücrelerin, T ve B hücrelerinin mide mukozasına infiltrasyonu ve interlökin (IL)-8, tümör nekroz faktörü (TNF)-α, IL-6, IL-1β, IL-12, IL-10 ve interferon (IFN)-y gibi sitokinlerin salınımını tetikleyerek, hücrelere direk etki ile veya proliferasyon ve apoptoz fizyolojisinde değişikliklere neden olarak dejeneratif etkisini gösterir. *H. pylori* enfeksiyonu eradike edildiğinde bu kimyasal sitokinlerin seviyeleri azalmaktadır (Alvarez-Arellano ve ark, 2014) (Şekil 1).



Şekil 1. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda inflamatuar yanıt (Alvarez-Arellano ve ark, 2014)

Bunun yanı sıra, *H. pylori* enfeksiyonu, adrenalin, noradrenalin, dopamin, serotonin ve asetilkolin gibi çeşitli nörotransmitterlerin salınmasına, serbest radikallerin üretimine ve vazoaktif intestinal peptid (VIP) ve c-fos gibi nöropeptid ekspresyonunda değişikliklere yol açarak, aksonal/nöronal hasara neden olur (Budzynski ve ark, 2014; Meng ve ark, 2016).

Nötrofiller ve makrofajlar; reaktif oksijen ve nitrojen türlerini serbest bırakarak, mide mukoza hücrelerinde gen ekspresyonunda irreversible değişikliklere neden olabilir (Ando ve ark, 2006).

IL-8; Nötrofillerin bir kemoatraktanı olup, *H. pylori* enfeksiyonu ile en erken uyarılan kemokinlerden biridir. IL-8, otoimmün hastalığa verilen yanıtlara ve bakteriyel enfeksiyona ve aracılık eder (Matsuo ve ark, 2009).

IL-6; hücresel farklılaşma, hayatta kalma, apoptoz ve çoğalma ile ilgili hedef genleri aktive ederek ve antiapoptotik sinyalleri indükleyerek inflamasyonu kronik bir sürece taşıyabilir (Lin ve ark, 2007).

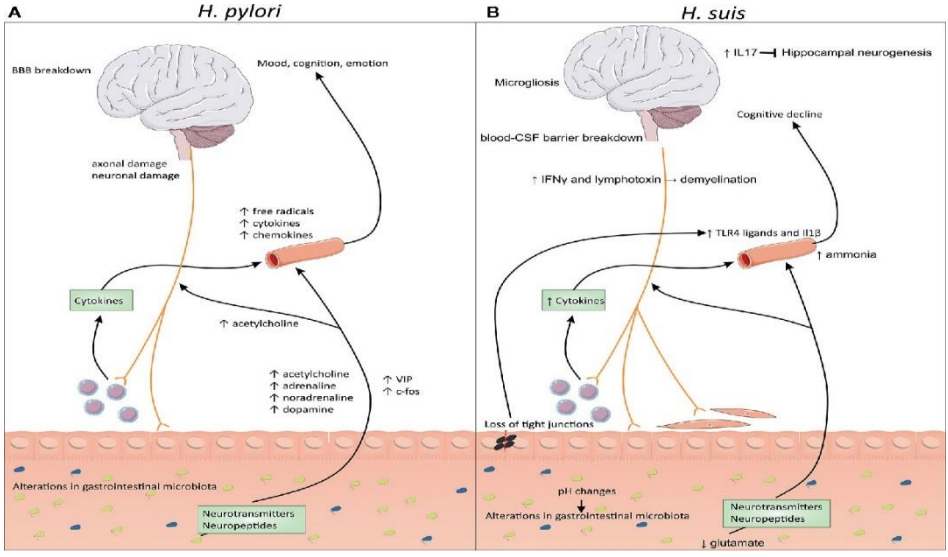
IFN-y; gastrik asit üretiminde önemli rolü vardır ve seviyeleri gastritte bulunan hasarla doğru orantılı olarak artar. IFN-y'nin santral sinir sisteminde

inflamasyon sürecinin de düzenleyici rolü olmasının yanı sıra, oligodendroglial hücrelerin proliferasyonunu azaltarak demiyelinizan süreçlerde rolü olduğu gösterilmiştir (Gorlé,ve ark, 2021).

IL-1β; etkileri olumlu olan bir sitokin olup, Helicobacter-spesifik T yardımcı (Th)1 ve Th17 yanıtları oluşturarak, *H. pylori* ilişkili gastrit ve gastrik pre-neoplaziye karşı koruyucu bağışıklık geliştirilmesini sağlar ve *H. pylori* enfeksiyonunun kontrolünde rol alır (Hitzler ve ark, 2012).

IL-10; B hücreleri ve Th2 lenfositleri uyarıp, ayrıca Th1 lenfositleri inhibe ederek, proinflamatuar sitokinlerin üretimini engelleyen ve sonuç olarak inflamasyon sürecinin iyileşmesinde olumlu etkisi olan bir anti-inflamatuar sitokindir (Xue ve ark, 2012).

H. pylori olmayan Helicobacter (NHPH) türleri, domuzlar, köpekler, kediler ve insan dışı primatlar dahil olmak üzere çeşitli konakçıların midelerinde rapor edilmiştir ve bazılarının zoonotik potansiyeli olan birçok mide türü tanımlanmıştır. Bu türlerden *Helicobacter suis*, zoonotik etkinliği olan, gastrit, peptik ülser ve MALT lenfomaya neden olan, domuzların ve insan olmayan primatların midesini doğal olarak kolonize eden ve insanlarda en yaygın olan gastrik NHPH türüdür (Haesebrouck ve ark, 2009; Flahou ve ark, 2016) (Şekil 2).



Şekil 2. *Helicobacter pylori* ve Non-*H. pylori* Helicobacter (NHPH) enfeksiyonu sırasında mikrobiyom-bağırsak-beyin eksenindeki değişiklikler (Gorlé ve ark, 2021).

Yapılan hayvan deneylerinde *H. suis* enfeksiyonu ile; gastrointestinal bariyerin geçirgenliğinin arttığı, kan-beyin omurilik sıvısı bariyeri yoluyla beyin homeostazını etkileyen sistemik inflamasyona yol açtığı, depresyonla bağlantılı olduğu bilinen IL-17 düzeylerini arttırarak yetişkin hipokampus nörojenezini bloke ettiği, oligodendrosit toksisitesi nedeniyle demiyelinizasyona neden lenfotoksin (LT)-α ve -β seviyelerini arttırdığı, meninkslerdeki B-hücrelerindeki kemokin olan CXCL13 seviyesinde artış yaparak, nöral hasarın artmasına ve hastalık progresyonuna neden olduğu, virülans faktörü γ-glutamil transpeptidaz (GGT) ile glutamat, aspartat ve γ-amino butirik asit (GABA) nörotransmitterlerinin öncül molekülü olan glutaminin azalmasına ve nöral iletimde bozulmalara neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca üreaz enzimi yoluyla ürenin amonyağa dönüşümünü indükleyerek, nöropsikiyatrik ve nörolojik semptomlarla ilişkili ensefalopatiye yol açtığı rapor edilmiştir. (Gorlé, ve ark, 2021).

Başka bir NHPH türü olan *H. felis* enfeksiyonunun, mikrobiyotanın yapısını değiştirerek hafıza, dikkat ve öğrenmeyi düzenlemede önemli olan ve akıl hastalıklarında tedavi edici etkileri bulunan maddelerin düzeylerinde değişimlere yol açtığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Anksiyete ve depresyonu azaltan asetilkolin salgıladığı gösterilmiş olan Lactobacillus düzeylerinde azalmaya yol açarken, varlığı otizmle ilişkilendirilmiş olan Clostridium düzeylerinde artmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Liu ve ark, 2018; Argou-Cardozo ve ark, 2018).

Beyin MRG' sindeki beyaz cevher lezyonları hipertansiyon, diyabet, ateroskleroz gibi nedenlerin yanı sıra, migren hastalarında da görülmektedir. Endoskopik mide biyopsisi histopatolojik incelemesi ile *H. pylori* saptanan hastalarda yapılan bir çalışmada, *H. pylori* pozitif migren olan ve diğer etiyolojilere sahip olmayan hastaların beyin MRG' sinde beyaz cevher lezyonlarının, diğer değişkenlere göre 2,5 kat daha yüksek oranda olduğu gösterilmiştir (Öcal ve ark, 2022).

Kronik *H. pylori* enfeksiyonu veya bu nedenle sürekli olarak alınan proton pompa inhibitörü ilaçlar, B12 vitamin emilim defektine neden olarak, kan homosistein düzeylerinde yükselmeye ve buna bağlı olarak demans klinik bulgularında artma, psödodemans, iskemik inmeye eğilim, Subakut kombine dejenerasyon gibi nörolojik hastalara yol açmaktadır. Gerek gıdalar gerekse ilaçlarla oral yolla alınan *L. dopa*'nın emilimini azaltarak, parkinson hastalarında

kliniği kötüleştirici etkide bulunmaktadır. *H. pylori* enfeksiyonunun (MPTP) yan ürünü olan 1-metil-4-fenil-1,2,36-tetrahidropiridin, substantia nigrada dejeneratif etki göstermekte ve dopamin düzeylerinde azalmaya neden olarak parkinson hastalığına katkıda bulunabilmektedir (Malik ve ark, 2022).

H. pylori enfeksiyonu, sistemik inflamatuar ve otoimmün süreçleri tetikleyerek nörodejeneratif etkisi ile başta Multipl Skleroz (MS) olmak üzere birçok demiyelinizan ve nörodejeneratif hastalığın etiyopatogenezi için de suçlanmaktadır (Smyk ve ark, 2014; Ram ve ark, 2013).

Yapılan bir çalışmada, Nöromiyelitis Optika (NMO) hastalarının %82'sinde ve MS hastalarının %73 ünde *H. pylori* için seropozitif sonuç saptanmıştır. NMO için spesifik olan Anti-aquaporin 4 antikoru varlığının, *H. pylori* pozitifliği ile istatiksel olarak anlamlı olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir (Long ve ark, 2013).

Yunan toplumunda yapılan başka bir çalışmada, kronik *H. pylori* enfeksiyonunun, Klinik İzole Sendromu olan hastalarda MS gelişim sürecini hızlandırıcı rol oynadığı ifade edilmiştir (Deretzi ve ark, 2015).

Başka bir çalışmada, *H. pylori* pozitif olan ve anti-*H. pylori* IgG serum düzeyleri yüksek olan Guillain Barre Sendromu (GBS) hastalarında, periferik sinirlerde proksimal bölgelerinde demiyelinizasyon ve klinik gidişte kötüleşme ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Álvarez-Arellano, 2014).

H. pylori enfeksiyonun tedavisinde "üçlü tedavi" önerilir ve genellikle; Amoksisilin veya metronidazol ile bir proton pompası inhibitörü ve Klaritromisin ile tedavi tercih edilir. Araştırıcılar, kronik *H. pylori* enfeksiyonu olan ve antibiyotik tedavisi gören hastaların incelenmesi sonucunda, akut nöropsikiyatrik semptomlar ve antibiyotikler arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Neufeld ve ark, 2017).

Yapılan çalışmalarla da ortaya konduğu üzere, *H. pylori* enfeksiyonunun, sinir sistemi başta olmak üzere tüm sistem tutulumları açısından ne kadar önemli olduğu gayet aşikardır. Daha geniş kapsamlı ve özellikle insan deneklerle ve kontrol grupları ile yapılacak çalışmalar ve araştırmalar sayesinde, hastalıkların etiyopatogenezini aydınlatmak, nörolojik hastalıkları yönünden tedaviye dirençli hastalarda olası altta yatan olumsuz etkenleri saptayarak, tedavi seçeneklerini zenginleştirmek ve henüz araştırılmamış başka nörolojik ya da otoimmün sistemik hastalıklardaki rolünü belirlemek adına bilime büyük katkı sağlanacaktır.

Bunun yanı sıra, *H. pylori* olmayan Helicobacter (NHPH) türleri konusunda da farkındalık oluşmalı ve tespitine yönelik laboratuvar yöntemleri geliştirmek adına daha ayrıntılı çalışmalar yapılmalıdır.

Yapılacak çalışmaların, farklı ırktaki ve değişik sosyal yaşam koşullarındaki bireylerle ve çok merkezli olarak yapılması, sonuçların değerlendirilmesinde, Helicobacter enfeksiyonlarının genetik ve diğer etkenlerle gösterebileceği değişkenliği en aza indirmek adına daha uygun olacaktır. Ayrıca, bu tür araştırmaların hipotez ve dizayn aşamasında en doğru yaklaşımları saptamak, çalışmadan elde edilecek olumlu ve uygulanabilir sonuçların, sistemdeki tüm hastalar için kullanılabilir olması ve tanısal yönden kolay uygulanabilir olması gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

Álvarez-Arellano, L., & Maldonado-Bernal, C. (2014). *Helicobacter pylori* and neurological diseases: Married by the laws of inflammation. World journal of gastrointestinal pathophysiology, 5(4), 400. doi: 10.4291/wjgp.v5.i4.400.

Ando, T., Goto, Y., Maeda, O., Watanabe, O., Ishiguro, K., & Goto, H. (2006). Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, *12*(2), 181.

Argou-Cardozo I, Zeidan-Chulia F. (2018). Clostridium Bacteria and Autism Spectrum Conditions: A Systematic Review and Hypothetical Contribution of Environmental Glyphosate Levels. Med Sci (Basel) 6(2). doi: 10.3390/medsci6020029.

Backert, S., & Yamaoka, Y. (2016). *Helicobacter pylori* Research. Springer, Japan http://dx. doi. org/10.1007/978-4-431-55936-8.

Budzynski J, Klopocka (2014). M. Brain-gut axis in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. World J Gastroenterol 20(18):5212–25. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5212.

Deretzi, G., Gavalas, E., Boziki, M., Tsiptsios, D., Polyzos, S. A., Venizelos, I., et. al. & Kountouras, J. (2016). Impact of *Helicobacter pylori* on multiple sclerosis-related clinically isolated syndrome. Acta Neurologica Scandinavica, 133(4), 268-275.

Flahou, B., Haesebrouck, F., & Smet, A. (2016). Non- *Helicobacter pylori* Helicobacter infections in humans and animals. In *Helicobacter pylori* Research (pp. 233-269). Springer, Tokyo.

Gorlé, N., Bauwens, E., Haesebrouck, F., Smet, A., & Vandenbroucke, R. E. (2021). Helicobacter and the potential role in neurological disorders: there is more than Helicobacter pylori. Frontiers in Immunology, 11, 584165.

Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Baele, M., Meyns, T., et.al. & Ducatelle, R. (2009). Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. Clinical microbiology reviews, 22(2), 202-223.

Hitzler, I., Sayi, A., Kohler, E., Engler, D. B., Koch, K. N., Hardt, W. D., & Müller, A. (2012). Caspase-1 has both proinflammatory and regulatory properties in Helicobacter infections, which are differentially mediated by its substrates IL-1β and IL-18. The Journal of Immunology, 188(8), 3594-3602.

Lin, M. T., Lin, B. R., Chang, C. C., Chu, C. Y., Su, H. J., Chen, S. T., et.al. & Kuo, M. L. (2007). IL-6 induces AGS gastric cancer cell invasion via activation of the c-Src/RhoA/ROCK signaling pathway. International journal of cancer, 120(12), 2600-2608.

Liu, L, Zhu, G. Gut-Brain Axis and Mood Disorder. Front Psychiatry (2018). 9:223:223. doi: 10.3389/fpsyt.2018.00223,

Long, Y., Gao, C., Qiu, W., Hu, X., Shu, Y., Peng, F., & Lu, Z. (2013). *Helicobacter pylori* infection in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. Neuroimmunomodulation, 20(2), 107-112.

Malik, M. K., Ahmed, K., Azeem, M., & Ranjha, N. I. (2022). Neurological Manifestations of *H. pylori* Infection. Pakistan Journal of Medical & Health Sciences, 16(04), 1086-1086.

Matsuo, Y., Ochi, N., Sawai, H., Yasuda, A., Takahashi, H., Funahashi, H., et. al. & Guha, S. (2009). CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1α co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. International journal of cancer, 124(4), 853-861.

Meng, WP, Wang, ZQ, Deng, JQ, Liu, Y, Deng, MM, Lu, MH. (2016). The Role of *H. pylori* CagA in Regulating Hormones of Functional Dyspepsia Patients. Gastroenterol Res Pract 2016:7150959. doi: 10.1155/2016/7150959.

Neufeld, N. H., Mohamed, N. S., Grujich, N., & Shulman, K. (2017). Acute neuropsychiatric symptoms associated with antibiotic treatment of *Helicobacter pylori* infections: a review. Journal of Psychiatric Practice, 23(1), 25-35.

Öcal, S., Öcal, R., & Suna, N. (2022). Relationship between *Helicobacter pylori* infection and white matter lesions in patients with migraine. *BMC neurology*, *22*(1), 1-8.

Ram, M., Barzilai, O., Shapira, Y., Anaya, J. M., Tincani, A., Stojanovich, L., et. al. & Shoenfeld, Y. (2013). *Helicobacter pylori* serology in autoimmune diseases–fact or fiction? *Clinical chemistry and laboratory medicine*, *51*(5), 1075-1082.

Smyk, D. S., Koutsoumpas, A. L., Mytilinaiou, M. G., Rigopoulou, E. I., Sakkas, L. I., & Bogdanos, D. P. (2014). *Helicobacter pylori* and autoimmune disease: cause or bystander. *World journal of gastroenterology: WJG*, *20*(3), 613.

Xue, H., Lin, B., An, J., Zhu, Y., & Huang, G. (2012). Interleukin-10-819 promoter polymorphism in association with gastric cancer risk. BMC cancer, 12(1), 1-11.

BÖLÜM 10

GLENFATİK SİSTEM: BEYNİN TEMİZLİK SANTRALİ

Doç. Dr. Gülay HACIOĞLU[1]

[1]Giresun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı, Giresun, Türkiye. gulayhacioglu@yahoo.com, Orcid ID: 0000-0002-8528-2371

GİRİŞ

Merkezi sinir sistemi (MSS)'nde, toplam su içeriğinin yaklaşık %60-68'i hücre içerisinde yer alırken, kalan %32-40'ı hücre dışı bölmeyi işgal eder (Jessen ve ark., 2015). Ekstrasellüler sıvı daha sonra, parankim hücrelerini çevreleyen ve beyin suyunun %12-20'sini temsil eden interstisyel sıvı ve her biri intrakraniyal sıvının %10'unu oluşturan beyin omurilik sıvısı (BOS) ve kan bölümlerine ayrılabilir (Jessen ve ark., 2015). Periferik organlarda, interstisyel sıvıya salınan hücresel metabolizma ürünleri ve pencereli bir kapiller yataktan süzülen kolloidler ve sıvı, kan dolaşımına paralel olarak uzanan bir lenfatik damar ağı yoluyla venöz kana temizlenir (Oliver, 2004; Trevaskis ve ark., 2015). Bununla birlikte, MSS, anatomik olarak tanımlanmış lenfoid dokulardan yoksun olan vücudun tek organıdır ve sonuç olarak, sıvı dengesi ve interstisyel atıkların giderilmesi için benzersiz uyarlamalar geliştirmiştir (Trevaskis ve ark., 2015; Plog ve Nedergaard, 2018).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, beyinde psödo-lenfatik bir işleve hizmet eden glia bağımlı bir perivasküler ağ olan glenfatik sistemin keşfine yol açmıştır (Iliff ve ark., 2013; Xie ve ark., 2013). Glenfatik sistemin adı, onu oluşturan unsurlarla ilişkilendirilmiştir (Valenza ve ark., 2020). Bunlar en büyük beyin glial hücreleridir, MSS'nin kalan hücrelerini bir ağ gibi çevreleyen ve devasa dallar oluşturan astrositlerdir. Glenfatik yol içinde, BOS periarteryal boşluklar yoluyla beyne girer, perivasküler astrositik aquaporin-4 (AQP-4) yoluyla interstisyuma geçer ve daha sonra interstisyel sıvının perivenöz drenajını sağlar (Hablitz ve Nedergaard, 2021).

Glenfatik sistem kavramı nispeten yeni olduğu için, burada sistemin temel yapısal unsurlarını, organizasyonunu, düzenlemelerini ve işlevlerini gözden geçirmek gereklidir. Glenfatik fonksiyonun sekteye uğraması, nörodejeneratif bozukluklarda, travmatik beyin hasarında ve inmede patolojiye katkıda bulunabilir.

Perivasküler boşluk

Beyin, dört sıvı kompartmanından oluşur: BOS, interstisyel sıvı, hücre içi sıvısı ve kan vaskülatürü. Kan, beyin parankimi ve BOS'tan sırasıyla kan-beyin ve kan-BOS bariyerleri ile ayrı tutulur. Bu bariyerler beynin hücre dışı ortamını korumak için gereklidir, çünkü farklı sıvı bölümlerinin iyonik ve biyokimyasal bileşimi farklıdır. Kan-beyin bariyerinin damarları endotelyal

hücrelerden oluşurken, kan-BOS bariyeri esas olarak koroid pleksus epitel hücrelerinden meydana gelir. Pleksus kılcal endotel hücreleri, beyindeki diğer kılcal damarların aksine sıkı bağlantılardan yoksundur, bu nedenle makromoleküllere daha geçirgen olurlar. Koroid pleksus epitel hücreleri ise sıkı bağlantılarla bağlanır. Koroid pleksusta makromoleküllerin trans-epitelyal taşınması epitelyal taşıyıcılar tarafından düzenlenerek, kandan BOS'a hangi makromoleküllerin gireceğini belirler (Jessen ve ark., 2015).

İnterstisyel alandaki fazla sıvı ve çözünmüş maddelerin temizlenmesi doku homeostazisi için kritiktir. Periferal dokularda lenfatik sistem, hücreler arasındaki interstisyel boşluklardan proteinleri ve metabolik atıkları temizler (Bacyinski ve ark., 2017). Lenfatik ağ, dokuların tüm bölümleri boyunca uzanır ve lenf damarlarının yoğunluğu doku metabolizması oranı ile doğrudan ilişkilidir. Beyin parankimi ve omurilik, bu dokuların yüksek metabolik hızı ve ekstraselüler sıvıdaki değişikliklere duyarlılığı göz önüne alınırsa; tipik, histolojik olarak tanımlanabilir bir lenfatik sistemden yoksundur (Abbott, 2004). Yıllar boyunca, MSS'deki atık maddelerin, interstisyel sıvının konvektif kütle akışı ile BOS'a geçerek temizlendiği kabul ediliyordu. Bununla birlikte, sonraki çalışmalar, solüt taşınımının beynin kan damarlarını çevreleyen anatomik ve fonksiyonel olarak farklı bir alan aracılığıyla meydana geldiğini ileri sürmüştür (Iliff ve ark., 2012). Perivasküler boşluk olarak adlandırılan bu alan glikoz, laktat ve beta amiloid tasfiyesi için olası bir yol olarak tanımlanmıştır. Iliff ve Nedergaard (2013) tarafından yönetilen bir araştırma ekibi, perivasküler boşluğun, interstisyel solütlerin temizlenmesi için bir yol olduğunu tam olarak ortaya koymuştur.

Perivasküler boşluk, beyin parankiminin oldukça karmaşık ve kıvrımlı interstisyel boşluğundan farklıdır ve glenfatik sistemin önemli bir özelliğidir. Perivasküler boşluğun uzaysal organizasyonunun ötesinde, glenfatik sıvı hareketinin astrositik düzenlenmesi için birincil kanıt, AQP-4'ün glenfatik sıvı taşınmasını kolaylaştırmasıdır (Iliff ve ark., 2012; Hubbard ve ark., 2015). AQP-4'ün ekspresyonu normalde paravenöz boşluğa bakan astrositik uç ayakların plazma membranına doğru yüksek oranda polarizedir ve distrofinle ilişkili kompleks tarafından sabitlenir (Iliff ve ark., 2012; Bacyinski ve ark., 2017). AQP-4'ün astrositik uç ayaklardan yanlış konumlandırılması, birçok çalışma hattında glenfatik arıza ile ilişkilendirilmiştir. Vasküler uç ayakları korumak için AQP-4 polarizasyonu kilit bir düzenleyici mekanizma oluştursa

da, astrositlerin ek mekanizmalarla glenfatik işlevi değiştirmesi muhtemeldir. Glenfatik fonksiyonun, sıvı akışına düşük dirençli optimize edilmiş perivasküler boşluklara büyük ölçüde bağımlı olduğu açıktır, ancak çok az çalışma, perivasküler boşluk şeklinin, geçirgenliğinin ve açıklığının uzun vadeli yeniden şekillenmesinin glenfatik işlev bozukluğu ile bağlantılı olup olmadığını test etmiştir. Yaşla birlikte, artan reaktif gliozis (Sabbatini ve ark., 1999) ve astrositlerin vasküler uç ayaklarına doğru AQP-4'ün polarize ekspresyonunda bir azalma ile birlikte glenfatik akış azalır. Hastalıkta serebrovasküler sistemin işlevselliği ve şekli değişir. Serebral amiloid anjiyopatide, amiloid β_{1-40} damar duvarlarında birikir ve damar zayıflamasına ve perivasküler boşluğun çökmesine neden olur. Hipertansiyon ve diyabetin sık görülen bir komplikasyonu olan küçük damar hastalığında, arteriyel sertleşme ve serebral arterlerin yeniden şekillenmesi perivasküler boşluğun genişlemesine neden olur (Jessen ve ark., 2015).

Glenfatik sistem: BOS-interstisyel sıvı değişimi için bir yolak

Glenfatik sistem, MSS'den çözünebilir proteinlerin ve metabolitlerin etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasını desteklemek için, astroglial hücrelerin oluşturduğu benzersiz bir perivasküler kanal sistemini kullanan, yakın zamanda keşfedilmiş makroskopik bir atık temizleme sistemidir. Atıkların giderilmesinin yanı sıra, beyindeki hacim iletimi ile ilgili glikoz, lipit, amino asit ve nörotransmiterler gibi atık olmayan bileşiklerin dağıtılmasına da yardımcı olabilir (Jessen ve ark., 2015). Glenfatik sistem, BOS'un periarteryal boşluklar boyunca subaraknoid boşluktan toplu hareketini sağlar, burada perivenöz boşluklar yoluyla parankimden çıkmadan önce parankim içindeki interstisyel sıvı ile karışır ve periferik lenfatik sisteme akar. Bu sıvı hareketi, bir adveksiyon ve difüzyon karışımı yoluyla meydana gelir ve doku ile perivasküler boşluk arasında venöz sisteme doğru net bir yön ile sıvının hızlı değişimini sağlar. İlginç olarak, glenfatik sistem esas olarak uykuda işlev görür ve uyanıklık sırasında büyük ölçüde devre dışı kalır (Jessen ve ark., 2015). Bu nedenle, tüm türler arasında biyolojik olarak uyku ihtiyacı, beynin β-amiloid de dahil olmak üzere, potansiyel olarak nörotoksik atık ürünlerinin ortadan kaldırılmasını sağlayan bir aktivite durumuna girmesi gerektiğini yansıtabilir.

Son çalışmalarda, BOS ve interstisyel sıvının sürekli değiş-tokuş içerisinde olduğu saptanmıştır (Iliff ve ark., 2012). Bu değişim, periferal alan boyunca BOS'un konvektif akışıyla kolaylaştırılmıştır. Subaraknoid alandan BOS, arteriyel pulsatilite, solunum ve BOS basınç gradyanları kombinasyonu ile Virchow-Robin boşluğuna sürülür ve perivasküler boşluğun gevşek fibröz matriksi, BOS akışı için düşük dirençli bir otoyol olarak görülebilir. BOS'un yoğun ve kompleks beyin parankimine taşınması, astrositik sonlanmalarda eksprese edilen AQP-4 su kanalları ile kolaylaştırılır (Iliff ve ark., 2012; Iliff ve Nedergaard, 2013). Parankim içine BOS'un hareketi, büyük derin damarları çevreleyen perivenöz boşluklara doğru doku içindeki konvektif interstisyel sıvı akışlarını yönlendirir. İnterstisyel sıvı perivenöz alanda toplanır ve servikal lenfatik sistem yoluyla beyin dışına akar (Johnston ve ark., 2004; Murtha ve ark., 2014).

Glenfatik sistemin dinamikleri ilk kez 2012 yılında, farelerde iki-foton mikroskobu kullanılarak *in vivo* olarak karakterize edilmiştir. BOS'un sisterna magnaya enjekte edilen radyoaktif izleyiciler ile etiketlenmesiyle, Iliff ve ekibi (2012) söz konusu sıvının beyne kortikal pial arterler boyunca hızla girdiğini göstermiştir. Girişi, penetran arteriyoller boyunca Virchow-Robin boşluklarına akış izlemiştir. BOS izleyicileri rastgele dağılmak yerine parankime, perivasküler astrositik sonlanmalar tarafından sınırlanan vasküler düz kas hücrelerini çevreleyen periarteryal bir yoldan girip, esas olarak merkezi derin ve lateral-ventral kaudal rinal venler boyunca beyinden çıkış yapmıştır. Müteakip çalışmalar, periarteriyel BOS'un beyin parankimi içine ve içinden konvektif hareketinin, interstisyel solütlerin perivenöz drenaj yollarına temizlenmesini kolaylaştırdığını göstermiştir. Solütlerin bu makroskobik temizlenme mekanizması, amiloid plakları içeren proteinlerin birikmesiyle karakterize olan Alzheimer hastalığı dahil, birçok nörodejeneratif hastalık için özellikle önemli olabilir (Weller ve ark., 2008; Hawkes ve ark., 2011). β-amiloidin glenfatik yolla temizlenip temizlenmediğini saptamak için, Iliff ve ark. (2012) fare striatumun içine radyoaktif işaretli amiloid $\beta_{1\text{-}40}$ enjekte etmişler ve β-amiloidin glenfatik perivenöz akış yolu boyunca fare beyninden hızla temizlendiğini bulmuşlardır.

MSS'den interstisyel sıvı drenajının anatomisini detaylandırmaya çalışan erken çalışmalarda, izlenebilir solütler doğrudan beyin parankimi içine enjekte edilmiş ve belirli zaman aralıklarından sonra, bu moleküllerin dağılımı

değerlendirilmiştir. Bu çalışmaların ilkinde, Blue Dextran 2000, sıçanların kaudat çekirdeğine enjekte edilmiş ve hem 15. dakikada hem de 24. saatte bu boyanın enjeksiyon bölgesinden izotropik olarak dağılmadığı, tercihen serebral kan damarları boyunca belirli yönlerde hareket ettiği görülmüştür (Cserr ve Ostrach; 1974). İnterstisyel akıntı bölgelerini daha net bir şekilde lokalize etmek için, sıçan striatumuna yine izleyici bir molekül enjekte edilmiş ve beynin hücre dışı boşluklarında yayılması için 4-8 saat izin verildikten sonra, izleyici molekülün perivasküler boşluklar içinde dağıldığı tespit edilmiştir (Cserr ve ark., 1977). İnterstisyel sıvının ve çözünen maddenin bu perivasküler drenajının, en azından kısmen subaraknoid BOS'a yönlendirildiği görülmüştür (Cserr ve ark., 1977; Szentistvanyi ve ark., 1984).

Glenfatik sistem konsepti

Kemirgen beynindeki glenfatik sistem ve atık temizleme süreci, başlangıçta 3 aşamalı bir süreç olarak tanımlanmıştır: (1) BOS, sürekli olarak bazal sisternalardan ve serebral hemisferleri kaplayan subaraknoid boşluğa taşınır ve subaraknoid boşluktan toplu akışla periarteryal boşluklara girer; (2) BOS, astroglia uç ayaklarındaki AQP-4 su kanalları tarafından kolaylaştırılan periarteryal bölmeden interstisyel boşluğa itilir ve (3) interstisyel atık maddelerle karıştırılan BOS-hücrelerarası sıvısı sonra daha büyük merkezi damarların perivenöz kompartımanına doğru taşınır ve buradan sonunda lenfatiklerle sistemik dolaşıma çıkar (Iliff ve ark., 2012). Glenfatik sistem konseptiyle ilgili yeni bilgi, perivasküler bölmeden interstisyel alana hızlı, yüksek hacimli BOS taşınması ve atık drenajı için AQP-4 su kanallarının önerilen kritik rolüdür (Iliff ve ark., 2012; Benveniste ve ark., 2019).

Glenfatik sistem, çoğunlukla uyku sırasında MSS'den atıkları temizleyen bir damar ağıdır. Son kanıtlar, glenfatik sistemin işleyişinin aksayabileceğini ve beynin bazı hastalıklarına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Glenfatik taşıma, kemirgenlerde uyku esnasında maksimum aktivite gösterirken, hayvanlar uyanıkken inaktif duruma geçer (Xie ve ark., 2013). Uyku yoksunluğu, değiş-tokuşun çoğunun gerçekleştiği astrosit tarafından eksprese edilen kanalın yerini etkileyerek sistemi yavaşlatır. Bununla birlikte, yaşlanma süreci de glenfatik işlevi ve bu kanalın doğru lokalizasyonunu bozar (Kress ve ark., 2014), ancak egzersiz farelerde

yaşlanmanın zararlı etkilerini azaltabilir, bu da egzersizin nöroprotektif olduğu olası bir yola işaret eder. Yaşlanmanın glenfatik işlevi bozabilmesinin nedenleri arasında: azalmış BOS, azalmış esneklik ve dolayısıyla arterlerin nabız atışı ve glenfatik damarları oluşturan glial hücrelerdeki değişikliklerdir. Beyin yaşlanması, nörolojik hastalık gelişimine katkıda bulunan primer faktörlerden biridir.

Alzheimer hastalığı gibi birçok nörodejeneratif hastalığın birincil nedeni protein agregasyonudur. Kemirgenlerde uyku veya anestezi sırasında glenfatik sistem, Alzheimer hastalığı sırasında beyinde oluşan plakların ana bileşeni olan β-amiloid gibi kümelenmiş proteinleri temizler. β-amiloid proteininin birikmesi, glenfatik taşımayı azaltabilir (Peng ve ark., 2016). Alzheimerli kişiler, sağlıklı meslektaşlarından daha az uyurlar ve bu da glenfatik sistem işlevini daha da azaltabilir. Hayvan modelleri, azalmış glenfatik taşımanın Alzheimer hastalığının ortaya çıkışından önce gelişebileceğini göstermiştir; bu nedenle bilim adamları artan glenfatik taşımanın hastalığın başlangıcını erteleyebileceğini varsayıyorlar (Benveniste ve ark., 2019). Nörodejeneratif hastalıklardaki olası işlevine ek olarak, glenfatik sistem bozukluğu travmatik beyin hasarı, kortikal yaygın depresyon ve felçte de rol oynayabilir. Egzersizin glenfatik işlevi sürdürdüğü bulgusu, hastalığın başlangıcında erken kullanıldığında muhtemelen etkili olacak yeni tedavilere yol açabilir. Manyetik rezonans görüntüleme veya pozitif emisyon tomografisi ile glenfatik akışı değerlendirmenin yolları şu anda klinik teşhis araçları olarak geliştirilme aşamasındadır.

Glenfatik sistemin özellikleri

Glenfatik sistemin keşfine özgü özellikler aşağıdaki gibidir: (1) periarteryal boşlukta BOS girişi ile başlayan ve ardından perivenöz boşluklar boyunca "kirli" interstisyel sıvının çıkışı ile başlayan sıvı taşınmasının yönü; (2) bir metabolik atık ürünü olan β-amiloidin glenfatik sistem yoluyla ihraç edildiği gösterilmiştir; (3) sıvı aktarımı, astrositlerin vasküler uç ayaklarındaki su kanalı AQP-4'ün polarize ekspresyonuna bağlıdır; ve (4) nöropil (akson, dendrit ve sinapsların meydana getirdiği ağ sistemi) içine sıvı taşınması ve BOS girişi, metabolik atıkların temizlenmesindeki bir artışa paralel olarak

uyku sırasında çarpıcı bir yukarı regülasyon sergiler (Hablitz ve Nedergaard, 2021).

Periferdeki lenfatik damarlar, sıvının geri akışını önlemek için valflerle donatılmıştır (Breslin, 2014). Glenfatik sistemin, yönlendirilmiş sıvı hareketini desteklemek için nöropil içinde benzer tek yönlü geçit mekanizmaları gösterip göstermediği araştırılmaya devam etmektedir. Glenfatik sistem potasyumu, laktat gibi atık metabolitleri ve β-amiloid ve tau dahil peptitleri/proteinleri temizleyebilir (Iliff ve ark., 2012; Xie ve ark., 2013; Kress ve ark., 2014; Lundgaard ve ark., 2017).

Glenfatik-nöronal etkileşimler

Beyin, karmaşık davranışları, görevleri ve düşünceleri yürütmek için sinyal üreten nöron ağlarının karmaşıklığı nedeniyle benzersiz bir organdır. Nöral sinyalleşme, interstisyel iyon konsantrasyonları üzerinde sıkı düzenleme gerektirir (Rasmussen ve ark., 2020). Örneğin, interstisyel iyon konsantrasyonunu basitçe değiştirmek, daha düşük interstisyel kalsiyum, magnezyum ve hidrojen iyonu ve daha yüksek potasyum ile beyin aktivitesini uyaran uyarılma durumu değişikliklerine neden olabilir (Ding ve ark., 2016). Astrositler, interstisyel potasyum konsantrasyonlarının ve pH'ın oldukça dinamik düzenleyicileridir ve muhtemelen diğer birkaç iyonun konsantrasyonlarını ve ayrıca interstisyel boşluk hacmini etkilerler (Verkhratsky ve Nedergaard, 2018). Şu anda, glenfatik sistemin interstisyel iyon konsantrasyonlarındaki duruma bağlı değişikliklere bağımsız olarak katkıda bulunup bulunmadığı bilinmemektedir, ancak sıvı transportu ve interstisyel sıvının iyon bileşiminin yakından bağlantılı olduğunu düşünmek için gerekçeler vardır.

Beyin çapındaki nöronal aktivite ile glenfatik aktiviteyi birbirine bağlayan en güçlü kanıt, uyku çalışmalarından elde edilmiştir. Hızlı olmayan göz hareketi (NREM) uykusu, büyük amplitüdlü, senkronize, 1-4 Hz'lik yavaş salınımların hâkim olduğu faz dahil olmak üzere, farklı beyin elektriksel aktivite paternlerine sahip dört aşamadan oluşur. NREM uykusu sırasında ve yüksek 1-4 Hz aktivite prevalansı ile karakterize edilen anestezi durumu altında beyne daha büyük BOS hacimlerinin verilmesini teşvik etmek için glenfatik akışın arttığına dair güçlü kanıtlar vardır (Xie ve ark., 2013; Hablitz ve ark., 2019). İnsanlarda, dördüncü ventrikül içindeki BOS hareketinin

hacmi de NREM uykusu sırasında artar ve AQP-4 haplotipi, NREM uyku mimarisindeki değişikliklerle ilişkilidir, bu da beyindeki sıvı hareketi ile nöronal aktivite arasında bir bağlantı olduğunu düşündürür (Fultz ve ark., 2019; Ulv Larsen ve ark., 2020). Hızlı göz hareketi (REM) uykusu sırasında, korteks, uyanıklık sırasındaki desene yüzeysel olarak benzeyen düşük voltajlı, yavaş senkronize olan nöronal aktivite sergiler. Uyanma sırasında olduğu gibi, REM uykusu sırasında glenfatik akışın azalıp azalmadığı henüz belirlenmemiştir.

Glenfatik toplu sıvı sinyalizasyonu

Bu noktaya kadar, muhtemelen glenfatik sistemin birincil işlevi olan BOS/interstisyel sıvı değişimi ve atık temizlemeye odaklandık. BOS'un hareketlerine daha da yakından bakacak olursak, esas olarak ventriküllerde bulunan koroid pleksus tarafından üretildikten sonra, lateral ventrikülden üçüncü ventriküle ve son olarak Magendie ve Luschka foramenleri yoluyla beyinden çıktığı dördüncü ventrikül yönünde taşınmaya maruz kalır. Foramenlerden BOS, sisterna magnaya girer, akabinde, ya meningeal lenfatik sistem yoluyla MSS'den şant edilir ya da glenfatik sistem tarafından tekrar beyne yönlendirilir. Glenfatik sisteme giriş yolu, BOS'un baziler arteri çevreleyen perivasküler boşluk boyunca Willis çemberine hareket ettiği pontin sarnıç yoluyladır. BOS daha sonra ön, orta ve arka serebral arterlerin perivasküler boşlukları boyunca yükselir. Kemirgen çalışmaları, uyku sırasında, BOS'un mandibular lenf düğümlerine eşit derecede hızlı bir şekilde yeniden dağıtıldığı aktif faz ile karşılaştırıldığında, glenfatik sistem boyunca BOS taşınmasının hızlı olduğunu (dakikalar ila saatler) göstermiştir (Xie ve ark., 2013; Hablitz ve ark., 2020).

Beyin-BOS iletişiminin belki de en önemli örneği hipotalamus tarafından sunulur. Hipotalamus, yeme, içme, vücut ısısının düzenlenmesi, nöroendokrin salınım ve iç sirkadiyen zamanlama gibi temel fizyolojik ve davranışsal işlevleri kontrol eder. Anatomik olarak, hipotalamus, üçüncü ventrikülü çevrelediği, ventral olarak bazal sisternaların BOS havuzu ile temas halinde olduğu ve ventriküllerdeki BOS havuzu ile doğrudan etkileşime girebilen özel hücrelere, tanisitlere sahip olduğu için BOS'a erişmek için birincil konumdadır (Rodríguez ve ark., 2010). Vazoaktif intestinal peptid (VIP) ve arjinin vazopressin (AVP) gibi hipotalamik peptitler BOS'ta bulunur

(Burbach, 1982) ve vasküler tonusu doğrudan değiştirebilir, böylece potansiyel olarak nöropil boyunca glenfatik akışı düzenler (Henning ve Sawmiller 2001; Pelletier ve ark., 2014). Uyku ve sirkadiyen ritmin her ikisi de glenfatik işlevi düzenler.

Beyin ve MSS arasındaki bağışıklık gözetimi

Geleneksel lenfatik sistemin birincil özelliği, doku iltihabının durumunu izlemektir. Beyin ve çevre arasındaki bağışıklık çapraz konuşma anatomik olarak mümkün olsa da, glenfatik fonksiyonun sistemik bağışıklık tepkilerini değiştirip değiştiremeyeceği/nasıl değiştirebileceği tamamen keşfedilmiş durumda değildir. Bunun yanında, glenfatik sistemin çok önemli işlevi, MSS'nin immün sürveyansıdır. MSS immün sürveyansı, merkezdeki homeostazın korunmasına katkıda bulunur (Negi ve Das, 2018). Fizyolojik koşullar altında, BOS ve interstisyel sıvı boyunca lokal lenf düğümlerinden MSS'ye boşaltılan antijenlere karşı MSS içinde etkili bir bağışıklık tepkisi vardır. Bu, sessiz ama aktif bir bağışıklık tepkisinin beyinde her zaman işe yaradığını kanıtlar (Negi ve Das, 2018). Glenfatik yollar, antijenlerin ve bağışıklık hücrelerinin taşınmasına ve afferent ve efferent bağışıklık yolları yoluyla bilgi alışverişine izin verir. Akut lipopolisakkarit enjeksiyonları gibi bağışıklık sorunları, glenfatik işlevi bozar (Manouchehrian ve ark., 2021). Lenf düğümleri ve beyin arasındaki BOS dağılımının AQP-4'e bağlı olduğuna ve sirkadiyen zamanlama tarafından kontrol edildiğine dair kanıtlar vardır (Hablitz ve ark., 2020). Belki de doğrudan lenf düğümlerine BOS iletimini artırmak için böyle bir yol, gün boyunca bağışıklık tepkilerinin harekete geçirilmesinin anahtarıdır. Ek olarak, AQP-4 nakavt farelerin menenjit ve deneysel otoimmün ensefalomiyelit modellerinde nöroimmün patolojiyi azalttığı görülmüştür (Papadopoulos ve Verkman 2005; Li ve ark., 2009).

Sonuç olarak, glenfatik sistem interstisyel sıvının yönlü hareketinde, atıkları temizlemede ve potansiyel olarak beyin bağışıklığını düzenlemede merkezi role sahip olan beynin lenfatik analoğudur. Astrositler ve kan damarları, perivasküler boşluğun şeklini belirler ve sonuçta perivasküler sıvının hareketini kontrol eder. Glenfatik sıvı hareketi, sinyal moleküllerinin, ayrıca homeostaz ve spesifik davranışlarda rol oynadığı bilinen metabolitlerin küresel (beyin çapında) taşınmasının yanı sıra, yerel (bir beyin bölgesi içinde) taşınmasını da değiştirme potansiyeline sahiptir.

KAYNAKÇA

Abbott N. J. (2004). Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochemistry International*, 45(4), 545–552.

Bacyinski, A., Xu, M., Wang, W., & Hu, J. (2017). The Paravascular Pathway for Brain Waste Clearance: Current Understanding, Significance and Controversy. *Frontiers in Neuroanatomy*, 11, 101.

Benveniste, H., Liu, X., Koundal, S., Sanggaard, S., Lee, H., & Wardlaw, J. (2019). The Glymphatic System and Waste Clearance with Brain Aging: A Review. *Gerontology*, 65(2), 106–119.

Breslin J. W. (2014). Mechanical forces and lymphatic transport. *Microvascular Research*, 96, 46–54.

Burbach J. P. (1982). Neuropeptides and cerebrospinal fluid. *Annals of Clinical Biochemistry*, 19 (Pt 4), 269–277.

Cserr, H. F., Cooper, D. N., & Milhorat, T. H. (1977). Flow of cerebral interstitial fluid as indicated by the removal of extracellular markers from rat caudate nucleus. *Experimental Eye Research*, 25 Suppl, 461–473.

Cserr, H. F., & Ostrach, L. H. (1974). Bulk flow of interstitial fluid after intracranial injection of blue dextran 2000. *Experimental Neurology*, 45(1), 50–60.

Ding, F., O'Donnell, J., Xu, Q., Kang, N., Goldman, N., & Nedergaard, M. (2016). Changes in the composition of brain interstitial ions control the sleep-wake cycle. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6285), 550–555.

Fultz, N. E., Bonmassar, G., Setsompop, K., Stickgold, R. A., Rosen, B. R., Polimeni, J. R., & Lewis, L. D. (2019). Coupled electrophysiological, hemodynamic, and cerebrospinal fluid oscillations in human sleep. *Science (New York, N.Y.)*, 366(6465), 628–631.

Hablitz, L. M., & Nedergaard, M. (2021). The Glymphatic System: A Novel Component of Fundamental Neurobiology. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 41(37), 7698–7711.

Hablitz, L. M., Plá, V., Giannetto, M., Vinitsky, H. S., Stæger, F. F., Metcalfe, T., Nguyen, R., Benrais, A., & Nedergaard, M. (2020). Circadian control of brain glymphatic and lymphatic fluid flow. *Nature Communications*, 11(1), 4411.

Hablitz, L. M., Vinitsky, H. S., Sun, Q., Stæger, F. F., Sigurdsson, B., Mortensen, K. N., Lilius, T. O., & Nedergaard, M. (2019). Increased glymphatic influx is correlated with high EEG delta power and low heart rate in mice under anesthesia. *Science Advances*, 5(2), eaav5447.

Hawkes, C. A., Härtig, W., Kacza, J., Schliebs, R., Weller, R. O., Nicoll, J. A., & Carare, R. O. (2011). Perivascular drainage of solutes is impaired in the ageing

mouse brain and in the presence of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathologica*, 121(4), 431–443.

Henning, R. J., & Sawmiller, D. R. (2001). Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects. *Cardiovascular Research*, 49(1), 27–37.

Hubbard, J. A., Hsu, M. S., Seldin, M. M., & Binder, D. K. (2015). Expression of the Astrocyte Water Channel Aquaporin-4 in the Mouse Brain. *ASN Neuro*, 7(5), 1759091415605486.

Iliff, J. J., & Nedergaard, M. (2013). Is there a cerebral lymphatic system? *Stroke*, 44(6 Suppl 1), S93–S95.

Iliff, J. J., Wang, M., Zeppenfeld, D. M., Venkataraman, A., Plog, B. A., Liao, Y., Deane, R., & Nedergaard, M. (2013). Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF-interstitial fluid exchange in the murine brain. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(46), 18190–18199.

Iliff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., Benveniste, H., Vates, G. E., Deane, R., Goldman, S. A., Nagelhus, E. A., & Nedergaard, M. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β. *Science Translational Medicine*, 4(147), 147ra111.

Jessen, N. A., Munk, A. S., Lundgaard, I., & Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochemical Research*, 40(12), 2583–2599.

Johnston, M., Zakharov, A., Papaiconomou, C., Salmasi, G., & Armstrong, D. (2004). Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species. *Cerebrospinal Fluid Research*, 1(1), 2.

Kress, B. T., Iliff, J. J., Xia, M., Wang, M., Wei, H. S., Zeppenfeld, D., Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Liew, J. A., Plog, B. A., Ding, F., Deane, R., & Nedergaard, M. (2014). Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Annals of Neurology*, 76(6), 845–861.

Li, L., Zhang, H., & Verkman, A. S. (2009). Greatly attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in aquaporin-4 knockout mice. *BMC Neuroscience*, 10, 94.

Lundgaard, I., Lu, M. L., Yang, E., Peng, W., Mestre, H., Hitomi, E., Deane, R., & Nedergaard, M. (2017). Glymphatic clearance controls state-dependent changes in brain lactate concentration. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(6), 2112–2124.

Manouchehrian, O., Ramos, M., Bachiller, S., Lundgaard, I., & Deierborg, T. (2021). Acute systemic LPS-exposure impairs perivascular CSF distribution in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 34.

Murtha, L. A., Yang, Q., Parsons, M. W., Levi, C. R., Beard, D. J., Spratt, N. J., & McLeod, D. D. (2014). Cerebrospinal fluid is drained primarily via the spinal canal and olfactory route in young and aged spontaneously hypertensive rats. *Fluids and Barriers of the CNS*, 11, 12.

Negi, N., & Das, B. K. (2018). CNS: Not an immunoprivilaged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. *International Reviews of Immunology*, 37(1), 57–68.

Oliver G. (2004). Lymphatic vasculature development. *Nature Reviews. Immunology*, 4(1), 35–45.

Papadopoulos, M. C., & Verkman, A. S. (2005). Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13906–13912.

Pelletier, J. S., Dicken, B., Bigam, D., & Cheung, P. Y. (2014). Cardiac effects of vasopressin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 64(1), 100–107.

Peng, W., Achariyar, T. M., Li, B., Liao, Y., Mestre, H., Hitomi, E., Regan, S., Kasper, T., Peng, S., Ding, F., Benveniste, H., Nedergaard, M., & Deane, R. (2016). Suppression of glymphatic fluid transport in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 93, 215–225.

Plog, B. A., & Nedergaard, M. (2018). The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annual review of Pathology*, 13, 379–394.

Rasmussen, R., O'Donnell, J., Ding, F., & Nedergaard, M. (2020). Interstitial ions: A key regulator of state-dependent neural activity? *Progress in Neurobiology*, 193, 101802.

Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., & Guerra, M. (2010). The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*, 31(4), 757–776.

Sabbatini, M., Barili, P., Bronzetti, E., Zaccheo, D., & Amenta, F. (1999). Age-related changes of glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in the rat cerebellar cortex. *Mechanisms of Ageing and Development*, 108(2), 165–172.

Szentistványi, I., Patlak, C. S., Ellis, R. A., & Cserr, H. F. (1984). Drainage of interstitial fluid from different regions of rat brain. *The American journal of Physiology*, 246(6 Pt 2), F835–F844.

Trevaskis, N. L., Kaminskas, L. M., & Porter, C. J. (2015). From sewer to saviour - targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity. *Nature reviews. Drug Discovery*, 14(11), 781–803.

Ulv Larsen, S. M., Landolt, H. P., Berger, W., Nedergaard, M., Knudsen, G. M., & Holst, S. C. (2020). Haplotype of the astrocytic water channel AQP4 is associated with slow wave energy regulation in human NREM sleep. *PLoS biology*, 18(5), e3000623.

Valenza, M., Facchinetti, R., Steardo, L., & Scuderi, C. (2020). Altered Waste Disposal System in Aging and Alzheimer's Disease: Focus on Astrocytic Aquaporin-4. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1656.

Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1), 239–389.

Weller, R. O., Subash, M., Preston, S. D., Mazanti, I., & Carare, R. O. (2008). Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 18(2), 253–266.

Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M. J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., O'Donnell, J., Christensen, D. J., Nicholson, C., Iliff, J. J., Takano, T., Deane, R., & Nedergaard, M. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6156), 373–377.

BÖLÜM 11

UYKU YOKSUNLUĞU VE STRES ARASINDAKİ ETKİLEŞİM

Doç. Dr. Gülay HACIOĞLU[1]

[1]Giresun Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı, Giresun, Türkiye. gulayhacioglu@yahoo.com, Orcid ID: 0000-0002-8528-2371

GİRİŞ

Uyku, hayati önem taşıyan memeli homeostazının önemli bir bileşenidir. Beynin göreceli bir dinlenme durumunda olduğu ve öncelikle iç uyarana tepki gösterdiği, çevresel uyaranlara duyarsız kaldığı, vücut tarafından üretilen aktif bir bilinçsizlik halidir. Düşük fiziksel aktivite seviyeleri ve azalmış duyusal farkındalık ile karakterizedir. Bununla birlikte, uyku yoksunluğu modern toplumda yaygın bir sağlık sorunu haline gelmektedir. Genele bakıldığında, uyku bozuklukları popülasyonda yaygındır ve önemli olumsuz davranışsal ve sağlık sonuçlarıyla ilişkilidir. Kısmi uyku kısıtlaması yaşayan insanlar genellikle zararlı fizyolojik tepkiler gösterirken, toplam ve uzun süreli uyku kaybı ölüme yol açabilir. Özellikle derin uyku, hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) aks üzerinde inhibe edici bir etkiye sahipken, HPA ekseninin aktivasyonu ile dolaşıma katılan stres hormonları (insanlarda kortizol, kemirgenlerde kortikosteron) veya glukokortikoidlerin sistemik uygulanması, uyanma ve uykusuzluğa yol açabilir (Nollet ve ark; 2020). Uyku yoksunluğu ve uyku bozuklukları, HPA eksenindeki uyumsuz değişikliklerle ilişkilidir ve bu da nöroendokrin düzensizliğe yol açar (Meerlo ve ark., 2008). En yaygın uyku bozukluğu olan uykusuzluk, ACTH ve kortizol sekresyonunda 24 saatlik bir artışla ilişkilidir ve merkezi sinir sistemi (MSS)'nin aşırı uyarılması ile karakterizedir. Glukokortikoid fazlalığı, glikozu ve insülini arttırır ve adiponektin seviyelerini düşürür. Öte yandan, genel popülasyonda uyku hali ve yorgunluk çok yaygındır ve araştırmalar proinflamatuar sitokinler IL-6 ve/veya TNF-α'nın uyku apnesi, narkolepsi ve idiyopatik hipersomni gibi gündüz aşırı uyku hali ile ilişkili bozukluklarda yükseldiğini göstermiştir (Hirotsu ve ark., 2015).

Uyku ve stres, MSS ve metabolizmayı etkileyen farklı yolakları paylaşarak çift yönlü etkileşime girmekte ve obezite ve diyabet gibi metabolik bozuklukların artan prevalansından kısmen sorumlu olan altta yatan mekanizmaları tetikleyebilmektedir. Sorumlu mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için bu yazının ilk bölümünde, uyku ve HPA ekseni tanımlarına ve uyku ile stres arasındaki ilişkiye odaklanmak yararlı olacaktır. Takip eden bölümde ise, uyku ve stresin metabolizma üzerindeki etkilerini gözden geçirerek, esas olarak uyku yoksunluğu, sirkadiyen değişiklikler ve temel uyku ve stres bozukluklarına değinilecektir.

Uyku nedir?

Uyku, ilk Yunan filozoflarının zamanından beri spekülasyon ve düşünce konusu olmakla birlikte, araştırmacılar ancak son zamanlarda uykuyu sistematik ve nesnel bir şekilde incelemenin yollarını keşfetmişlerdir. Elektroensefalografi (EEG) gibi yeni teknolojilerin tanıtılması ve geliştirilmesi, bilim adamlarının uyuyan beyin tarafından üretilen elektriksel kalıpları ve aktiviteyi incelemelerine ve ölçmelerine olanak sağlamıştır. Uyku, iki farklı genel aktivite durumu içerir: hızlı göz hareketi (REM) uykusu ve REM dışı (NREM) uykusu. Bu iki durum tipik olarak kortikal EEG ve elektromiyografi (EMG) dahil olmak üzere elektrofizyolojik ölçümlerin yanı sıra, insanlarda elektrookülografi ile ayırt edilir (Nollet ve ark; 2020). NREM uykusu, hafif uyku (EEG'nin yavaşlaması, uyku iğciklerinin ve K-komplekslerinin varlığı) ve derin yavaş dalga uykusu olmak üzere ikiye ayrılır. Yavaş dalgalar, korteksin geniş alanlarında nöronal depolarizasyon/yüksek ateşleme (yukarı faz) dönemlerinin senkronizasyonunu ve ardından hiperpolarizasyon (aşağı faz) dönemlerini yansıtır. Yavaş dalga uyku yoğunluğu genellikle delta frekans aralığında EEG gücü ile ölçülür. REM uykusu aynı zamanda paradoksal uyku olarak da adlandırılır. EEG senkronize değildir ve hipokampal teta ritimleri mevcuttur. Kas atonisi ve rüya görme de meydana gelir. REM uykusu genellikle atoni ile "tonik REM uykusu", hızlı göz hareketleri ve kas seğirmeleri ile "fazik REM uykusu" olarak ayrılır.

Uyku, uyku döngülerinde düzenlenir ve memeliler arasında bazı EEG varyasyonları gösterir. REM uykusu, NREM uykusunu takip eder, ancak toplam uyku miktarları ve uyku evreleri değişkendir (Siegel, 1995 ve 2005). Benzer şekilde, döngünün periyodikliği birkaç dakikadan birkaç saate kadar değişir. Uyanıklık, EEG senkronizasyonu ve bilinç ile karakterizedir (Nollet ve ark; 2020). Memeli beyninde uyku-uyanıklık döngüsü, destekleyici veya baskılayıcı etkiler yoluyla uyku veya uyanıklığı indükleyen, farklı nöronal popülasyonların karmaşık bir ağı tarafından düzenlenir. İnsan uykusu monofaziktir ve tipik olarak genellikle gece meydana gelen, üç ila beş uyku fazı döngüsünden ibaret tek bir bloktan oluşmaktadır (Weber ve Dan, 2016).

Uyku gereksinimi

Uyku ve uyku yoksunluğu üzerine yapılan araştırmalar, uykunun işlevlerinin hücresel ve endokrin sistem düzeylerinde iyileşmeyi, enerji

tasarrufu ve ekolojik adaptasyonları, ayrıca öğrenme ve sinaptik plastisitedeki rolünü içerdiğini göstermektedir. Uyku, uyanıklık sırasında biriken enerji açıklarının üstesinden gelerek ve organizmayı uyanıklıkla ilgili bir sonraki enerji harcamasına hazırlayarak, glenfatik sistem yoluyla beyin atıklarının temizlenmesi (Albrecht ve Ripperger, 2018) veya günlük stres direnci (Blaxton ve ark., 2017) gibi temel mekanizmaları destekleyebilir. Uyku sırasında çevreden kopukluğun da beynin homeostatik plastisitesi için kritik olduğu öne sürülmüştür. Sinaptik homeostaz hipotezi, uyanıklık sırasında beyinde meydana gelen sinaptik bağlantıların güçlenmesinin öğrenme işlevlerini desteklediğini, enerjiye ve hücresel kaynaklara olan talebi arttırdığını ve daha sonra uyku sırasında normalleştirilerek hücresel dengeyi geri kazandırabileceğini ileri sürer (Tononi ve Cirelli 2014). Sinaptik gücün normlarına geri dönmesi, uyku sırasında hafıza edinimini, konsolidasyonu ve entegrasyonu destekleyebilir. Kanıtlar ayrıca uykunun vücuttaki hemen hemen her tür doku ve sistemi etkilediğini ve kronik uyku eksikliğinin hipertansiyon, diyabet, kardiyovasküler hastalık ve obezite gibi hastalıkların riskini artırabileceğini göstermektedir.

Uykunun önemi, insanlarda birkaç günden bir haftaya kadar sürdürülmesi zor olan uyku yoksunluğunun etkilerinden anlaşılmaktadır (Banks ve Dinges, 2007). Bireyler arası büyük farklılıklar olmasına rağmen, tipik olarak biliş bozulur ve ruh hali kararsız hale gelir (Van Dongen ve ark., 2003; Banks ve Dinges, 2007). Geçici bilinç kaybıyla birlikte nöroendokrin değişiklikler ve mikro uykular meydana gelir (Banks ve Dinges, 2007; Knutson ve ark., 2007). Seçici REM uyku yoksunluğu, daha uzun bir zaman diliminde benzer davranışsal etkiler üretir. Bu durumda, REM uykusuna girme girişimlerinin artması, bir REM uyku borcunun gelişimini düşündürür.

Sıçanlarda, toplam uyku yoksunluğu iki ila üç hafta sonra öldürücüdür. Günler içinde hayvanlar hiperfajik hale gelir ancak kilo verirler, bu durum artan kalp atış hızı ve enerji harcaması ile ilişkilidir. Vücut ısısı daha sonra düşer, hayvanlar giderek zayıflar, kuyruk ve ekstremitelerde ülserler gelişir (Rechtschaffen ve ark., 2002). Bununla birlikte, uyku yoksunluğunun etkilerini sıçanlarda stresten ayırmak zordur, çünkü yalnızca insanlar uyku yoksunluğunu gönüllü olarak kabul edebilmektedir. Uzun süreli uyku kısıtlamasının etkileri diğer türlerde belgelenmemiştir ve uyku her koşulda hayatta kalmak için hayati olmayabilir. Örneğin, sürekli uçan göçmen kuşlar

ve yeni doğan balinalar (ve onların emziren anneleri), zararlı etkiler olmaksızın geçici olarak uykuyu tamamen askıya alabilir (Rattenborg ve ark., 2004; Sekiguchi ve ark., 2006). Bu nedenle, hem REM hem NREM uykusu hayati görünür ve dengeye tabidir, ancak nadir durumlarda yaşamın önemli bir bölümünde ertelenebilir.

Uyku ve stres arasındaki çift yönlü bağlantı

Uyku ve HPA aksı arasındaki çift yönlü etkileşim karmaşıktır. Mevcut çalışmalar, HPA hiperaktivitesi, uyku kaybı ve uyku bozukluklarının bir kısır döngü içinde yakından bağlantılı olduğunu ve metabolik bozuklukların patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. Uyku ve stres sistemi fizyolojisini anlamak, bu sendromların fizyopatolojisini aydınlatmak ve yeni profilaktik ve tedavi edici yolları ortaya çıkarmak için gereklidir.

Stres, fiziksel, duygusal veya psikolojik gerginliğe neden olan her türlü değişiklik olarak tanımlanabilir. HPA ekseni, fizyolojik dengeyi yeniden kazandırmak için, algılanan stresli bir olayı otonomik ve nöroendokrin değişiklikler modeline entegre eden beynin ana devresidir (Balbo ve ark., 2010; van Dalfsen ve Markus 2018). HPA aksın bazal aktivitesi, büyük ölçüde hipotalamusun suprakiyazmatik çekirdeğindeki biyolojik saatin doğrudan kontrolü altında olan net bir günlük ritim gösterir (Buijs ve ark., 2003; Meerlo ve ark., 2008). Strese yanıt olarak, hipotalamusun paraventriküler çekirdeği tarafından kortikotropin salıcı hormon (CRH) üretilir ve bu da adenohipofizden, adrenal korteks kökenli steroid glukokortikoidlerin kan dolaşımına salgılanmasını tetikleyen adrenokortikotropik hormonun (ACTH) salgılanmasını başlatır. Glukokortikoidler strese adaptif yanıt için gereklidir ve sonuçta negatif geri bildirim yoluyla HPA ekseni aktivitesinin inhibisyonu ile glukokortikoid salınımının normalleşmesine yol açarlar (Herman ve ark., 2016). CRH'nın eksojen uygulanması, insanlarda ve kemirgenlerde uyanıklıkta bir artışa ve NREM uykusunda bir azalmaya neden olur (Born ve ark., 1989; Gvilia ve ark., 2015). İnsan çalışmaları uykunun kendisinin kortizol salınımını hafifçe azalttığını, uyanıklığın ise kortizol patlamasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Nollet ve ark., 2020). Bununla birlikte, CRH'daki bir artış, uyku yoksunluğunun ardından homeostatik yanıtı baskılarken, dolaşımdaki kortizol/kortikosteron konsantrasyonundaki değişiklik uyku ribaundunu

etkilemiyor gibi görünmektedir. Uyku kısıtlamasının kortizol salınımı üzerindeki etkisi, gece boyunca uyku kaybının ne zaman meydana geldiğine ve deneklerin uyku yoksunluğu sırasında genellikle uyanık veya uykuda olup olmadığına bağlı gibi görünüyor. Söz gelimi, dört ila sekiz ardışık gece boyunca kısa süreli kronik uyku kısıtlaması, büyük olasılıkla uyku sırasındaki endojen telafi edici mekanizmalar nedeniyle kortizol salınım modelini değiştirmez (Pejovic ve ark., 2013). Bununla birlikte, art arda bir ila altı gece boyunca her gece maksimum 4 saat uyku ile karakterize edilen daha belirgin uyku kaybı, azalmış sabah kortizol yanıtı ve artan öğleden sonra/akşam kortizol seviyesi ile ilişkilendirilmiştir (Reynolds ve ark., 2012; Guyon ve ark., 2014). Ayrıca, tekrarlayan kısa uyku olumsuz bir kortizol salgılanma modeli ile ortaya çıkmıştır (Abell ve ark., 2016). Gerçekten de uyku yoksunluğunun HPA eksen aktivitesi üzerindeki ani etkilerine ek olarak, uyku kaybının da müteakip stres reaktivitesini etkilediği gösterilmiştir. Bir gecelik uyku yoksunluğu artan stres seviyelerine rağmen akut bir psikososyal zorluğa yanıt vermeyi artırmazken (Schwarz ve ark., 2018), kötü uyku alışkanlıkları, psikososyal stres sırasında daha yüksek kan basıncı ve kortizol seviyesi ile ilişkilendirilmiştir (Massar ve ark., 2017). Bu sonuçlara göre stres reaktivitesinde uyku kalitesi, uyku miktarından daha önemli bir rol oynuyor gibi görünüyor.

Uykusuz bireylerde gözlenen HPA aksı etkinliğindeki artış, tek başına uyku kaybının etkisinden ziyade, en azından kısmen, deneklerin uyanık kalmak için yaşadıkları zihinsel ve fiziksel yükün doğrudan sonucu olabilir. Daha güçlü stimülasyon ve daha yüksek fiziksel veya bilişsel talep, daha fazla HPA eksen aktivitesine yol açabilir. Gevşemiş uyanıklık sırasında, beklenenin ötesinde bir stres tepkisi durumunda uyku yoksunluğu tam anlamıyla bir stresör olarak düşünülebilir. Stresin uyku homeostazı üzerindeki köklü etkilerine ek olarak, uyku ve HPA ekseni aktivitesi arasındaki karmaşık ve karşılıklı ilişki göz önüne alındığında bu önemsiz bir konu değildir. Nöroendokrin stres sisteminin aktivasyonunun zorunlu uyanıklığın sonucu mu, yoksa uykudan mahrum bırakma prosedürünün stresli doğası mı olduğu temel bir sorudur ve net bir cevabın olmaması, uyku yoksunluğunu içeren uyku araştırmaları için ciddi sonuçlar doğurur.

Glukokortikoidlerin uyku üzerindeki etkileri

Sıçanlarda ve insanlarda yapılan klasik çalışmalar, ekzojen CRH'nın EEG frekansını ve uyanıklığı artırarak ve yavaş dalga uykusunu azaltarak uykuyu modüle edebildiğini göstermiştir. Bunun yanında, glukokortikoidlerin doğrudan etkilerine odaklanan çalışmalar, REM uykusu pahasına uyanık geçirilen süreyi artırdıklarını göstermiştir. Farklı araştırmalar, kortizolün mineralokortikoid reseptörleri (MR) aktive ettiğinde yavaş dalga uykusunu azalttığını, deksametazonun ise glukokortikoid reseptörlerin (GR) etkinleştirilmesinden sonra uyanmayı artırdığını göstermektedir (Hirotsu ve ark., 2015). Hem ekzojen hem endojen glukokortikoidlerin uyku EEG'si üzerindeki etkileri, aktive edilen reseptörlerin tipine ve konumuna (MR'ye karşı GR), kullanılan kortizol/kortikosteron dozuna ve gece CRH'yı maksimum baskılayan optimal kortizol seviyelerine bağlıdır (Buckley ve Schatzberg, 2005). Yüksek kortizol seviyeleri ve GR'nin total işgali ile yavaş dalga uykusunda düşüş olduğunu gösteren çalışmalar amigdalada aşırı GR aktivasyonuna bağlı olabilir. Etkiler, parvoselüler nükleusta ve ön hipofizde bilinen inhibitör etkinin tersidir ve pozitif geri bildirime yol açar (Vazquez-Palacios ve ark., 2001). Ancak, glukokortikoidlerin yanı sıra, CRH'nın de REM üzerindeki etkileri tam olarak anlaşılamamıştır ve çoğu çelişkilidir.

Cushing sendromu gibi hastalıklar sırasında meydana gelen aşırı glukokortikoidlere uzun süreli maruz kalma, bu hormonların uykudaki rolü hakkında fikir verebilir. Örneğin, Cushing sendromunda polisomnografik kayıtlarda yavaş dalga uykusunda azalma, uyku latensinde artış, uyanma süresinde artış, kısa REM latensi ve yüksek REM yoğunluğu gibi glukokortikoid fazlalığının zararlı etkilerini yansıtan tutarlı değişiklikler bildirilmiştir (Balbo ve ark., 2010). Bierwolf ve meslektaşları (2000), hem Cushing'lerde hem de sağlıklı hastalarda adrenal salgılama aktivitesinin ağırlıklı olarak NREM dönemlerinde başladığını göstererek, hipofiz-adrenal aktivite ile NREM ve REM uykusunun ultradian ritmi arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir.

Stres hormonu seviyeleri, azalan uyku süresi ile pozitif korelasyon gösterirken, her ikisi de obezite, metabolik sendrom ve yeme bozuklukları ile ilişkilidir (Rolls ve ark., 2010). Bir çalışmada, 96 saat paradoksal uyku yoksunluğuna maruz bırakılan farelerin, artan günlük gıda alımına ek olarak, CRH ve oreksin için artan immünoreaktivite ve daha yüksek ACTH ve

kortikosteron seviyeleri gösterdiği, ancak küresel gıda alımında değişiklik olmadığı saptanmıştır. Paradoksal uyku yoksunluğu boyunca kortikosteron ve vücut ağırlığı artışı arasında ise negatif bir korelasyon bulunmuştur (Galvao ve ark., 2009).

Stresin yavaş dalga ve REM uykusunu azalttığı, ayrıca stres maruziyetinin türü ve süresine göre kemirgenlerde metabolizmayı etkilediği bilinmektedir (Rolls ve ark., 2010). Uyku yoksunluğu, dolaylı olarak uyanıklığı modüle eden ve metabolizmayı etkileyen HPA aksını ve sempatik sinir sistemi dahil olmak üzere stresle ilgili birçok yolu aktive eder (Meerlo ve ark., 2002). Uyku ve stres arasındaki çift yönlü ilişkinin ve bunun metabolizma üzerindeki etkisinin kısmen hipokretin devresi tarafından düzenlendiği öne sürülmüştür. Hipokretinerjik hücreler, MSS'de locus coeruleus, paraventriküler nükleus, stria terminalis ve merkezi amigdala dahil olmak üzere birkaç CRH'ye yanıt veren bölgeye projekte olur (Winsky-Sommerer ve ark., 2004).

Uykunun öneminin keşfedilmesinden bu yana yapılan kapsamlı araştırmalara rağmen, işlevleri ve işleyişi hala bir tartışma konusudur. Yine de, uykunun zihinsel ve fiziksel sağlığa önemli katkıları konusunda, kalitesiz uykunun olumsuz sonuçlarına işaret eden çok sayıda çalışma ile bir fikir birliği vardır (Minakawa ve ark., 2019; Palagini ve ark., 2019). Çoğu durumda uyku yoksunluğunun sempatik sistem ve HPA aksı aktivitesi üzerindeki etkileri hafiftir ve fonksiyonel adaptasyonlar olarak kabul edilebilirken, kısıtlı ve kesintiye uğramış uyku kronik bir durum haline geldiğinde olumsuz sonuçlar doğurabilir. Bu tür olumsuz etkiler iki farklı şekilde ortaya çıkabilir. Birincisi, uyku yoksunluğunun birçok küçük etkisinin zamanla birikip daha ciddi bir dalgaya dönüşmesidir. Örneğin, alışılmış kısa uyku süresi ve bunun sonucunda artan sempatik sinir sistemi aktivitesine, artan kalp atış hızına ve kan basıncına uzun süreli maruz kalma, özellikle bu tür uyku kısıtlaması diğer risk faktörleri bağlamında ortaya çıktığında, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalığın gelişimine katkıda bulunabilir (Meerlo ve ark., 2008). Kısa bir gece uykusu ile ortaya çıkabilecek glukokortikoid seviyelerinde hafif ve geçici yükselme nadir olduğunda zararlı olmayabilir. Fakat, yüksek seviyelerde glukokortikoidlere tekrar tekrar maruz kalmak beyindeki nöronal atrofiyi hızlandırabilir. Glukokortikoidler birçok önemli işlevi yerine getirmelerine rağmen, bu hormonların kronik olarak artan seviyeleri işlev bozukluğuna ve

hastalığa neden olabilir (De Kloet ve ark., 2005). Uyku eksikliğinin olumsuz etkilerinin görülebileceği ikinci yol, uyku yoksunluğunun sadece nöroendokrin stres sistemlerinin bazal aktivitesinde geçici değişikliklere neden olmakla kalmayıp, aynı zamanda bu stresin ayar noktalarında ve/veya merkezi düzenlemesinde kademeli olarak gelişen ve kalıcı değişikliklere neden olmasıdır. Söz gelimi, otonomik ve nöroendokrin stres sistemlerinin düzenlenmesini ve aynı zamanda limbik yapıların işlevini ve bu sayede duygusal tepkileri ve stres algısını doğrudan etkileyebilen kademeli uyku kısıtlamasının neden olduğu beynin serotonin reseptör duyarlılığındaki azalmadır. Serotonin nöro-transmisyonunda ve reseptör duyarlılığında bir azalma, genellikle depresyon gibi duygu-durum bozukluklarının patofizyolojisinde yer almaktadır (Hensler, 2006).

Sonuç olarak, mevcut veriler, kronik olarak kısıtlanmış ve bozulan uykunun önerilen bazı sağlık sonuçlarının, stres sistemlerinin tekrarlanan aktivasyonuna ve/veya bu sistemlerin müteakip strese yanıt vermede değişikliklere yol açan düzenlemesine aracılık ettiği hipotezini desteklemektedir. Bununla birlikte, modern toplumlarda uykusuzluğun yüksek prevalansı ve düşük uyku kalitesi, uyku düzenlemesi ve işlevinin ardındaki mekanizmaları ortaya çıkarmayı amaçlayan daha fazla ve daha nitelikli araştırma ihtiyacını vurgulamaktadır.

KAYNAKÇA

Abell, J. G., Shipley, M. J., Ferrie, J. E., Kivimäki, M., & Kumari, M. (2016). Recurrent short sleep, chronic insomnia symptoms and salivary cortisol: A 10-year follow-up in the Whitehall II study. *Psychoneuroendocrinology*, 68, 91–99.

Albrecht, U., & Ripperger, J. A. (2018). Circadian Clocks and Sleep: Impact of Rhythmic Metabolism and Waste Clearance on the Brain. *Trends in Neurosciences*, 41(10), 677–688.

Balbo, M., Leproult, R., & Van Cauter, E. (2010). Impact of sleep and its disturbances on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity. *International Journal of Endocrinology*, 2010, 759234.

Banks, S., & Dinges, D. F. (2007). Behavioral and physiological consequences of sleep restriction. *Journal of Clinical Sleep Medicine: JCSM: Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 3(5), 519–528.

Bierwolf, C., Kern, W., Mölle, M., Born, J., & Fehm, H. L. (2000). Rhythms of pituitary-adrenal activity during sleep in patients with Cushing's disease. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 108(7), 470–479.

Blaxton, J. M., Bergeman, C. S., Whitehead, B. R., Braun, M. E., & Payne, J. D. (2017). Relationships Among Nightly Sleep Quality, Daily Stress, and Daily Affect. *The Journals of Gerontology. Series B, Psychological Sciences and Social Sciences*, 72(3), 363–372.

Born, J., Späth-Schwalbe, E., Schwakenhofer, H., Kern, W., & Fehm, H. L. (1989). Influences of corticotropin-releasing hormone, adrenocorticotropin, and cortisol on sleep in normal man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 68(5), 904–911.

Buckley, T. M., & Schatzberg, A. F. (2005). On the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rhythm, exemplary sleep disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(5), 3106–3114.

Buijs, R. M., van Eden, C. G., Goncharuk, V. D., & Kalsbeek, A. (2003). The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *The Journal of Endocrinology*, 177(1), 17–26.

de Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(6), 463–475.

Follenius, M., Brandenberger, G., Bandesapt, J. J., Libert, J. P., & Ehrhart, J. (1992). Nocturnal cortisol release in relation to sleep structure. *Sleep*, 15(1), 21–27.

Galvão, M.deO., Sinigaglia-Coimbra, R., Kawakami, S. E., Tufik, S., & Suchecki, D. (2009). Paradoxical sleep deprivation activates hypothalamic nuclei that regulate food intake and stress response. *Psychoneuroendocrinology*, 34(8), 1176–1183.

Guyon, A., Balbo, M., Morselli, L. L., Tasali, E., Leproult, R., L'Hermite-Balériaux, M., Van Cauter, E., & Spiegel, K. (2014). Adverse effects of two nights of sleep restriction on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in healthy men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(8), 2861–2868.

Gvilia, I., Suntsova, N., Kumar, S., McGinty, D., & Szymusiak, R. (2015). Suppression of preoptic sleep-regulatory neuronal activity during corticotropin-releasing factor-induced sleep disturbance. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309(9), R1092–R1100.

Hensler J. G. (2006). Serotonergic modulation of the limbic system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(2), 203–214.

Herman, J. P., McKlveen, J. M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., & Myers, B. (2016). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology*, 6(2), 603–621.

Hirotsu, C., Tufik, S., & Andersen, M. L. (2015). Interactions between sleep, stress, and metabolism: From physiological to pathological conditions. *Sleep Science (Sao Paulo, Brazil)*, 8(3), 143–152.

Knutson, K. L., Spiegel, K., Penev, P., & Van Cauter, E. (2007). The metabolic consequences of sleep deprivation. *Sleep Medicine Reviews*, 11(3), 163–178.

Massar, S. A. A., Liu, J. C. J., Mohammad, N. B., & Chee, M. W. L. (2017). Poor habitual sleep efficiency is associated with increased cardiovascular and cortisol stress reactivity in men. *Psychoneuroendocrinology*, 81, 151–156.

Meerlo, P., Koehl, M., van der Borght, K., & Turek, F. W. (2002). Sleep restriction alters the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *Journal of Neuroendocrinology*, 14(5), 397–402.

Meerlo, P., Sgoifo, A., & Suchecki, D. (2008). Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Medicine Reviews*, 12(3), 197–210.

Minakawa, E. N., Wada, K., & Nagai, Y. (2019). Sleep Disturbance as a Potential Modifiable Risk Factor for Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 803.

Nollet, M., Wisden, W., & Franks, N. P. (2020). Sleep deprivation and stress: a reciprocal relationship. *Interface Focus*, 10(3), 20190092.

Palagini, L., Bastien, C. H., Marazziti, D., Ellis, J. G., & Riemann, D. (2019). The key role of insomnia and sleep loss in the dysregulation of multiple systems involved in mood disorders: A proposed model. *Journal of Sleep Research*, 28(6), e12841.

Pejovic, S., Basta, M., Vgontzas, A. N., Kritikou, I., Shaffer, M. L., Tsaoussoglou, M., Stiffler, D., Stefanakis, Z., Bixler, E. O., & Chrousos, G. P. (2013). Effects of recovery sleep after one work week of mild sleep restriction on interleukin-6 and cortisol secretion and daytime sleepiness and performance. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305(7), E890–E896.

Rattenborg, N. C., Mandt, B. H., Obermeyer, W. H., Winsauer, P. J., Huber, R., Wikelski, M., & Benca, R. M. (2004). Migratory sleeplessness in the white-crowned sparrow (Zonotrichia leucophrys gambelii). *PLoS Biology*, 2(7), E212.

Rechtschaffen, A., Bergmann, B. M., Everson, C. A., Kushida, C. A., & Gilliland, M. A. (1989). Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep*, 12(1), 68–87.

Reynolds, A. C., Dorrian, J., Liu, P. Y., Van Dongen, H. P., Wittert, G. A., Harmer, L. J., & Banks, S. (2012). Impact of five nights of sleep restriction on glucose metabolism, leptin and testosterone in young adult men. *PloS One*, 7(7), e41218.

Rolls, A., Schaich Borg, J., & de Lecea, L. (2010). Sleep and metabolism: role of hypothalamic neuronal circuitry. *Best practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 24(5), 817–828.

Schwarz, J., Gerhardsson, A., van Leeuwen, W., Lekander, M., Ericson, M., Fischer, H., Kecklund, G., & Åkerstedt, T. (2018). Does sleep deprivation increase the vulnerability to acute psychosocial stress in young and older adults? *Psychoneuroendocrinology*, 96, 155–165.

Sekiguchi, Y., Arai, K., & Kohshima, S. (2006). Sleep behaviour: sleep in continuously active dolphins. *Nature*, 441(7096), E9–E11.

Siegel J. M. (1995). Phylogeny and the function of REM sleep. *Behavioural Brain Research*, 69(1-2), 29–34.

Siegel J. M. (2005). Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature*, 437(7063), 1264–1271.

Tononi, G., & Cirelli, C. (2014). Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron*, 81(1), 12–34.

van Dalfsen, J. H., & Markus, C. R. (2018). The influence of sleep on human hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis reactivity: A systematic review. *Sleep Medicine Reviews*, 39, 187–194.

Van Dongen, H. P., Maislin, G., Mullington, J. M., & Dinges, D. F. (2003). The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation. *Sleep*, 26(2), 117–126.

Vázquez-Palacios, G., Retana-Márquez, S., Bonilla-Jaime, H., & Velázquez-Moctezuma, J. (2001). Further definition of the effect of corticosterone on the sleep-wake pattern in the male rat. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 70(2-3), 305–310.

Weber, F., & Dan, Y. (2016). Circuit-based interrogation of sleep control. *Nature*, 538(7623), 51–59.

Winsky-Sommerer, R., Yamanaka, A., Diano, S., Borok, E., Roberts, A. J., Sakurai, T., Kilduff, T. S., Horvath, T. L., & de Lecea, L. (2004). Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(50), 11439–11448.

BÖLÜM 12

BESLENME VE EPİGENETİK DÜZENLENMELER

Dr. Öğr. Üyesi Emel KABARTAN ÇÖKELİ[1]

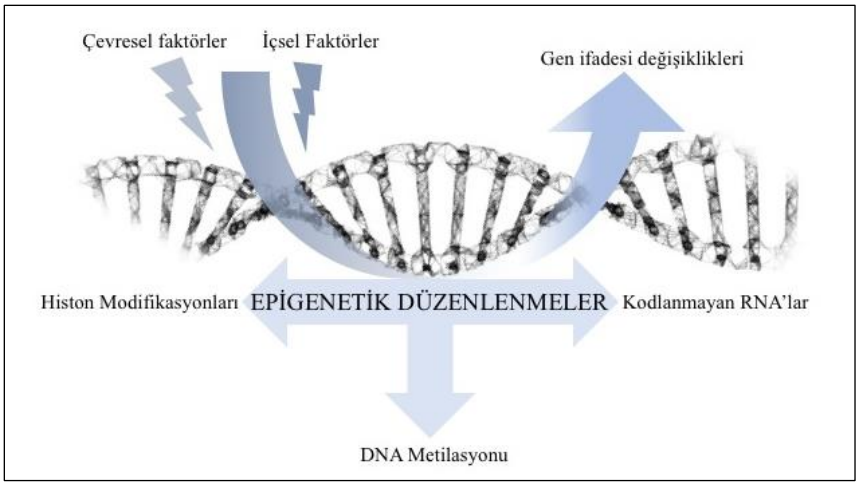
[1]Ordu Üniversitesi, Ulubey MYO, Laborant ve Veteriner Sağlık Prg, Ordu, Türkiye
emelkabartan@gmail.com, Orcid ID: 0000-0002-6289-2310

GİRİŞ

Hücre döngüsü aşamalarında fiziksel ve/veya biyokimyasal bir nedene bağlı olarak mutasyon meydana gelmediği sürece DNA dizisinde ve dolayısıyla gen bölgesinde bir değişim olması beklenmez. Ancak, bir tek organizmayı oluşturan ve genomu tamamen aynı olan milyonlarca hücre, oldukça farklı proteom ve metaboloma sahiptir. Aynı DNA dizisine sahip olmasına rağmen özelleşmiş hücrelerde meydana gelen bu çeşitlilik, gen ifadesindeki plastisitenin temel göstergesidir.

Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir farklılaşmaya olmadan DNA'dan proteine giden gen ifadesi sürecini değiştiren, kalıtımı mümkün, geri dönüşümlü, bir takım biyokimyasal modifikasyonu ve yeniden düzenlenmeyi tanımlar (Şekil 1). Bu epigenetik modifikasyonlar, gelişimin farklı aşamalarında elzem iken kanser, endojen ve çevresel faktörlerle tetiklenerek diyabet, infertilite, obezite, ilaç direnci gibi birçok hastalık ve kişisel metabolik farklılıkların da ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Cavalli ve Heard, 2019; Kabartan ve ark., 2019).

Bu bölümde, temel epigenetik mekanizmalar açıklandıktan sonra verilecek bazı örneklerle beslenmenin bu mekanizmaları nasıl etkileyebildiği üzerinde durulacaktır.



Şekil 1. Epigenetik düzenlenmeler

EPİGENETİK DÜZENLENMEYİ SAĞLAYAN MODİFİKASYONLAR

Gen ifadesinde değişikliğe yol açan epigenetik modifikasyonlar, temelde transkripsiyon aşamasında ve transkripsiyon sonrasında etkili olanlar şeklinde ikiye ayrılabilir. Transkripsiyon aşamasında DNA metilasyonları ile histonlardaki post-translasyonel düzenlenmeler devreye girerken transkripsiyon sonrasında mRNA'nın kodlanmayan RNA türleri ile etkileşimi söz konusudur.

- **DNA metilasyonu**

Bu replikasyon sonrası modifikasyon, CH3 grubunun DNA dizisinde, çoğunlukla promotör bölgede, guaninden önce gelen bir sitozinin (CpG adacıkları) 5' pozisyonuna eklenmesiyle meydana gelen bir reaksiyondur. DNA metilasyonu, retroviral elementleri susturmak, dokuya özgü gen ifadesini, genomik damgalamayı (imprinting) ve X kromozomu inaktivasyonunu düzenlemek için gereklidir.

Sitozin metilasyonu, metil donörü olarak S-adenosil metionini kullanan, DNA metil transferazlar (DNMT'ler) tarafından katalize edilir (Moore vd., 2013). DNA metilasyon kalıpları embriyonik gelişimde esas olduğu için DNMT'lerden herhangi birinin eksikliği (Li ve diğerleri, 1992; Okano ve diğerleri, 1999), ve Dnmt1'in aşırı ifadesi genomik damgalamayı bozarak (Biniskiewicz ve ark., 2002) farelerde embriyo ölümlerine neden olmaktadır.

Damgalanmış genler, farklı allellerde gen ifadesini etkileyen ve hücre bölünmesi sırasında yeni hücrelere aktarılabilen bir metilasyon bilgisidir (Moore vd., 2013). Prader Wili (PWS) ve Angelman Sendromu (AS) örneklerinde gördüğümüz gibi damgalama, metabolik sürecin normal işleyişi için ne kadar gerekli ise hatalı metilasyon da durumu tersine çevirerek patolojik tablolar yaratabilmektedir (Kantor ve ark., 2004).

Bir tümör baskılayıcı genin yabanıl tip allelindeki hatalı metilasyonunu Knudson'ın iki vuruş hipotezi üzerinden değerlendirecek olursak, meydana gelen "epimutasyon" hem ailesel hem de sporadik kanser formlarında birinci ve/veya ikinci bir vuruş olarak bialelik inaktivasyona katkıda bulunabilir (Esteller ve ark., 2001; Issa, 2022). Zaten anormal DNA metilasyonu kolon, meme, karaciğer, mesane, Wilms, yumurtalık, özofagus, prostat ve kemik

kanserleri gibi birçok kanser türünde yaygın olarak gözlenmiştir (Jin ve Liu, 2018).

- **Histon modifikasyonları**

Kromatinin temel birimi, 147 bç DNA'nın histon oktamerinin etrafına yaklaşık iki kez sarılmasıyla oluşan nükleozomlardır. Çekirdek histonların her biri, oktamer içindeki histon-histon etkileşimlerine aracılık eden ve DNA bağlantısını organize eden globüler yapıya ve nükleozomların daha üst seviye katlanmalarını kontrol eden, bazik amino asitlerce zengin kuyruklara sahiptir.

Histonlar, lizinlerin (K) ve arjininlerin (R) asetilasyonu ve metilasyonu; serinlerin (S) ve treoninlerin (T) fosforilasyonu; K ubiquitilasyonu, sumilasyonu ve ribozilasyonu dahil olmak üzere çok sayıda post-translasyonel modifikasyona tabidir. Asetilasyon ve fosforilasyon genellikle transkripsiyona eşlik eder, metilasyon ve ubiquitination ise transkripsiyonun hem aktivasyonunda hem de baskılanmasında rol oynar (Peterson ve Laniel, 2004; Bure ve ark., 2022). Histon asetil transferazlar (HAT/KAT) asetil CoA'dan bir asetil grubunun K yan zincirlerinin transferini katalizler. Bunun sonucunda, K pozitif yükü nötralize olur ve bu eylem, histonlar ve DNA arasındaki etkileşimleri zayıflatarak transkripsyona olanak verir. K asetilasyonu oldukça geri dönüşümlüdür asetil grupları histon deasetilazlar (HDAC'ler) tarafından uzaklaştırılır (Seto ve Yoshida, 2014).

DNA paketlenmesinde kritik rolü olan histonların translasyon sonrası modifikasyonları, kromatin yapısında fonksiyonel bir değişikliğe neden olarak replikasyon, DNA onarımı ve transkripsiyon dahil olmak üzere birçok kritik sürecin yönlendirilmesiyle bağlantılıdır (Luger ve ark., 2012).

- **Kodlanmayan RNA'lar**

Belirli bir DNA dizisinde yer alan genetik bilgi, ya bir proteini kodlayan RNA transkriptine ya da kodlanmayan ve transkripsiyonu ve/veya translasyonu modüle edebilen transkriptlere dönüştürülebilir. İnsan genomunun neredeyse %99'unun kodlamayan (proteine ifade edilmeyen) genomik bölgelerden (intronlar ve intergenik bölgeler) oluştuğu (Cheng ve ark., 2005) düşünüldüğünde bu bölgelerin yadsınamaz önemine yoğunlaşmak gerekir.

Kodlanmayan transkriptlerin ilk grubu, translasyonda rol alan ribozomal RNA'lar (rRNA'lar) ve transfer RNA'ları (tRNA'lar) kapsar. İkinci grup,

çekirdekte lokalize olan kodlanmayan RNAları (ncRNA) içerir. Düzenleyici ncRNA'lar olarak tanımlanan kodlanmayan RNA'lar genellikle olgun ürünlerinin uzunluğuna göre uzun lncRNA'lar (>200 nt) ve kısa sncRNA'lardan (<200 nt) oluşan gruplar halinde sınıflandırılabilir (Kapranov ve ark., 2007). sncRNA'ları, küçük nüklear RNA(snRNA'lar) ve küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar) olarak da ayrımak mümkündür. Küçük kodlanmayan RNA'lar, genomik köken ve etki mekanizmasına göre de mikro RNA sınıfları (miRNA'lar), kısa enterferans yapan RNA'lar (siRNA'lar) ve PIWI etkileşimli RNA'lar (piRNA'lar) şeklinde sınıflandırılabilmektedir (Wei ve ark., 2007).

Son yıllarda üzerinde çokça çalışılan miRNAlar, DNA dizilerinden birincil miRNA'lara (pri-miRNA'lar) kopyalanır ve öncü miRNA'lara (pre-miRNA'lar) ve olgun miRNA'lara işlenir. miRNA'lar, özellikle 5' ucunun bir kısmında, eksik tamamlayıcı baz eşleşmesiyle bir veya daha fazla hedef transkriptin farklı bölgelerine bağlanarak bazen -mikro ribonükleo proteinler (miRNP) aracılığıyla- gen ifadesini artırsa da çoğunlukla transkriptin kararsızlaşması ve bozulmasını tetikleyerek gen ifadesini düzenler (Vasudevan, 2012; O'Brien ve ark., 2018).

Artan kanıtlar, sncRNA ve lncRNA gibi kodlayıcı olmayan RNA'ların gen ifadesi kontrolündeki çoğu epigenetik mekanizmada rolü olduğunu göstermektedir (Costa, 2008, Ferreira ve Esteller, 2018, Bure ve ark., 2022). Çeşitli miRNA'ların seviye değişiklikleri, hücre fizyolojisi için geniş etkileri olan birçok hedef proteinin ifadesini değiştirebildiği gibi eksozomlarda taşınan miRNA'lar, hücre dışı ortamda ve kanda bulunarak tümör mikro ortamına ve uzun mesafeli hücreler arası sinyallere de katılabilmektedir (Lagoa ve ark., 2022).

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve ncRNA'lar birlikte çalışarak kararlı ve net gen ifadesi kalıpları yaratır. Bahsi geçen tüm bu modifikasyonlarla şekillenen "Epigenom", gen ifadesinin sadık bir şekilde sürdürülmesiyle doğum sonrası fenotipi belirlerken yaşam boyu maruz kalınan çevresel faktörlerle de süregelen "farklılaşma"yı yönlendiren temel kavşaktır.

EPİGENETİKTE İNSAN İÇİN TEMEL ÇEVRESEL FAKTÖR: BESLENME

Besinler, enerji ihtiyacının karşılanması ve metabolik faaliyetlerin sürdürülmesinin yanında genomun aktivitesini ve vücudun fizyolojisini de şekillendirir. İnsan diyeti, birçoğu farmakolojik etkileri değiştirme potansiyeline sahip, değişken bir kompleksdir. İnsan diyeti, hastalıkla ilişkili epigenetik değişiklikleri etkileyebilir ve epigenetik mekanizmalar yoluyla gen ifadesi seviyeleri değiştirilebilir.

Epigenetik modifikasyonların metabolik aktivitelerdeki dalgalanmalara cevap verme yeteneği, farklı kromatin değiştirici enzimlerin içsel termodinamik ve kinetik parametrelerinin bir sonucu olup bu modifikasyonların çoğu, metabolitleri substrat veya kofaktör olarak kullanan enzimler tarafından katalize edilir (Dai ve ark., 2020). Bu enzimlerin ifadesi de DNA metilasyonu ve ncRNA'lar gibi çeşitli bileşenlerce kontrol edilebilir. Hatta sağlıklı beslenme kalıplarının bazı metilasyona dayalı biyolojik yaş ölçümleriyle ilişkili olduğunun gösterilmesi (Kresovich ve ark., 2022), popüler bilimin merak uyandıran konularından biri olan "uzun yaşam"ın sırrını bulmaya ilişkin umutları güçlendirmektedir.

Epigenetik mekanizmaları aydınlatmak amacıyla çok sayıda değerli in vitro çalışma yapılıyor olsa da beslenme ve/veya diğer yollarla alınan bileşenlerin sistemik etkisini görmek için hayvan modeli çalışmaları kaçınılmazdır. Kürk rengi varyasyonu gelişimin erken dönemlerinde epigenetik işaretlerle oluşturulan sarı aguti fare modeli, beslenme ve çevresel etkilerin fetal epigenom üzerindeki etkilerini araştırmak için kullanılan "epigenetik biyosensör"ler olarak tanımlanmıştır (Dolinoy, 2008).

Dünya çapında çok sayıda araştırmacı tarafından model organizmalardan yararlanarak farklı diyet modellerinin epigenetik etkileri araştırılmış olup diyet modeline göre bazı çarpıcı örnekler aşağıda sıralanmıştır.

- **Yüksek yağlı diyet**

Dünya Sağlık Örgütü'nün raporuna göre, 2016 yılında dünya yetişkin nüfusunun yaklaşık %13'ü obez olarak nitelendirilirken obezite, prevalansı üç katına çıkmış bir pandemik risk (Kim, 2022) olarak karşımızda durmaktadır. Obeziteyi etkili bir şekilde tedavi etmek için vücudumuzun normal kilosunu

nasıl koruduğunu ve hangi patolojik süreçlerin kilo kontrol mekanizmalarını bozduğunu anlamamız gerekir.

Yüksek yağlı diyet (YYD, diyetteki enerjinin %60'dan fazlasının yağdan alınımı) büyük oranda kilo artışı, hiperglisemi, hiperinsülinemi, insülin direnci, ektopik lipid birikimi ve inflamatuar sitokin salgılanması ve metabolik hastalıklara neden olur (Duan ve ark., 2018).

2012 yılında, YYD uygulanmasının insanlar üzerindeki etkisini incelemek için genç erkeklerin iskelet kasında, inflamasyon, üreme sistemi ve kanserle ilgili 6,508 genin metilasyon profili izlenmiş, bu genlerde yaygın DNA metilasyon değişikliği gözlenmiştir (Jacobsen ve ark., 2012). Jacobsen ve arkadaşları tarafından bu metilasyon düzeyinin ve metilasyon seviyeleriyle ilgili olmasa da gen ifadesi profillerinin diyetin bırakılmasından 6-8 hafta sonra kısmen normale döndüğü rapor edilmiştir.

YYD ile beslenmenin yağ dokuda da gen ifadesi değişikliklerine neden olduğu bilinmektedir (Cone ve ark., 2013; Cordero ve ark., 2013) Bu değişiklikler sırasında Metil donör takviyesi, karaciğerde yağ birikimine karşı koruma sağlarken diğer somatik parametrelerde herhangi bir değişiklik meydana getirmemiştir (Cordero ve ark., 2013). DNA metilasyonunun gen ifadesine etkilerinin incelendiği detaylı bir çalışma, yetişkin farelerde uzun süreli YYD maruziyetinin adipogenez ve insülin metabolizmasında rol alan Leptin ve Pparg2'nin promotör metilasyonunda dokuya özgü (gonadal ve subkutanöz) bir farklılaşmaya yol açtığını (Zwamborn ve ark., 2017) göstermiş; sonrasında farklı bir grubun YYD uygulamasının epigenetik etkilerini inceleyen çalışmasında insülin sekresyonu ile ilişkili genlerde ortaya çıkan metilasyon değişikliklerinin Folik asit takviyesi ile azaldığı ve insülin direncinin iyileştirildiği raporlanmıştır (Li ve ark., 2018).

YYD, adipoz ve karaciğer gibi dokularda histon asetilasyonu ile ilişkili ATP sitrat-liyaz düzeylerinin baskılanmasına da neden olur. YYD ile beslenen farelerde karaciğer, pankreas ve beyaz yağ dokuların her birinde birkaç histon asetilasyonunun aşağı doğru eğilim gösterdiği tespit edilmiştir (Carrer ve ark., 2017). Ayrıca lncRNA'nın obezite kaynaklı kısırlığa dahil olabileceği de ileri sürülmüş (An ve ark., 2017), obezitede artan bir lcRNA Gm15290'ın miR-27b ile bloke edilmesinin in vivo olarak farelerde yağ birikimini ve vücut ağırlığı artışını azalttığı bildirilmiştir (Liu ve ark, 2017). Elde edilen verilere göre

Metformin uygulaması, YYD grubunda regüle edilen lncRNA'ları yeniden düzenleneyebilir (Zhang ve ark., 2022).

Obezite ve diyabet arasındaki ilişki, glikoz ve lipid metabolizması ile güçlü bir bağlantı sergiler. miRNA'ların, pankreas β hücrelerinde insülin salınımı ve adipositlerin farklılaşması dahil olmak üzere temel hücresel süreçlerin aktivitesini düzenlediğinin gösterilmesi (Williams ve Mitchel, 2012) bu bağlantının farklı yönlerini kontrol altına alabilmek açısından oldukça önemli bir bilgidir. Spesifik olarak, yağ dokusunda miR-27a'nın regülasyonu, YYD ile beslenen farelerde normal beslenenlere oranla daha düşükken, konjuge linoleik asit tedavisi bu durumu tersine çevirebilmektedir (Nazari ve ark., 2018). YYD ile beslenmenin, glomerüler miR-379 artışı ile endoplazmik retikulum (ER) stres düzenleyicilerden olan Edem3'ün ifadesini azalttığı, miR-379 inhibisyonunun fareleri YYD ve hiperinsülinemi kaynaklı böbrek hasarından kısmen azaltılmış ER stresi yoluyla koruduğu da görülmektedir (Abdollahi ve ark., 2022).

YYD ile beslenmenin farklı dokulardaki epigenetik mekanizmalarla etkileşime girdiği açıktır. Bu konuda yapılacak kapsamlı ve detaylı çalışmalar konunun aydınlatılmasına önemli katkılar sunmaya devam edecektir.

- **Karbonhidrat**

Metabolik hastalıkların YYD ile ilişkisinden bahsetmişken diyetteki karbonhidrat/yağ oranının epigenetik etkilerinden mutlaka bahsedilmelidir. Hipertrigliseridemi, obezite, tip 2 diyabet, hipertansiyon, metabolik sendrom gibi metabolik hastalıklar için risk faktörünü azaltan karnitin palmitoiltransferaz-1A (CPT1A) geni cg00574958 bölgesi metilasyonunun, diyetteki karbonhidrat/yağ oranı ile pozitif korelasyon göstermesi (Lai ve ark., 2020) metabolik hastalıklara yaklaşımda beslenmenin DNA metilasyonu ile ilişkisine çarpıcı örneklerden biridir.

Sud ve arkadaşları, yüksek fruktozlu bir diyetin, lipid metabolizmasıyla ilgili belirli miRNA'ların seviyelerini önemli ölçüde değiştirdiğini ve bu değişimin, yüksek yağlı diyet ile indüklenenden farklı olduğunu göstermiştir. Çalışmada ele alınan 45 miRNA'dan 19'u yukarı yönlü regüle edilirken 26'sı fruktoz beslemesi ile aşağı yönde regüle olmuştur (Sud ve ark., 2017).

Etçil bir balık olan gökkuşağı alabalığı, yüksek karbonhidratlı bir diyetle (YKD) beslendiğinde kalıcı hipergliseminin ortaya çıkardığı "glikoz

intoleranslı" bir fenotip sergiler. Bu model, epigenetik değişiklikleri izlemek için oldukça idealdir. Marandel ve arkadaşlarının 2016'da bu modeli kullanarak yaptıkları araştırmanın sonuçları, YKD ile beslenen alabalıklarda hepatik epigenomun global analizinde ilk olarak H3K9me3 ve H3K9ac seviyelerinin etkilendiğini ortaya çıkarmıştır (Marandel ve ark., 2016).

- **Protein**

Diyetle protein alımının epigenetik modifikasyonlara etkisiyle alakalı çalışmalar çoğunlukla amino asitlerin metil kaynağı olarak kullanımına yönelmiştir. Aynı zamanda protein metabolizması sonucu ürünlerin asetil-CoA'ya katabolize edilmesi histon asetilasyon modellerini şekillendirebilir. İzolösin, treonin ve aromatik amino asitler olan fenilalanin, triptofan ve tirozin, asetil-CoA'ya metabolize edilir. Benzer şekilde, glutamatın deaminasyonu yoluyla α-ketoglutarat üretimi, kromatin demetilasyonunu etkileyebilmektedir (Keating ve El-Osta, 2015). Treoninin, protein ve amino asit metabolizmasındaki anahtar metabolit konsantransonlarını etkileyerek gen ifadesini değiştirebilmesi, epigenetik düzenlemeye metabolik bir bağlantı sağlar (Sun ve ark., 2022).

Eksozomlar, miRNA gibi düzenleyici molekülleri donörden alıcı hücrelere aktararak hücreler arası iletişimi sağlar ve diyetle alınan sütte miRNA kargo görevi üstlenen eksozomlara rastlanmıştır. Diyetle alınan bu miRNA'ların biyoyararlanımı mümkündür ve hatta sığır sütü tüketen gebe farelerde sığır eksozomları aracığıyla miRNA'ların plasenta ve embriyoya geçebildiği gösterilmiştir (Sadri ve ark., 2020). Maternal beslenmenin etkilerine ilerleyen başlıklar altında daha detaylı bir şekilde değinilecektir.

- **Antioksidan, vitamin ve gıda takviyeleri**

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türlerinin hücreye verdiği zararların önlenmesi için çeşitli enzimlere ve bunların kofaktörlerine ihtiyaç vardır. Çoğunluğu vitamin, minarel ve fitokimyasal olan bu koruyucu bileşenlerin, kanser gibi hastalıkların önlenmesindeki etkinlikleri araştırılmaya hızla devam ederken diyet takviyesi olarak kullanımı da oldukça yaygınlaşmıştır. Bununla birlikte, bu tür bir takviyenin faydalı mı yoksa zararlı mı olduğu belirsizliğini korumaktadır.

C (Askorbik asit), A (karotenoidler ve retinoidler) ve E vitaminleri yanı sıra, antioksidan olarak kullanılan bazı bileşiklerin oksidasyonu geciktirerek veya inhibe ederek vücuttaki serbest radikal konsantrasyonunu azalttığı bilinmektedir (Lobı ve ark., 2010). Kolin, betain, B2, B6 ve B12 vitaminleri gibi S-adenosilmetiyoninin öncüllerinin DNA metilasyon modellerini de etkilediği öne sürülmüştür (Rosa ve ark., 2018).

ATP-bağlayıcı membran kaset taşıyıcısı A1 (ABCA1), HDL-kolesterol konsantrasyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Kadınlarda, diyetle daha yüksek vitamin alımı (A vitamini, β-karoten, folik asit, C vitamini, D vitamini ve E vitamini), daha düşük ortalama ABCA1 metilasyon seviyeleri ile ilişkilendirilmiş, ortalama ABCA1 metilasyonu ile HDL arasında önemli bir ters ilişki gösterilmiştir (Fujii ve ark., 2019). TET enzimleri (TET 1,2,3) aktif DNA demetilasyon yolundaki önemli adımlarda rol alır ve TET'lerin optimum katalitik aktivite için C vitaminine bağımlılığı, beslenmenin epigenetik üzerindeki etkisi düşünüldüğünde özellikle alakalı hale gelir (Coker ve ark., 2022).

Son bulgularla, ROS ile indüklenen apoptozu inhibe ederken kanser tedavisini olumsuz etkileyebileceği iddialarının yanında diyetle A vitamini (retinoidler, karotenoidler) gibi antioksidanların alınmasının, oksijen ve nitrojen serbest radikallerini nötralize ederek hücresel dengeyi koruyabileceğine dikkat çekilmektedir (de Carvalho Melo-Cavalcente ve ark., 2019). Yine C vitamini eksikliğinin böbreklerde DNA metilasyon değişikliğine yol açarak akut tübüler nekroza neden olduğu da gösterilmiştir (Yu ve ark., 2022). D vitamini, kanser hücrelerinde miRNA aracılı koruyucu rol oynarken oral kullanımına bağlı gen ifadesi değişiklikleri de çok sayıda in vivo çalışmayla desteklenmektedir (Negri ve ark., 2020).

Epigallokateşin-gallat (EGCG), resveratrol, kurkumin ve antosiyaninler gibi bitki kaynaklı polifenoller kanser insidansını azaltabilecek doğal terapötikler olarak görülmektedir (Lagoa ve ark., 2022). Yeşil çay (Camellia sinensis) kökenli EGCG, epigenetik değiştiriciler DNMT1, HDAC1, HDAC2 ifadesini aşağı yönde regüle edebilmektedir (Borutinskaitė ve ark., 2018). Curcumin'in antiproliferatif aktivitesi, HDAC aktivitesinin inhibisyonu (Lee ve ark., 2011) ile olurken apigenin, in vitro ve in vivo olarak prostat kanseri hücrelerinde H3 ve H4 asetilasyonuna bağlı olarak p21 ifadesini artırdığı ve apoptozu indüklediği (Pandey ve ark., 2012) gösterilmiştir.

Çay kateşinleri, kurkumin, kersetin ve resveratrol tarafından ortak olarak düzenlenen dört mikroRNA'nın (miRNA-1, -197, -21 ve -296-5p) tümü meme, prostat ve akciğer kanserlerindeki süreçlerle bağlantılıdır (Lagoa ve ark., 2022). Bir fitoaleksin olan resveratrolün in vitro şartlarda BRCA1 promotörünün hipermetilasyonunu önleyerek meme kanserleri için etkili olabileceği (Papoutsis ve ark., 2012) ve insan meme kanseri hücrelerinde BRCA1, p53 ve p21 ifadelerinin kontrolüne histon metilasyonu ve asetilasyonu ile aracılık ettiği (Chatterjee ve ark., 2019) gösterilmiş, in vivo koşullar altında da resveratrolün kansere karşı koruyucu etkisi olduğu ifade edilmiştir (Papoutsis ve ark., 2015).

Gerçekten de önemli miktarda bitki polifenollerinin, DNA metilasyonu üzerindeki etkiler de dahil olmak üzere çeşitli işlemler yoluyla genomik DNA'yı stabilize edebileceğine dair ikna edici kanıtlar vardır (Ferguson ve ark., 2015; Lagoa ve ark., 2022). Farklı klinik çalışmalar kakao polifenollerinin, kardiyovasküler riski olan bireylerde lökositlerdeki global DNMT seviyelerini düşürerek DNA metilasyonunu azalttığını göstermiştir (Soler-Botija ve ark., 2020).

Yağ alımı etkilerinden yukarıda çokça bahsetmişken balık yağı, zeytinyağı, ceviz ve badem vs. kaynaklı omega 3 ve omega 6 gibi çoklu duymamış yağ asiti (ÇDYA) kaynaklarının tüketimine de değinmek gerekir. Gebelik ve laktasyon sırasında annenin α-linolenik asit alımı, DNA metilasyon örüntüsünü değiştirerek anne ve yavruda gelişim ve çok sayıda hastalıktan korunmada önemli rol üstlenen çoklu doymamış yağ asiti metabolizmasını düzenler (Niculescu ve ark., 2013) ve maternal ÇDYA optimal seviyesi, plasentanın yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü koruyup plasental epigenetik değişiklikleri kontrol ederek fetal büyümeyi destekler (Basak ve Duttaroy, 2022). miRNA'lar da nöronal gelişim ve hayatta kalmada merkezi bir rolü oynar, madde bağımlılığı ve ilaç kullanımında gen ifadesini yönlendirici özellikler sergilerler (Kenny, 2014).

Hamilelikte sigara, alkol, ilaç ve uyuşturucu madde kullanımının zararları herkes tarafından bilinirken beslenmenin gelecek nesillerde yarattığı epigenetik yeniden düzenlenme konusu üzerinde de durmak gerekir.

- **Beslenme kaynaklı epigenetik modifikasyonların kalıtsal etkisi**

Artan sayıda çalışma ile farklı epigenetik modifikasyonların normal germ hücre oluşumu ve erken embriyonik gelişim sırasında gerekli olduğu ve bu modifikasyonların sonraki nesillerde hastalık nedeni olabileceği açık hale gelmektedir (Coker ve ark., 2022). Yukarıda bahsedildiği gibi epigenetik değişiklikler kalıtılabilir ve bir genin maternal veya paternal allelinin ifade edilmesi fetüsün gelişiminde belirleyici olabilir. Epigenetik değişiklikler ve değişmiş fenotipler ikinci nesilde devam ettiği için folat eksikliği, yavrularda bazı genlerin hipometilasyonuna yol açabileceğinden, bunun anne diyetinde özellikle önemli olduğu vurgulanmaktadır (Joshi ve ark., 2020).

Yetersiz beslenme gibi aşırı beslenme durumu da sonraki nesiller için tehdit unsuru olabilir. Ebeveyn obezitesi, fetal epigenetik değişikliklere neden olur ve yavrularda doğum sonrası obezite, diyabet ve metabolik sendrom insidansını arttırır (Park ve ark., 2017). Umbilikal kord DNAsı metilasyon kalıpları ile ebeveyn obezitesi arasındaki potansiyel ilişkiler incelendiğinde obez babaların çocuklarında IGF-2 genindeki DNA metilasyonu, obez olmayan babaların çocuklarına göre önemli ölçüde daha düşük bulunması (Tokunaga ve ark., 2013), yalnızca annenin değil spermatogenez öncesinde baba beslenmesinin de çocuklarda gen ifadesi değişikliğine yol açarak kanser gibi hastalıklara yatkınlığı artıracağının işaretidir.

Doğum öncesi ve doğum sonrası erken evrelerdeki yiyeceklerin diyabet ve kalp hastalığı gibi erişkin başlangıçlı hastalıkları etkilediği de düşünülmektedir. Prenatal ve erken postnatal gelişim sırasında oluşturulan kromatin değişimleri, besin mevcudiyeti ve metabolit konsantrasyonundaki değişikliklere yanıt verebildiğinden, gebelikte ortaya çıkan epigenetik varyasyon, kalıcı metabolik ekspresyon profillerini yönlendirme konusunda güçlü bir kapasiteye sahiptir (Keating ve El-Osta, 2015).

Gökkuşağı alabalığında Callet ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma, Maternal ve paternal yüksek karbonhidrat/düşük yağ diyet kombinasyonlarının, sonraki nesillerde enerji metabolizmasını ve mitokondriyal dinamikleri değiştirerek sinerjetik bir etkinin varlığını göstermiştir. Bütün yavruların global DNA metilasyonu, ebeveynin diyetinden oldukça etkilenmiştir (Callet ve ark., 2021).

Mevcut kanıtlara göre maternal hipergliseminin yarattığı epigenetik örüntü, hücre proliferasyonu, apoptoz, göç ve farklılaşma yolları ile kardiyak morfogenezin erken evreleri için gereklidir ve kalbin farklı bölümlerinde önemli gelişimsel roller oynar (Duenyas, 2019). Folat, B vitamini, kolin ve betain gibi metil donörleri yanında C vitamini alımının da embriyonik nöral gelişime katkısı olduğu bildirilmiştir (Coker ve ark., 2022).

Monozigotik ikizlerin fötal ve plasental incelemelerinde görülen DNA metilasyonu değişiklikleri (Lim ve ark., 2021) yanında çok sayıda miRNA'nın kardiyogenez ve hipertansiyon ile ilişkili olduğu ifade edilirken (Golonka ve ark., 2021) bu karmaşık yolağın diğer epigenetik modifikasyonlardan da etkilenebileceği şüphe götürmez.

Alanda yapılan kapsamlı derlemeler, maternal ve paternal beslenmede protein, A vitamini, resveratrol, EGCG, ginestein, antosiyanin gibi polifenollerin mayozdan laktasyona kadar geçen kritik süreçte DNA metilasyonu, histon modifikasyonu ve kodlanmayan RNA'ların etkisini (Silva ve ark., 2019, Joshi ve ark., 2020) gözler önüne sermektedir.

Bu maruz kalmaların epigenom üzerinden, yavrular üzerindeki uzun vadeli etkilerini tasvir edebilmek için kohort çalışmaları da dahil olmak üzere daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bağırsak florası ve epigenetik

Oldukça geniş ve derin bir araştırma alanı olarak farklı bir bölümde ele alınabilecek olsa da beslenme söz konusu olduğunda atlanmaması gereken bir konu da bağırsak florasıdır. İnsan bağırsağı, yaklaşık 100 farklı türden 100 trilyon canlı bakteri barındırır ve bu nedenle, bağırsak son derece çeşitli metabolik süreçleri yönlendiren, sağlığı ve hastalıklara karşı direnci etkileyen enzimler içerir (Mitsuoka, 2000).

Diyet, bağırsak mikrobiyotasının bileşimini şekillendirirken bakterilerin dağılımındaki farklılıklar, konakçının mikrobiyal metabolitlere maruziyetini etkiler. Yüksek lifli gıdalar, mikrobiyom tarafından kısa zincirli yağ asitlerine, izotiyosiyanatlara ve polifenolik türevlere metabolize edilip gen ifadesinin epigenetik kontrolünü değiştirebilen bir dizi karmaşık fitokimyasal içerir (Hullar ve Fu, 2014).

Birçok bakteri, genomunda histon modifikasyonlarında rol aldığı düşünülen önemli sayıda gen tanımlanmıştır (Alvarez-Venegas, 2014). Aynı

zamanda mikrobiyal metabolitler, DNA üzerindeki doğrudan genotoksik etkileri ve histon asetilasyonu ve/veya CpG metilasyonu yoluyla epigenetik mekanizmaları modüle ederek mikrosatellit kararsızlığı/kromozomal kararsızlık gösteren tümörlerin gelişimini etkileyebilir (Hullar ve ark., 2014).

Diyet faktörleriyle birlikte mikrobiyata, kolorektal kanser gelişimi için önemli çevresel risk belirleyicileri olarak kabul edilir. Epidemiyolojik gözlemlere göre kolorektal kanser, yüksek yağ alımı ile pozitif; yüksek lif alımı ile negatif ilişkilidir (Ocvirk ve ark., 2019). Bununla birlikte, bağırsaktaki bazı bakterilerin zararlı maddeleri etkisiz hale getirdiği (Mitsuoka, 1996) de uzun zamandır bildirilmektedir.

Diyet ve mikrobiyotanın metabolizma ve epigenetik üzerindeki etkileri, henüz tam aydınlatılamamış olsa da araştırmalar, türetilen metabolitlerin epigenetik ile dinamik etkileşime sahip olduğunu ve beslenme ve diğer yaşam tarzı değişkenlerinin sağlıkla ilgili etkilerine aracılık etmede önemli bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir (Dai ve ark., 2020).

SONUÇ VE TARTIŞMA

Epigenom, gelişimin çeşitli aşamalarında çevresel etkilere karşı savunmasız görünmektedir ve bu aşamalarda indüklenen gen ifadesi değişiklikleri, yetişkin fenotipini etkileyerek uzun süreler boyunca devam edebilir (Ferguson ve ark., 2015). Genomu stabilize etmede besin alımını optimize etmenin önemli bir rolü olduğuna şüphe yoktur.

Bir kısmı bu bölümde sunulan ve hızla devam eden araştırmalar, bireyin diyetini genetik yapısına uyarlama ihtiyacının altını çizmektedir. Ancak insan diyeti; hayvansal, bitkisel ve kimyasal bileşenleri içeren oldukça geniş bir yelpazeden oluşmaktadır. Bu bileşenlerin değişen kombinasyonlarının bağımsız epigenetik düzenlemeler aracılığıyla çok sayıda dokuda binlerce genin ifadesini değerlendirmek, neredeyse sonsuz sayıda denklem çözmeyi gerektirir. Bu durum, belirli bir genom, metabolom ve hatta "mikrobiyom"un, besin metabolizması, emilim gibi faktörlerle nasıl bir ilişkide olduğunu belirlemeyi amaçlayan ve biyoinformatikle kaçınılmaz dirsek teması olan, yeni bir alanı, "nutrigenomik"i ortaya çıkarmıştır. Nutrigenomiğin yeni gıda takviyeleri ve bileşenlerinin üretilmesi ve pazarlanmasında da yönlendirici olacağı açıktır. Kim bilir belki birçoğumuzun hayalini kurduğu bir hap alarak bütün besin ihtiyaçlarımızı karşılamak fantezisi çok yakında gerçek olacak ve

enerji ihtiyacımızın karşılanması yanında genel sağlık durumumuzun iyileştirilmesine de olanak sağlayacaktır.

Bütün bu merak ve hayaller, post-endüstriyel dünyada bedeni anlamak ve iyileştirmek için koşar adım ilerleyen tıbbi biyolojik araştırmaların rolünü kaçınılmaz kılmaktadır. Görünen o ki gelecek, belki biraz korkutucu ama kesinlikle umut ve heyecan verici şekilde bilim insanlarına göz kırpmaktadır.

KAYNAKÇA

Abdollahi, M., Kato, M., Lanting, L., Wang, M., Tunduguru, R., & Natarajan, R. (2022). Role of miR-379 in high-fat diet-induced kidney injury and dysfunction. *American journal of physiology. Renal physiology*, *323*(6), F686–F699.

Alvarez-Venegas R. (2014). Bacterial SET domain proteins and their role in eukaryotic chromatin modification. *Frontiers in genetics*, *5*, 65.

An, T., Zhang, T., Teng, F., Zuo, J. C., Pan, Y. Y., Liu, Y. F., Miao, J. N., Gu, Y. J., Yu, N., Zhao, D. D., Mo, F. F., Gao, S. H., & Jiang, G. (2017). Long non-coding RNAs could act as vectors for paternal heredity of high fat diet-induced obesity. *Oncotarget*, *8*(29), 47876–47889.

Basak, S., & Duttaroy, A. K. (2022). Maternal PUFAs, Placental Epigenetics, and Their Relevance to Fetal Growth and Brain Development. *Reproductive Sciences*, 1-20.

Biniszkiewicz, D., Gribnau, J., Ramsahoye, B., Gaudet, F., Eggan, K., Humpherys, D., ... & Jaenisch, R. (2002). Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Molecular and cellular biology*, 22(7), 2124-2135.

Borutinskaitė, V., Virkšaitė, A., Gudelytė, G., & Navakauskienė, R. (2018). Green tea polyphenol EGCG causes anti-cancerous epigenetic modulations in acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia & lymphoma*, 59(2), 469-478.

Bure, I. V., Nemtsova, M. V., & Kuznetsova, E. B. (2022). Histone Modifications and Non-Coding RNAs: Mutual Epigenetic Regulation and Role in Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5801.

Callet, T., Li, H., Coste, P., Glise, S., Heraud, C., Maunas, P., ... & Marandel, L. (2021). Modulation of energy metabolism and epigenetic landscape in rainbow trout fry by a parental low protein/high carbohydrate diet. *Biology*, 10(7), 585.

Carrer, A., Parris, J. L., Trefely, S., Henry, R. A., Montgomery, D. C., Torres, A., ... & Wellen, K. E. (2017). Impact of a high-fat diet on tissue Acyl-CoA and histone acetylation levels. *Journal of Biological Chemistry*, 292(8), 3312-3322.

Cavalli, G., & Heard, E. (2019). Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*, 571(7766), 489-499.

Chatterjee, B., Ghosh, K., & Kanade, S. R. (2019). Resveratrol modulates epigenetic regulators of promoter histone methylation and acetylation that restores BRCA1, p53, p21CIP1 in human breast cancer cell lines. *BioFactors*, 45(5), 818-829.

Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., ... & Gingeras, T. R. (2005). Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science*, 308(5725), 1149-1154.

Chinchilla, A., Lozano, E., Daimi, H., Esteban, F. J., Crist, C., Aranega, A. E., & Franco, D. (2011). MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: a role for miR-27 modulating Mef2c expression. *Cardiovascular research*, 89(1), 98-108.

Coker, S. J., Smith-Díaz, C. C., Dyson, R. M., Vissers, M. C., & Berry, M. J. (2022). The epigenetic role of vitamin C in neurodevelopment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1208.

Cone, J. J., Chartoff, E. H., Potter, D. N., Ebner, S. R., & Roitman, M. F. (2013). Prolonged high fat diet reduces dopamine reuptake without altering DAT gene expression. *PloS one*, 8(3), e58251.

Cordero, P., Campion, J., Milagro, F. I., & Martinez, J. A. (2013). Transcriptomic and epigenetic changes in early liver steatosis associated to obesity: effect of dietary methyl donor supplementation. *Molecular genetics and metabolism*, 110(3), 388-395.

Costa, F. F. (2008). Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene*, 410(1), 9-17.

Dai, Z., Ramesh, V., & Locasale, J. W. (2020). The evolving metabolic landscape of chromatin biology and epigenetics. *Nature Reviews Genetics*, 21(12), 737-753.

de Carvalho Melo-Cavalcante, A. A., da Rocha Sousa, L., Alencar, M. V. O. B., de Oliveira Santos, J. V., Oliveira da Mata, A. M., Paz, M. F. C. J., ... & e Sousaa, J. M. D. C. (2019). Retinol palmitate and ascorbic acid: Role in oncological prevention and therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 1394-1405.

Dolinoy, D. C. (2008). The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutrition reviews*, 66(suppl_1), S7-S11.

Duan, Y., Zeng, L., Zheng, C., Song, B., Li, F., Kong, X., & Xu, K. (2018). Inflammatory links between high fat diets and diseases. *Frontiers in immunology*, 9, 2649.

Esteller, M., Fraga, M. F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A. K., ... & Herman, J. G. (2001). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Human molecular genetics*, 10(26), 3001-3007.

Ferguson, L. R., Chen, H., Collins, A. R., Connell, M., Damia, G., Dasgupta, S., ... & Maxwell, C. A. (2015, December). Genomic instability in human cancer:

Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *In Seminars in cancer biology* (Vol. 35, pp. S5-S24).

Ferreira, H. J., & Esteller, M. (2018). Non-coding RNAs, epigenetics, and cancer: tying it all together. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37(1), 55-73.

Fujii, R., Yamada, H., Munetsuna, E., Yamazaki, M., Ando, Y., Mizuno, G., ... & Suzuki, K. (2019). Associations between dietary vitamin intake, ABCA1 gene promoter DNA methylation, and lipid profiles in a Japanese population. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 110(5), 1213-1219.

Gibney, E. R., & Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), 4-13.

Golonka, R. M., Cooper, J. K., Issa, R., Devarasetty, P. P., Gokula, V., Busken, J., ... & Joe, B. (2021). Impact of Nutritional Epigenetics in Essential Hypertension: Targeting microRNAs in the Gut-Liver Axis. *Current Hypertension Reports*, 23(5), 1-14.

Hullar, M. A., Burnett-Hartman, A. N., & Lampe, J. W. (2014). Gut microbes, diet, and cancer. *Advances in nutrition and cancer*, 377-399.

Hullar, M. A., & Fu, B. C. (2014). Diet, the gut microbiome, and epigenetics. *Cancer Journal* (Sudbury, Mass.), 20(3), 170.

Issa, J. P. (2022). The Two-Hit Hypothesis Meets Epigenetics. *Cancer Research*, 82(7), 1167-1169.

Jacobsen, S. C., Brøns, C., Bork-Jensen, J., Ribel-Madsen, R., Yang, B., Lara, E., ... & Vaag, A. (2012). Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. *Diabetologia*, 55(12), 3341-3349.

Jin, Z., & Liu, Y. (2018). DNA methylation in human diseases. *Genes & diseases*, 5(1), 1-8.

Kabartan, E., Gunes, S., Arslan, M. A., & Asci, R. (2019). Investigating the relationship between BRCA1 and BRCA2 genes methylation profile and sperm DNA fragmentation in infertile men. *Andrologia*, 51(7), e13308.

Kantor, B., Kaufman, Y., Makedonski, K., Razin, A., & Shemer, R. (2004). Establishing the epigenetic status of the Prader–Willi/Angelman imprinting center in the gametes and embryo. *Human molecular genetics*, 13(22), 2767-2779.

Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. A., Duttagupta, R., Willingham, A. T., ... & Gingeras, T. R. (2007). RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*, 316(5830), 1484-1488.

Keating, S. T., & El-Osta, A. (2015). Epigenetics and metabolism. *Circulation research*, 116(4), 715-736.

Kenny, P. J. (2014). Epigenetics, microRNA, and addiction. *Dialogues in clinical neuroscience*, 16(3), 335-344.

Kim, M. S. (2022). The neural basis of weight control and obesity. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(4), 347-348.

Kresovich, J. K., Park, Y. M. M., Keller, J. A., Sandler, D. P., & Taylor, J. A. (2022). Healthy eating patterns and epigenetic measures of biological age. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 115(1), 171-179.

Lee, S. J., Krauthauser, C., Maduskuie, V., Fawcett, P. T., Olson, J. M., & Rajasekaran, S. A. (2011). Curcumin-induced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo. *BMC cancer*, 11(1), 1-13.

Li, E., Bestor, T. H., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), 915-926.

Li, W., Tang, R., Ma, F., Ouyang, S., Liu, Z., & Wu, J. (2018). Folic acid supplementation alters the DNA methylation profile and improves insulin resistance in high-fat-diet-fed mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 59, 76-83.

Lim, T. B., Foo, S. Y. R., & Chen, C. K. (2021). The role of epigenetics in congenital heart disease. *Genes*, 12(3), 390.

Liu, W., Ma, C., Yang, B., Yin, C., Zhang, B., & Xiao, Y. (2017). LncRNA Gm15290 sponges miR-27b to promote PPARγ-induced fat deposition and contribute to body weight gain in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 493(3), 1168-1175.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118–126.

Luger, K., Dechassa, M. L., & Tremethick, D. J. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair?. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(7), 436-447.

Marandel, L., Lepais, O., Arbenoits, E., Véron, V., Dias, K., Zion, M., & Panserat, S. (2016). Remodelling of the hepatic epigenetic landscape of glucose-intolerant rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by nutritional status and dietary carbohydrates. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.

Mitsuoka, T. (1996). Intestinal flora and human health. *Asia Pac J Clin Nutr*, 5(1), 2-9.

Mitsuoka, T. (2000). Significance of dietary modulation of intestinal flora and intestinal environment. *Bioscience and microflora*, *19*(1), 15-25.

Moore, L. D. (2013). Le T and Fan G: DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38.

Nazari, M., Saberi, A., Karandish, M., & Jalali, M. T. (2018). Adipose tissue miRNA level variation through conjugated linoleic acid supplementation in diet-induced obese rats. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(11), 1477-1482.

Negri, M., Gentile, A., de Angelis, C., Montò, T., Patalano, R., Colao, A., Pivonello, R., & Pivonello, C. (2020). Vitamin D-Induced Molecular Mechanisms to Potentiate Cancer Therapy and to Reverse Drug-Resistance in Cancer Cells. *Nutrients*, 12(6), 1798.

Niculescu, M. D., Lupu, D. S., & Craciunescu, C. N. (2013). Perinatal manipulation of α-linolenic acid intake induces epigenetic changes in maternal and offspring livers. *The FASEB Journal*, 27(1), 350-358.

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402.

Ocvirk, S., Wilson, A. S., Appolonia, C. N., Thomas, T. K., & O'Keefe, S. J. (2019). Fiber, fat, and colorectal cancer: new insight into modifiable dietary risk factors. *Current gastroenterology reports*, 21(11), 1-7.

Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-257.

Pandey, M., Kaur, P., Shukla, S., Abbas, A., Fu, P., & Gupta, S. (2012). Plant flavone apigenin inhibits HDAC and remodels chromatin to induce growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells: in vitro and in vivo study. *Molecular carcinogenesis*, 51(12), 952-962.

Papoutsis, A. J., Borg, J. L., Selmin, O. I., & Romagnolo, D. F. (2012). BRCA-1 promoter hypermethylation and silencing induced by the aromatic hydrocarbon receptor-ligand TCDD are prevented by resveratrol in MCF-7 cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(10), 1324-1332.

Papoutsis, A. J., Selmin, O. I., Borg, J. L., & Romagnolo, D. F. (2015). Gestational exposure to the AhR agonist 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces BRCA-1 promoter hypermethylation and reduces BRCA-1 expression in mammary tissue of rat offspring: Preventive effects of resveratrol. *Molecular carcinogenesis*, 54(4), 261-269.

Park, J. H., Kim, S. H., Lee, M. S., & Kim, M. S. (2017). Epigenetic modification by dietary factors: Implications in metabolic syndrome. *Molecular aspects of medicine*, 54, 58-70.

Peterson, C. L., & Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. *Current Biology*, 14(14), R546-R551.

Rosa, R., Ornella, R., Maria, G. C., Elisa, S., Maria, N., Chiara, M., ... & Gioacchino, L. (2018). The role of diet in the prevention and treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, 89(Suppl 9), 60.

Sadri, M., Shu, J., Kachman, S. D., Cui, J., & Zempleni, J. (2020). Milk exosomes and miRNA cross the placenta and promote embryo survival in mice. *Reproduction*, 160(4), 501-509.

Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(4), a018713.

Silva, L. B. A. R., Pinheiro-Castro, N., Novaes, G. M., Pascoal, G. D. F. L., & Ong, T. P. (2019). Bioactive food compounds, epigenetics and chronic disease prevention: Focus on early-life interventions with polyphenols. *Food Research International*, 125, 108646.

Soler-Botija, C., Forcales, S. V., & Genís, A. B. (2020, January). Spotlight on epigenetic reprogramming in cardiac regeneration. *In Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 97, pp. 26-37). Academic Press.

Sud, N., Zhang, H., Pan, K., Cheng, X., Cui, J., & Su, Q. (2017). Aberrant expression of microRNA induced by high-fructose diet: implications in the pathogenesis of hyperlipidemia and hepatic insulin resistance. *The Journal of nutritional biochemistry*, 43, 125-131.

Sun, L., Zhang, H., & Gao, P. (2022). Metabolic reprogramming and epigenetic modifications on the path to cancer. *Protein & cell*, 13(12), 877–919.

Takahashi, K., Sasano, T., Sugiyama, K., Kurokawa, J., Tamura, N., Soejima, Y., ... & Furukawa, T. (2016). High-fat diet increases vulnerability to atrial arrhythmia by conduction disturbance via miR-27b. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 90, 38-46.

Tokunaga, M., Takahashi, T., Singh, R. B., De Meester, F., & Wilson, D. W. (2013). Nutrition and epigenetics. *Medical Epigenetics*, 1(1), 70-77.

Vasudevan, S. (2012). Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews*: *RNA*, 3(3), 311-330.

Vickers, K. C., Shoucri, B. M., Levin, M. G., Wu, H., Pearson, D. S., Osei-Hwedieh, D., ... & Sethupathy, P. (2013). MicroRNA-27b is a regulatory hub in lipid metabolism and is altered in dyslipidemia. *Hepatology*, 57(2), 533-542.

Wei, J. W., Huang, K., Yang, C., & Kang, C. S. (2017). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncology reports*, 37(1), 3-9.

Williams, M. D., & Mitchell, G. M. (2012). MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Experimental diabetes research*, 2012.

Yu, Z., Xu, Z., Liang, Y., Yin, P., Shi, Y., Yu, J., ... & Ci, W. (2022). Vitamin C Deficiency Causes Cell Type–Specific Epigenetic Reprogramming and Acute

Tubular Necrosis in a Mouse Model. *Journal of the American Society of Nephrology*, 33(3), 531-546.

Zwamborn, R. A., Slieker, R. C., Mulder, P. C., Zoetemelk, I., Verschuren, L., Suchiman, H. E. D., ... & Heijmans, B. T. (2017). Prolonged high-fat diet induces gradual and fat depot-specific DNA methylation changes in adult mice. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.

BÖLÜM 13

BESLENME VE IVF

Op. Dr. Ümit Doğan ÇELİK[1]
Dr. Midvar DASHDAMİROVA[2]
Prof. Dr. Cengiz KARAKAYA[3]

[1] Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD Ankara/TÜRKİYE, umitdogancelik@gazi.edu.tr, ORCID No: 0000-0001-5311-9011
[2] Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD Ankara/TÜRKİYE, midvar.dashdamirova@gazi.edu.tr
[3] Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD ve Tüp Bebek Merkezi Ankara/TÜRKİYE, karakayac@gazi.edu.tr

GİRİŞ

İnfertilite, 1 yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen spontan olarak gebe kalınamaması durumu olarak tanımlanmıştır. Sağlıklı çiftlerde 1 yıllık süreçte korunmasız ilişki ile spontan gebelik oranları değişik kaynaklarda % 85-90 olarak belirtilmektedir (Fritz ve Speroff, 2011). Hiç gebeliği olmayan çiftler primer infertil, en az bir klinik gebelik geçmişi olan ancak sonrasında gebelik oluşmayan çiftler ise sekonder infertil olarak tanımlanmıştır (Tabong ve ark., 2013).

İn-Vitro fertilizasyon (IVF)

IVF, infertil kadınlarda, eksojen gonadotropin verilerek kontrollü ovaryen stimülasyon (KOS) uygulanması sonucu elde edilen oositlerin toplanarak, hücre dışı ortamda sperm ile inkübasyonu ve fertilizasyonunun sağlanarak elde edilen embriyoların, uterusa transfer edilmesini içeren yardımcı üreme tekniği olarak bilinir (Awadalla ve ark., 2004).

Kontrollü ovaryen stimülasyon (KOS)

Kontrollü ovaryen stimülasyon, IVF yapılacak infertil hastalarda, overlerden optimum sayı ve kalitede oosit elde edilmesi amacıyla bir siklusta çok sayıda folikülün olgunlaştırılmasıdır. Bu sayede fertilizasyon şansı, transfer edilebilecek embriyo seçeneği ve dolayısıyla başarı şansı da artar. Birçok ovaryen stimülasyon protokolü mevcut olmakla birlikte standart bir protokol yoktur. Uygulanacak stimülasyon protokolü hastanın yaşı, over rezervi gibi birçok değişkene göre değerlendirilip kişiselleştirilmelidir.

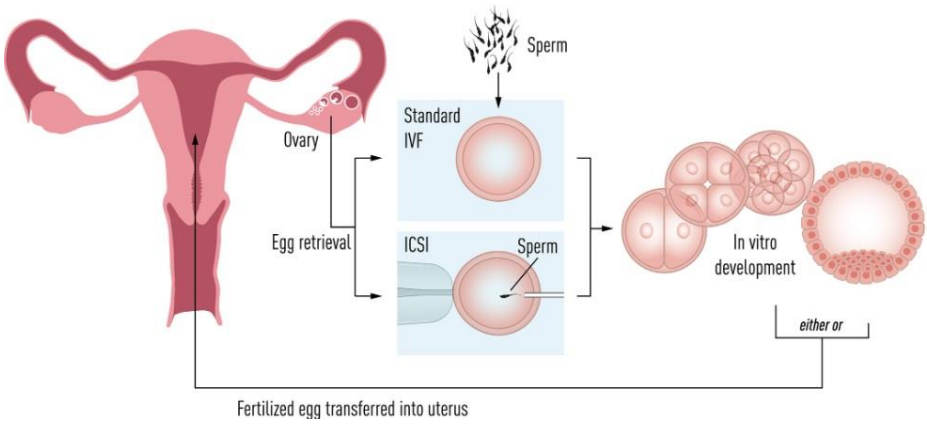
Yumurta toplama işlemi (OPU)

Kontrollü ovaryen stimülasyon sonucu elde edilen foliküller 17-18 mm'ye ulaştığında tetiklenme işlemi yapılır. Tetiklenme işleminden yaklaşık 36 saat sonra transvajinal USG eşliğinde 16-17 G'lik iğne ile foliküler sıvı ve oositler aspire edilir. Bu sırada yaklaşık 100-200 mmHg negatif vakum basıncı kullanılır.

Embriyo transferi (ET)

Toplanan oositlerin fertilizasyonu için, mastürbasyon yoluyla tercihen 3 günlük cinsel perhiz sonrasında erkekten sperm örnekleri alınarak hazırlanır. Ertesi gün fertilizasyon kontrol edilir. Yumurta toplama ve intrasitoplazmik

sperm enjeksiyonu (ICSI) işleminden sonraki 2. ve 3. günlerde embriyoların klivaj ve kaliteleri blastomer sayılarına, morfolojilerine ve fragmantasyon oranlarına bakılarak değerlendirilir. Ardından hastaların embriyoları 3. ya da 5.gün embriyosu olmak üzere kanuni düzenlemelere göre 1-2 adet olarak USG eşliğinde transfer edilir (Şekil 1) (Henriksson, 2021).



Şekil 1. IVF prosedürü

Beslenme ve biyolojik makromoleküller

Besinler, canlı bir organizmadaki yaşamsal işlevleri sürdürebilmek için ihtiyaç duyulan ve beslenme yoluyla vücuda alınabilen kimyasal maddelerdir. İnsan vücudu için gerekli olan altı temel besin sınıfı vardır: Karbonhidratlar, lipitler, proteinler, vitaminler, mineraller ve su. Bunlardan karbonhidratlar, lipitler ve proteinler makro besin molekülleri olarak kabul edilirler ve enerji kaynağı olarak kullanılırlar (Morris ve ark., 2022).

Karbonhidratlar

Karbonhidratlar, insan vücudunda birincil enerji kaynağı olarak kullanılan temel makro besin öğeleridir ve 1 gr karbonhidrat, 4 kcal enerji içerir (Guenther ve ark., 2000).

Karbon, hidrojen ve oksijenden oluşan organik moleküllerdir (Cummings ve ark., 2007).

Karbonhidratlar, meyve-sebzeler, tahıl grubu besinler ve süt gibi bitki orjinli gıdalarda bulunur. Basit karbonhidratlar olarak sınıflandırılan monosakkaritler ve disakkaritler olarak ya da kompleks karbonhidratlar olan oligosakkaritler ve polisakkaritler şeklinde vücuda alınırlar. Monosakkaritler olan glukoz, galaktoz ve fruktoz, tüm karbonhidratların temel yapı taşlarıdır. Disakkaritler olan laktoz, sükroz ve maltoz iki şeker biriminden oluşurlar. Oligosakkaritler 3-10 şeker biriminden oluşan rafinoz ve stakiyozdur. Polisakkaritler ise 10'dan fazla şeker birimi içerirken, nişasta, glikojen, pektin ve selüloz gibi liflerden oluşurlar.

Glikoz metabolizması sırasında vitamin B1 (tiamin), B2 (riboflavin) ve B3 (niasin) koenzim olarak kullanılır (Dashty ve ark., 2013).

Proteinler

Proteinler, karbon, hidrojen, oksijen ve nitrojen içeren aminoasit polimerleridir. Daha çok hücre yapısına katılan, ancak gerektiğinde enerji üretiminde de kullanılabilen temel makro besinlerdendir. 1 gr protein, 4 kcal enerji içerir. Proteinler, vücutta azot dengesinin sağlanmasında da rol oynamaktadırlar (Trumbo ve ark., 2002). Sadece beslenme yoluyla vücuda alınabilen, vücutta sentezlenemeyen aminoasitler, esansiyel aminoasitler olarak adlandırılırlar ve bunlar: Histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valindir. Esansiyel olmayan aminoasitler ise: Alanin, arginin, asparajin, aspartat, sistein, glutamat, glutamin, glisin, prolin, serin ve tirozindir (Hou ve ark., 2017).

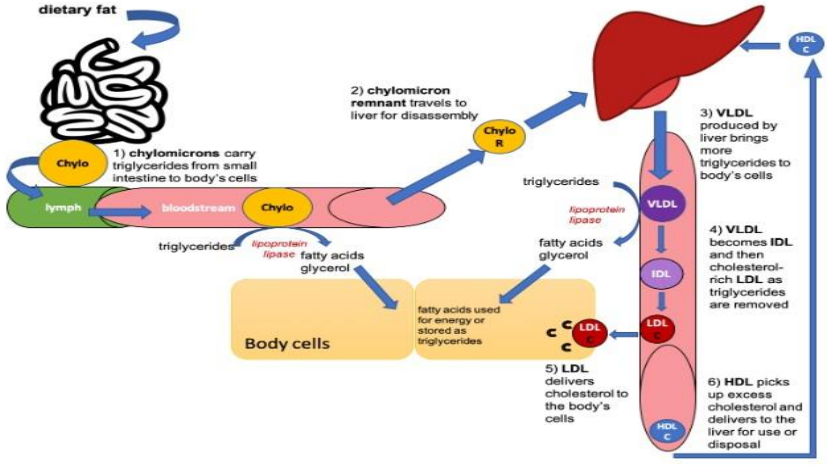
Lipitler

Lipitler, hücresel yapı ve enzimatik reaksiyonlara katılan, vücut sıcaklığını düzenleyen, aynı zamanda vücutta enerji depolanmasında görev alan temel makro besinlerdir. 1 gr yağ, 9 kcal enerji içerir (Guenther ve ark., 2000). Beslenmeyle vücuda alınan lipitler genellikle trigliseritler, fosfolipitler, kolesterol ve yağ asitleri formundadır. Hiç karbon-karbon çift bağı içermeyen yağ asitleri doymuş olarak sınıflandırılırken, en az bir karbon-karbon çift bağı içeren yağ asitleri doymamış olarak sınıflandırılır (Burdge ve ark., 2015).

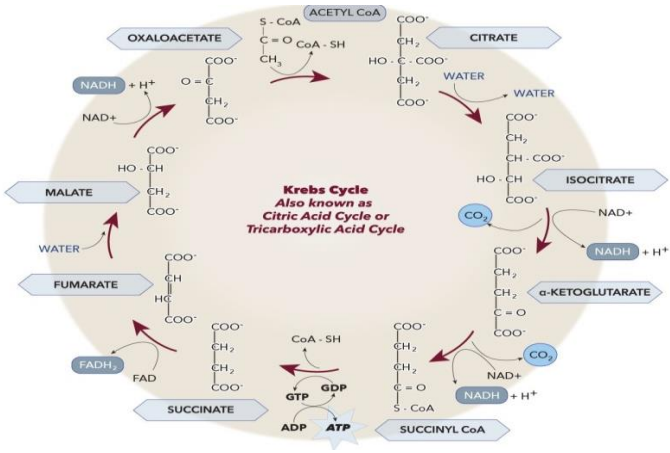
Lipoproteinler, kan dolaşımında lipitlerin taşınmasından sorumludur ve hücrelere alınacak yağ asitleri, lipoprotein lipaz enzimi tarafından serbestlenir. Karaciğerde, trigliseridler, kolesterol, fosfolipitler ve proteinler birleşerek çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL)' i oluştururlar. VLDL, trigliseritleri

hücrelere taşır ve bu esnada düşük dansiteli lipoprotein (LDL)' e dönüşmeye başlar. LDL, kolesterolün hücreye alınması için reseptörlerine bağlanır. Geri kalan lipidler hücreleri yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) formunda terk ederler (Şekil 2) (Callahan, 2013).

Lipitler eğer enerji üretimi için kullanılacaklarsa, glikoz metabolizmasına farklı noktalardan girebilirler. Trigliseritler, yağ asidi ve gliserole ayrılır. Serbest yağ asitleri asetil-CoA'ya oksitlenerek sitrik asit döngüsüne girerken, gliserol ise pirüvata dönüşerek enerji üretiminde kullanılabilir (Şekil 3.) (Alabduladhem ve ark., 2022).



Şekil 2. Lipoproteinler ve lipit transportu



Şekil 3. Krebs döngüsü

Folikül sıvısı, oosit mikroçevresi ve biyobelirteçler

Folikül sıvısı, teka ve granüloza hücrelerinin salgılarından ve foliküler sıvıya geçen kan plazma bileşenlerinden oluşur (Fortune ve ark., 1994). IVF tedavisi gören kadınlarda, yumurta toplama sırasında oosit ile birlikte aspire edilir. Folikül sıvısının içeriğinin araştırılması oosit mikro çevresi hakkında fikir verebileceği için önem taşımaktadır.

Folikül sıvısı içeriği (Revelli ve ark., 2009):

- Hormonlar: Gonadotropinler, büyüme gormonu (GH), prolaktin (PRL), östrojen, progesteron, kortikoidler
- TGF-Beta ailesinin büyüme faktörleri: AMH, inhibin, aktivin, kemik morfogenetik protein -15(BMP-15)
- Diğer büyüme faktörleri ve interlökinler: İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), amphiregülin, proinflamatuar sitokinler
- Reaktif oksijen radikalleri ve antioksidan faktörler (melatonin, süperoksit dismutaz (SOD), selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (SeGPx))
- Anti-apoptotik faktörler: sFAS, sFAS-L
- Proteinler, peptid ve aminoasitler: Alfa-fetoprotein, CEA, CA-125, CD44, Alfa1-antitripsin, Leptin, endotelin-2, oosit olgunlaşma inhibitörü (OMI), homosistein (HCY), beta-endorfin, laktoferrin, anjiyotensin 2 (AT2), prorenin, D-aspartik asit
- Şekerler: Hyalüronan, miyo- inositol
- Prostanoidler: Prostaglandin E2 ve F2 (PGE2, PGF2)
- Lipitler: HDL,LDL, trigliserit

Son yıllarda, folikül sıvısı biyo belirteçlerini, IVF sikluslarında elde edilen oosit kalitesi, embriyo kalitesi, gebelik oranlarıyla ilişkilendirmeye çalışan birçok çalışma yapılmıştır. Ancak daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Beslenmeye bağlı değişkenler ve IVF sürecindeki olası etkileri

Güncel dönemde besin takviyeleri ile, IVF tedavisi gören kadınlarda lipit değerlerinin düzenlenmesi ve oksidatif stresin olumsuz etkilerinin azaltılması yoluyla IVF sonuçlarının iyileştirilebileceği konusunda birçok çalışma yapılmaktadır.

Lipit profilinin (HDL, LDL, trigliserit, total kolesterol) IVF'e etkisi

Güncel çalışmalarda net bir fikir birliği olmamakla birlikte, serum lipitlerindeki düşüşün, IVF sikluslarında elde edilen oosit ve embriyo kalitelerini artırdığı yönünde çalışmalar mevcuttur. Ayrıca HDL yüksekliğinin de oosit ve embriyo kalitelerinde iyileşmeyle ilişkisi üzerinde durulmaktadır.

IVF tedavisi gören hastalarda kan lipit düzeyleri ile IVF sikluslarında elde edilen embriyo kaliteleri arasındaki ilişkinin incelendiği bir çalışmada, kanda yüksek trigliserit, LDL ve total kolesterol seviyelerinin embriyo kalitesindeki düşüşle ilişkili olduğu gösterilirken, serum HDL seviyeleri yüksek olan olgularda ise embriyo kalitelerinin daha iyi olduğu saptanmıştır (Wang ve ark., 2020).

Yine fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada, fare kümülüs oosit komplekslerinin yüksek lipit seviyeleri içeren foliküler sıvıya maruz kalmasının artmış endoplazmik retikulum stresi ve bozulmuş oosit olgunlaşması ile ilişkili olduğu ve folikül sıvısında artmış lipit değerlerinin oosit kalitesini düşürdüğü gösterilmiştir (Yang ve ark., 2012).

2017 yılında yapılan başka bir çalışmada ise serum ve folikül sıvısında lipit parametreleri ile embriyo kaliteleri arasındaki ilişki araştırılmış ve hiçbir anlamlı ilişki gösterilememiştir (Hussein ve ark., 2017).

Oksidatif stresin IVF'e etkisi

Reaktif oksijen radikalleri, oksijenin kullanıldığı çeşitli reaksiyonlar sırasında ortaya çıkarlar. Bu reaktivitenin sebebi atomun dış yörüngesindeki eşlenmemiş elektronlardır. Oksijen, diğer radikallerle hızla reaksiyona girer ve serbest radikallerin çoğu oksijenin kendisinden üretilir. Bu serbest radikaller potansiyel olarak toksik metabolitlerdir (Wbster ve ark., 2008).

Kadınlarda her ay overlerde oositler büyümeye ve gelişmeye başlar ancak mayoz bölünme bunlardan sadece baskın olan bir tanesinde devam eder. Bu süreç reaktif oksijen radikallerindeki artışla indüklenir ve antioksidanlar tarafından inhibe edilir. Bunun tersine mayoz bölünmenin ilerlemesi ise antioksidanlar tarafından desteklenir (Behrman ve ark., 2001).

Reaktif oksijen radikallerinin seviyesindeki orta dereceli artış normal fizyolojik fonksiyonlara izin verip hücre büyümesi ve çoğalmasını uyarırken, bu reaktif metabolitlerin aşırı yüksek seviyeleri ise hücresel hasara sebebiyet

vermektedir. Antioksidan savunma sistemi, reaktif oksijen radikallerinin konsantrasyonunu dengelemelidir.

Vücutta, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. Enzimatik antioksidanlar arasında Super oksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon oksidaz bulunurken, enzimatik olmayanlar ise C vitamini, taurin, hipotaurin, E vitamini, selenyum, beta-karoten ve karoten gibi sentetik antioksidanlardır. Oksidatif stres, reaktif oksijen radikalleri ile antioksidan mekanizmalar arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkar ve güncel çalışmalara göre hem erkek hem de kadın infertilitesinde rolü olduğu düşünülmektedir.

Spontan düşükler, tekrarlayan gebelik kayıpları, preeklampsi gibi gebelik komplikasyonlarI da oksidatif strese bağlı olarak gelişebilmektedir (Şekil 4.) (Agarwal ve ark., 2012).



Şekil 4. Oksidatif stres ve infertilite (Agarwal ve ark., 2012).

(file:///C:/Users/de/Downloads/1477-7827-10-49.pdf)

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, oksidatif strese maruz kalan oositlerde, fertilizasyon oranının azaldığı gösterilmiştir (Takahashi ve ark., 2003).

Oksidatif stres, oositlerde apoptoz başlangıcını hızlandırmaktadır. 2013 yılında fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, in vitro kültür ortamına eklenen, güçlü bir antioksidan olan melatoninin, oosit apoptozunu geciktirdiği ve embriyo kalitesini artırdığı gösterilmiştir (Lord ve ark., 2013).

IVF tedavisi gören kadınlar arasında yapılan bir başka çalışmada, Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) hasarının değerlendirilmesinde yararlı bir belirteç olarak bilinen 8-hidroksi-2′-deoksiguanozin (8-OHdG) konsantrasyonunun, yüksek oranda (> 30%) dejeneratif oosit içeren foliküler sıvıda önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca oksidatif stres ile zayıf oosit kalitesi arasında ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Tamura ve ark., 2008).

2022 yılında yapılan bir vaka kontrol çalışmasında, serumda ve folikül sıvısında ölçülen yüksek oksidan seviyelerinin, elde edilen embriyo kalitesi üzerinde negatif etkileri olduğu gösterilirken, implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranı üzerinde ise anlamlı bir değişiklik saptanamadı (Şentürk ve ark., 2022).

Güncel çalışmalara bakıldığında vücutta oksidan seviyesinin düşmesinin ve antioksidan seviyesindeki artışın, oosit ve embriyo kalitelerini artırarak IVF siklus başarılarını artırabileceği düşünülmektedir.

Doğru beslenmenin oksidatif stres parametrelerine ve IVF sonuçlarına etkisi

Günümüzde infertilitenin dünya çapında giderek daha yaygın bir sorun haline gelmesi, IVF tedavilerinin artması, bu tedavilerin yüksek maliyetli olması gibi sebepler, IVF sürecinde yapılabilecek beslenme değişiklikleriyle siklus başarılarına etki edilip edilemeyeceğinin daha çok araştırılmasına neden olmuştur. Makro ve mikro besinlerin siklus başarılarına olası etkilerine baktığımızda:

Folatın lipit peroksidasyonunu inhibe ederek serbest oksijen radikalleri seviyelerini düşürdüğü, oosit kalitesi ve olgunlaşmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Ebisch ve ark., 2007).

Çinkonun, proteinlerdeki sülfidril gruplarını bağladığı ayrıca proteinlerde ve DNA'da demir ve bakır için bağlanma bölgelerini işgal ederek oksidasyona karşı koyduğu düşünülmektedir (Bray ve ark., 1990).

E vitamininin, lipit peroksil radikallerini ortadan kaldırdığı ve C vitamini, karoten, melatonin ve selenyum gibi diğer antioksidan besinlerle birlikte hücre zarı fosfolipitlerinden lipit hidroperoksitlerin oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Pham-Huy ve ark., 2008).

Yine diğer bir çalışmada, oral vitamin E ve melatonin suplementasyonu yapılarak folikül sıvısı oksidatif stres parametrelerinde düşüş olduğu gösterilmiştir. (Lord ve ark., 2013).

2022 yılında, IVF tedavisi gören polikistik over sendromlu hastalarla yapılan bir çalışmada, vitamin D supplementasyonu yapılan grupta, kontrol grubuna kıyasla folikül sıvısında antioksidan seviyeleri yükselirken, oksidan seviyelerin düştüğü belirtilmiştir. Ayrıca serum vitamin D seviyesi ile folikül sıvısı antioksidan seviyesi, M2 oosit sayısı ve klinik gebelik oranları arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir. 400IU/gün ve 600 IU/gün vitamin D takviyesi alan gruplar kıyaslandığında ise, gruplar arasında folikül sıvısı oksidan ve antioksidan seviyeleri açısından fark olmadığı tespit edilmiştir (Ağar ve ark., 2022).

Oral L-Karnitin supplementasyonunun (250 mg/gün), polikistik over sendromlu kadınlarda plazma total antioksidan kapasite (TAC) 'sinde artışa neden olurken, malondialdehit (MDA)/TAC oranında ise düşüş sağlayarak oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Jamilian ve ark., 2017).

Yağdan zengin beslenmenin ise oosit çevresinde oksidatif stresi indükleyebileceği ve bu mekanizma üzerinden embriyonik gelişimi olumsuz yönde etkileyebileceği ortaya konulmuştur (Kazemi ve ark., 2013).

2020 yılında yapılan bir çalışmada, serumda yüksek trigliserit, LDL ve total kolesterol seviyelerinin düşük embriyo kalitesiyle ilişkili olduğu gösterilirken, serum HDL seviyeleri yüksek olan olgularda ise embriyo kalitelerinin daha iyi olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark., 2020).

Sonuç olarak;

Yapılmış çalışmalar incelendiğinde, doğru beslenmenin, özellikle oksidan-antioksidan sistemler arasındaki dengeyi düzenleyerek, bu mekanizma üzerinden IVF sonuçlarına pozitif etkisinin olabileceği görülmektedir. Ayrıca, kişiselleştirilmiş beslenmenin oosit ve embriyo kalitesini artırabileceği kanaatini taşımaktayız.

KAYNAKÇA

Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B.J. et al. The Effects of Oxidative Stress on Female Reproduction: a review. Reprod Biol Endocrinol (2012) 10, 49.

Ağar, M., & Önal, M. (2022). Vitamin D Supplementation İmproves Follicle Maturation By Regulating Oxidant/Antioxidant Balance İn Women With PCOS. Gynecol Reprod Health. 2022; 6 (2): 1-4.

Alabduladhem TO, Bordoni B. Physiology, Krebs Cycle. 2021 Nov 21. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–.

Awadalla S, Friedman C, Schmidt G. In vitro fertilization and embryo transfer as a treatment for male factor infertlity. Vol. 26, International Journal of Gynecology & Obstetrics. 2004. 329–329 p.

Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S: Oxidative Stress and the Ovary. J Soc Gynecol Investig. 2001, 8: S40-S42.

Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. Free Radic Biol Med. 1990;8:281–91.

Burdge GC, Calder PC. Introduction to fatty acids and lipids. World Rev Nutr Diet. 2015;112:1-16.

Cummings JH, Stephen AM. Carbohydrate terminology and classification. Eur J Clin Nutr. 2007 Dec;61 Suppl 1:S5-18

Dashty M. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. Clin Biochem. 2013 Oct;46(15):1339-52.

Ebisch IMW, Thomas CMG, Peters WHM, Braat DD, Steegers-Theunissen RP. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. Hum Reprod Update. 2007;13:163–74.

Fortune JE: Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. Biol Reprod. 1994, 50: 225-232.

Fritz, Marc A. LS. Speroff, Fritz MA.Clinical gynecologic endocrinology and infertility. Lippincott Williams and Wilkins 7th Philadelphia. 2011: 1137- 1138

Guenther PM, Jensen HH. Estimating energy contributed by fiber using a general factor of 2 vs 4 kcal/g. J Am Diet Assoc. 2000 Aug;100(8):944-6

Henriksson, P (Danderyd University Hospital, Stockholm, Sweden). Cardiovascular problems associated with IVF therapy (Review). J Intern Med 2021; 289: 2– 11.

Hou Y, Wu Z, Dai Z, Wang G, Wu G. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. J Anim Sci Biotechnol. 2017;8:24

Hussein, Mustafa & Al-Khafaji, Qays & Jawad, Ali & Selman, Mohammad & Sraibet, Muayad. (2017). Evaluation of Lipids in Serum and Follicular Fluid on Oocyte

and Human Embryo Quality after ICSI. Iraqi Journal of Embryos and Infertility Researches.

Jamilian H. ,Jamilian M., Samimi M., Ebrahimi F.,Rahimi M.,Bahmani F., Aghababayan S.,Kouhi M. , Shahabbaspour S. & Asemi Z. (2017) Oral carnitine supplementation influences mental health parameters and biomarkers of oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, Gynecological Endocrinology, 33:6, 442-447

Kazemi A, Ramezanzadeh F, Nasr-Esfahani MH, Saboor Yaraghi AA, Ahmadi M. Does dietary fat intake influence oocyte competence and embryo quality by inducing oxidative stress in follicular fluid? Iran J Reprod Med. 2013 Dec;11(12):1005-12.

Morris AL, Mohiuddin SS. Biochemistry, Nutrients. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Sci. 2008;4:89–96.

Revelli, A., Piane, L.D., Casano, S. et al. Follicular Fluid Content and Oocyte Quality: From Single Biochemical Markers to Metabolomics. Reprod Biol Endocrinol 7, 40 (2009).

Şentürk R.,Tola E.N., Bozkurt M. & Doğuç D. (2022) The role of oxidant status on the etiopathogenesis of unexplained infertility and intracytoplasmic sperm injection – embryo transfer success: a case-control study, Journal of Obstetrics and Gynaecology, 42:5, 1312-1318

Tabong PT, Adongo PB. Infertility and childlessness: a qualitative study of the experiences of infertile couples in North Ghana. BMC Pregnancy Childbirth. 2013;13:72–72.

Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, KurachiH. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. Mol Reprod Dev2003; 66:143–152.

Tamura H, Takasaki A, Miwa I, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. J Pineal Res. 2008;44:280–287

Tessa Lord, Brett Nixon, Keith T. Jones, R. John Aitken, Melatonin Prevents Postovulatory Oocyte Aging in the Mouse and Extends the Window for Optimal Fertilization In Vitro, Biology of Reproduction, Volume 88, Issue 3, 1 March 2013, 67, 1–9.

Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M., Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, The National Academies. Dietary reference intakes for energy,

carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. J Am Diet Assoc. 2002 Nov;102(11):1621-30

Wang S, Wang J, Jiang Y, Jiang W. Association between blood lipid level and embryo quality during in vitro fertilization. Medicine (Baltimore). 2020 Mar;99(13).

Webster RP, Roberts VH, Myatt L: Protein Nitration in Placenta - Functional Significance. Placenta. 2008, 29: 985-994.

Yang X, Wu LL, Chura LR, Liang X, Lane M, Norman RJ, Robker RL. Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. Fertility and Sterility. 2012 Jun;97(6):1438-43.

BÖLÜM 14

DİYABETİK YARA İYİLEŞMESİNDE NİTRİK OKSİT SALAN BİYOMATERYALLER

Doç. Dr. E. Gülçeri GÜLEÇ PEKER[1]

[1] Giresun Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Giresun Türkiye
ORCID ID: 0000-0001-7244-0281 gulceri.peker@giresun.edu.tr

GİRİŞ

Diyabetes mellitus, hiperglisemi ile karakterize kronik bir hastalıktır. Hastalığın insidansı hızla artmakta olup, dünya çapında 463 milyondan fazla hasta bulunmaktadır ve bu sayı 2045 yılına kadar 700 milyona ulaşacaktır (IDF Diabetes Atlas, 2019). Diyabetik ayak ülserleri ve iyileşmeyen kronik yaralar da dahil olmak üzere bu hastalıkla ilişkili uzun vadeli komplikasyonlar, artan morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. Diyabetik hastalarda; yara alanında gerçekleşen mikrobiyal kolonizasyon, büyüme faktörlerinin eksikliği veya yetersiz salgılanmasıyla anjiyojenik aktivitenin azalması ya da gerçekleşememesi, oksijen kaynağı eksikliği ve nitrik oksit (NO) salınımının azalması gibi çeşitli faktörler iyileşme süreçlerinin başarısızlığına katkıda bulunur.

Diyabetik hastalarda yaraların iyileşme sürecinin azalmasının bir diğer önemli nedeni, hipergliseminin genellikle endotelyal nitrik oksit sentazın (eNOS) işlevsel aktivitesini bozması ve böylece NO miktarının azalmasına ve NO arzının azalmasına yol açarak anjiyojenik süreci etkilemesi nedeniyle bozulmuş anjiyogenez ve vaskülogenez ile bağlantılıdır. Ayrıca, bu faktörler uzun süreli inflamasyon sürecine bağlı olarak periferik yara dokusunda stromal hücre kaynaklı faktör-1alfa (SDF-1α) ekspresyonunu azaltarak doku onarımının gecikmesinde önemli bir rol oynamakta ve yaraların kapanmasının durmasına neden olmaktadır. Buna ek olarak, diyabetes

Yazıların son kontrolü başlık v.b. bilgiler ile ilgili kontroller mutlaka bize gönderilmeden önce yapılmalıdır. Yayın sonrası kültür bakanlığına yayın bildirildikten sonra ekleme veya çıkarma yapılamamaktadır.

Önemli: Bu şablona kopyala yapıştır yaptığınızda bu şablonun boyutunun değişip değişmediğini kontrol etmeniz önerilir. mellitus sırasında makrofajların pro-inflamatuar fenotipi pro-reparatif bir fenotipe dönüşür (Martinengo ve ark., 2019). Bu değişiklikler diyabetik yaraların inflamatuar profilini artırır ve böylece anjiyogenezle ilgili mRNA'nın ekspresyonunda bir azalmaya ve sonuç olarak anjiyojenik ve yara iyileşme sürecine katılan büyüme faktörlerinin, özellikle de vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) çok düşük miktarda salınmasına neden olur (Ahmed ve ark., 2022).

Normalde, akut yaraların iyileşmesi, yaralanma olayından itibaren otuz gün içinde tam olarak kapanırken, kronik yaralar durgun kalır ve süresiz olarak iyileşemez (Ahmed ve ark., 2022). Büyüme faktörleri ve hormonların

salgılanmasındaki artışın, yaralanan bölgedeki kayıp dokuyu yerine koymak için hücrelerin çoğalmasını büyük ölçüde artırdığı aşikârdır. Ancak bu faaliyetlere rağmen, akut yaralar kronik yaralardan daha hızlı iyileştiğinden, yaraların iyileşme süresi yaranın karmaşıklığına bağlıdır. Yara iyileşme süreci ayrıca yaralanmanın boyutuna ve derinliğine de bağlıdır. Epidermis veya dermiste 1 cm'den daha küçük bir alanda oluşan bir yara daha hızlı iyileşir çünkü cilt bu hasarlı dokuyu değiştirmek için yeterli potansiyele sahiptir. Bununla birlikte, derinin dermis ve hipodermis bölgesindeki derin bir yaralanma, derinin iyileşmesinin gecikmesine neden olur ve rejenerasyon sürecini hızlandırmak için bir deri parçasının değiştirilmesini gerektirir (Rippa ve ark., 2019).

Günümüzde, tedavi stratejileri çoğunlukla diyabetik hastalarda mikrovasküler patoloji üzerinde tam kontrol sağlayamayan yüzeysel ülserleri iyileştirmeye odaklanmıştır. Yaygın yaklaşımlar genellikle antibiyotik kullanımı, kompresyon, debridman, basınç yönetimi ve özel pansumanların uygulanmasına dayanmaktadır. Kronik yaraları tedavi etmek için daha yeni yaklaşımlar deri ikameleri, vakum destekli kapatma ve elektrik stimülasyonu kullanmayı içerir (Attinger, ve ark., 2006). Rekombinant büyüme faktörleri, kök hücreler ve bunların kombinasyonlarından oluşan biyomühendislik ürünü yapay deri ikameleri şeklindeki çeşitli yara kaplama matrisleri, diyabetik yaraların tedavisinde büyük bir potansiyele sahiptir. Ancak yüksek maliyet, uygun olmayan bozulma oranları, bağışıklık sisteminin reddetmesi ve kan damarlarının yavaş veya zayıf gelişimi, bu biyomühendislik yapılarının etkili kullanımını engelleyen bazı önemli sorunlardır. Bu yapılar, yaraların daha hızlı ve çabuk iyileşmesi için gereken uygun biyokimyasal ve mekanik özelliklerden de yoksun olabilir. Bu yaklaşımların yanı sıra, kök hücrelerin kullanımını içeren hücre temelli tedaviler de kök hücrelerin herhangi bir hücre tipine dönüşme potansiyeli nedeniyle büyük popülerlik kazanmıştır (Moradi ve ark., 2019).

NO'in önemi, çeşitli biyomedikal alanlarda geniş ölçekli etkinlik için uzun süredir kabul edilmektedir. NO-donörleri, fototermal şoka maruz bırakılmaları gibi bir uyaran üzerine NO salabilir. Öte yandan, NO salınımı otokrin ve parakrin yollarla çeşitli hücre türlerinin içinden veya bu hücrelerden yönetilir. NO'in kimyasal yönleri söz konusu olduğunda, çok sayıda biyolojik işlevi yerine getirebilen bir serbest radikaldir. Bununla birlikte, bu önemli

molekülün dezavantajlarından biri çok kısa ömürlü olmasıdır (ortaya çıkışından ~ 100 ms sonra). NO'in çok sınırlı ömrünün bu dezavantajı, NO salan donörlerin çeşitli yara kaplama matrislerine enkapsüle edilmesiyle çözülmüştür. Endojen NO-donörlerinin verilmesi, antimikrobiyal potansiyel, vazodilatasyon ve pro- veya anti-inflamatuar aktivite gibi çoklu faydaları nedeniyle yara iyileşmesini iyileştirebilir (Bahadoran ve ark., 2020). Ayrıca, sıçanlarda S-nitrosoglutatyon (GSNO) gibi NO-donörünün sistemik olarak uygulanması, matriks metalloproteinaz yolaklarını bozmadan yara bölgelerindeki kolajen birikimini iyileştirmektedir (Achuth ve ark., 2005). Dolayısıyla, NO-donörleri ile emprenye edilmiş yara iyileştirici matrislerin geliştirilmesini içeren stratejilerin benimsenmesi, bozulmuş diyabetik yaraların daha hızlı iyileşmesi için alternatif bir seçenek olabilir.

NİTRİK OKSİT (NO) VE BİYOLOJİK SİSTEMLER

NO, hücrelerde çeşitli fizyolojik işlevlerde yer alan çok önemli bir sinyal molekülüdür. NO'nun biyomedikal önemi ile ilgili olarak ilk kanıt 1846 yılında Ascanio Sobrero tarafından rapor edilmiştir. Nitrogliserinin kısa bir süre için dil üzerine yerleştirilmesinin birkaç saat sürebilen şiddetli bir baş ağrısı oluşturduğunu göstermiştir. Daha sonra 1859 yılında İngiliz kimyager Frederick Guthrie, amil nitritin (bir NO-donörü) solunmasının boynun arteriyel zonklamasına yol açtığını ve kalp atış hızını azalttığını kanıtlamıştır. Bu keşif, amil nitritin kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için biyomedikal alanda uygulanmasına yol açar, çünkü bu kimyasal madde kan damarlarını genişletmeye ve böylece kan basıncını düşürmeye yardımcı olur. 1970 yılında Ferid Murad ve meslektaşları nitrogliserinin vazodilatasyon potansiyelinde rol oynayan mekanizmayı ve nitrogliserinin guanilat siklaz (GC) enzimini nasıl etkilediğini anlamak için çalışmaya başladılar (Marsh ve Marsh, 2000). Murad ve meslektaşları, nitrit içeren bileşiklerin guanozin-5'-trifosfattan (GTP) siklik guanozin monofosfat (cGMP) sentezini artırarak GC'yi uyardığını ve bunun da daha sonra vazodilatasyona neden olduğunu bulmuşlardır (Arnold ve ark., 1977). Daha sonra Murad, NO ajanına maruz kaldığında GC aktivitesinin katlanarak arttığını gözlemlemiştir. Bu gözlemden Murad, nitrit içeren bileşikler tarafından üretilen NO'nun GC'yi uyardığı ve bunun da daha sonra vazodilatasyon olaylarına ve kan basıncının düşmesine neden olduğu sonucuna varmıştır. Robert Furchgott ve meslektaşları asetilkolinin kan damarı

gevşemesi üzerindeki etkilerini test etmiş ve sadece düz kas hücrelerinden oluşan damarların vazodilatasyon aktivitesi gösterememesi nedeniyle vazodilatasyon aktivitesi için endotel hücrelerinin varlığının gerekli olduğunu bulmuşlardır (Furchgott ve Zawadzki, 1980). Daha sonra Furchgott ve meslektaşları, endotel hücrelerinin vazodilatasyon etkisinin üretilmesinde esas olarak rol oynayan endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ürettiği sonucuna varmışlardır (Cherry ve ark., 1982). 1986 yılında Louis Ignarro, Kaliforniya Üniversitesi'nde çalışırken hem NO hem de EDRF'nin vazodilatasyondaki işlevinin aynı olduğunu bulmuştur (Ignarro ve ark., 1987a). NO'nun biyolojik sistemlerdeki rolü hakkında yapılan bir dizi çalışmadan sonra, NO'nun memeli dokularında vazodilatasyon için endojen bir sinyal molekülü olduğu sonucuna varılmıştır. NO'nun hücrelerde bir sinyal molekülü olduğunun keşfi Tıp ve Fizyoloji alanında büyük bir gelişme olarak kabul edilir ve bu keşifle Murad Furchgott ve Ignarro 1998 yılında Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür (Ignarro ve ark., 1987b).

İnsan vücudunda nitrik oksit oluşumu

NO sentezi, nitrik oksit sentazlar (NOS) olarak bilinen üç enzim seti tarafından endojen olarak gerçekleştirilir. L-arginin, NADPH ve oksijen varlığında NOS tarafından NO, sitrülin ve NADP+ üretilerek katabolize edilir. NOS enzimleri nöronal NOS (nNOS), eNOS veya indüklenebilir NOS (iNOS) olabilir. Bu enzimler arasında nöronal nitrik oksit sentaz ve eNOS yapısal olarak ifade edilirken, iNOS enfeksiyonlar veya bağışıklık tepkileri sırasında indüktif olarak ifade edilir. Daha kapsamlı çalışmalarda iNOS'un keratinositler, akciğer, karaciğer, böbrek, kolon ve nöronlardan da konstitütif olarak üretildiğini ortaya koymuştur, Stres koşullarında, özellikle hipertermi, egzersiz ve kayma stresi sırasında eNOS salınımı artar. Stres durumlarında miyokardiyum, miyometriyum, iskelet kası, vasküler düz kas hücreleri ve makula densada nNOS ekspresyonu artar (Alderton ve ark., 2001). NOS üretiminde çeşitli hücre tiplerinin rol aldığı ve dolayısıyla bu hücrelere uyaran uygulanmasıyla NO üretilebileceği sonucuna varılabilir. Daha sonraki çalışmalar iNOS, eNOS ve nNOS'un genellikle mitokondride bulunduğunu göstermiştir, bu nedenle mitokondriyal NOS (mNOS) olarak adlandırılmışlardır (Michel ve Feron, 1997). Daha ileri çalışmalar, nNOS geninin posttranslasyonel modifikasyonunun mitokondriyal nitrik oksit sentaz

ürettiğini ortaya koymuştur Kimyasal olarak, dimerik formdaki heme proteini tüm NOS izoformlarında mevcuttur ve her bir monomerik birim 126-160 kDa moleküler kütleye sahiptir. Tüm izoformlar farklı genler tarafından ayrı ayrı üretilir ve bu izoformların amino asit dizileri %51-57 homoloji gösterir. Ek olarak, NOS izoformları farklı durumlarda üretilir. Örneğin iNOS, nNOS ve eNOS'a kıyasla daha yüksek miktarda NO üretir ve daha uzun süre NO üretebilir. Buna ek olarak, NOS belirli yapılara farklı şekilde kalıplanabilir ve belirli bir işlevi yerine getirmek için belirli yerlerde lokalize olabilir. NOS'un temel özelliklerinden biri, işlevlerini yakınlık içinde gerçekleştirmeleri ve böylece aşağı akış hedeflerini etkilemeleridir. Bu nedenle, NOS oluşumunun substrat mevcudiyetine ve NO'nun spesifik proteinleri hedefleyerek işlevlerini yerine getirmesine izin veren hücre altı lokalizasyonlarına bağlı olarak transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerde düzenlendiğini söylenebilir (Villanueva ve Giulivi, 2010).

Nitrik oksitin biyolojik özellikleri

NO, kardiyovasküler düzenleme, nörotransmisyon, antibakteriyel aktiviteler ve yara iyileşme potansiyeli dahil olmak üzere vücuttaki çeşitli süreçlerde önemli bir rol oynar. NO, makrofajlar gibi inflamatuar hücreler üzerinde etki ederek yara iyileşme aktivitesini teşvik eder. NO'in yara iyileşmesini destekleyici rolü bir dizi deneysel raporla kanıtlanmıştır. Bu doğrultuda Albina ve arkadaşları, yara iyileştirme faaliyeti sırasında L-arginin metabolizmasının önemli ölçüde arttığını ve bu bileşiğin NO ve sitrüline dönüştüğünü tespit etmiştir (Albina ve ark., 1988). Bir başka çalışmada Smith ve arkadaşları, yaralanan sıçanların idrarındaki nitrat miktarının katlanarak arttığını gözlemlemişlerdir Witte ve Barbul, 2002). NO'daki bu artışın yara iyileşme süreci sırasında NO üretimi ile ilişkili olduğunu öngörmüşlerdir. Bulgrin ve arkadaşları sıçanların düşük miktarda arginin ile beslenmesinin nitrat üretiminin azalmasına ve sonuç olarak düşük miktarda NO oluşumuna yol açtığı gözlemlenmiştir. Çalışmalarında sıçanları L-argininsiz veya %3 L-argininle zenginleştirilmiş diyetle beslemiş ve tam kat deri yarası oluşturmuşlardır. Başlangıçta, nitrat oluşum miktarında sürekli bir artış olmuş, ancak bir süre sonra, endojen arginin bu bileşiğin daha yüksek bir seviyesini korumak için uzun süre yeterli olmamış ve nitrat seviyesi hızlı bir şekilde başlangıç değerine dönmeye başlamıştır Bulgrin ve ark., 1993). Bununla

birlikte, sıçanların daha yüksek konsantrasyonda argininle zenginleştirilmiş diyetle (%3) beslenmesi, yara iyileşme aktivitesi boyunca daha yüksek nitrat seviyelerinin korunmasıyla sonuçlanmıştır. Bu da NO miktarındaki artışın yaralarla ilişkili olduğu gerçeğini desteklemiştir. Diyabetik sıçanların L-argininle znginleştirilmiş diyetle beslenmesinin sadece yara iyileşme aktivitesini hızlandırmakla kalmayıp aynı zamanda yara sıvılarındaki nitrat/nitrit seviyelerinin üretimini de arttırdığını bildirilmiştir (Shi ve ark., 2003). NO-donörleri de NO üreterek yara iyileşme süreci üzerinde aynı etkileri göstermektedir. Araştırmacılar ayrıca deri rejenerasyonunda yer alan kesin mekanizmayı keşfetmek için yara iyileşme sürecinde NO üretiminde iNOS yolunun rolü üzerinde çalışmışlardır. Reicher ve arkadaşları, iNOS yolunun ifadesinin bir yaralanmadan sonraki ilk 72 saatte muazzam bir şekilde arttığını ve daha sonra ekpresyonun yavaşça azaldığını bulmuşlardır (Reichner ve ark. 1999). Yara iyileşme süreci sırasında iNOS yolunun inhibe edilmesi, kolajen sentezinde, epitelizasyonda ve NO üretiminde kademeli bir düşüşle sonuçlanmıştır. Yara iyileşme aktivitesinde iNOS yolunun rolü, Shi ve arkadaşları tarafından iNOS nakavt edilmiş farelerde ilave arginin sağlanarak daha da doğrulanmış ve iNOS nakavt edilmiş farelerde bu ilave argininin yara iyileşme süreci üzerinde herhangi bir etki göstermediği ortaya çıkmıştır. Böylece, iNOS yolağının, yara iyileşme süreci için bir sinyal molekülü görevi gören NO üretmek üzere arginin metabolizmasına yardımcı olduğu sonucuna varılmıştır (Shi ve ark., 2000).

Nitrik oksitin terapötik uygulamaları

Vücutta endojen olarak üretilen NO çeşitli işlevleri yerine getirir ve çeşitli rahatsızlıklarda kullanılabilir. Burada, aynı süreç/hastalık üzerinde NO konsantrasyonlarının değiştirilmesinin farklı etkiler yaratabileceğini ve belirli bir hastalığın tedavisi için optimum miktarda NO kullanılmasının çok önemli olduğunu belirtmek ilginçtir. Dolayısıyla, biyolojik süreçler ile hücre içinde gerçekleşen biyolojik bir faaliyetteki NO konsantrasyonu arasında belirli bir ilişki vardır. Örneğin, 1-30 nM civarında bir NO konsantrasyonu daha iyi vazodilatasyona ve gelişmiş anjiyojenik aktiviteye yol açar. NO konsantrasyonunun 100 nM'ye kadar artırılması, hücre apoptozunu azaltarak koruyucu etkiler yaratırken (anti-inflamatuar ve yara iyileşmesi), 400 nM'nin üzerindeki konsantrasyonlar hücresel apoptozu indükler (Coneski ve

Schoenfisch, 2012). Ayrıca, yüksek NO konsantrasyonları normal hücreler için çoğunlukla öldürücü olduğundan ve hücrelere zarar vererek dokuların ölümüne neden olabileceğinden, her hücre NO konsantrasyonuna karşı farklı bir doz yanıtı gösterir. Bununla birlikte, daha yüksek NO konsantrasyonları kanser kemoterapisinde ve antibakteriyel enfeksiyonların önlenmesinde son derece faydalı olmaktadır (Barbul ve ark., 1990). NO'nun dokulara maruziyetinin artırılması, terapötik etkinliğini daha da geliştirir. Klinik uygulamalar için iskelelerin geliştirilmesi, hayvanın vücudunda endojen olarak üretilen NO tarafından doğal olarak gösterildiği gibi gerekli etkileri elde etmek için NO salınımı üzerinde daha iyi kontrol gerektirir. Trombojenik olmayan endotel yüzeyinden salınan NO 0,05 ile $0,4 \times 10^{-10}$ mol cm^{-2} dk^{-1} arasında değişmektedir ve bu nedenle NO salan iskeleler hemouyumluluk elde etmek için bu aralığa yakın NO üretmelidir (Vaughn ve ark., 1998). Bazen, NO'nun sistemik kullanımı ciddi kanamaya neden olabileceğinden, bu molekülün sistemik etkilerinden kaçınmak için antitrombotik uygulamalar için NO'nun lokalize olarak verilmesi gerekir. NO salan bir hidrojelin mezenkimal kök hücre tedavisinin terapötik etkilerini iyileştirmek için potansiyel olarak kullanılabileceği de belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2020). Ayrıca, sisplatin ve NO salan poliprodrug nanopartiküllerin dirençli kanser hücreleriyle mücadele etmek için kullanılabileceği gösterilmiştir (Chu ve ark., 2020). NO gazının terapötik uygulaması büyük ölçüde bu molekülün normal fizyolojik koşullardaki yüksek reaktivitesi ile sınırlıdır. NO tüketimi vücuttaki oksijen ve hemoglobin miktarından büyük ölçüde etkilenir. NO tüketim oranı oksijen ve hemoglobin varlığında çok daha yüksektir ve NO konsantrasyonunun karesine eşittir (Hakim ve ark., 1996). Damar dışı dokularda, NO'nun yarı ömrü 0,0λ ila > 2 s aralığında kalır ve esas olarak oksijen konsantrasyonu ile ilişkilidir, tam kanda ise eritrositlerin varlığında NO'nun yarı ömrü $1,8 \times 10^{-3}$ s'dir (Thomas ve ark., 2001). NO'nun hem molekülü veya oksihemoglobin demiri ile yüksek afinitesi ve reaktivitesi nedeniyle NO tüketimi tam kanda muazzam ölçüde artar. Tüm bu sınırlamalar nedeniyle, NO terapötik uygulamaları için donör olarak S-nitrosotiyol (RSNO) materyallerinin kullanılması şiddetle tavsiye edilmektedir.

Nitrik oksitin yara iyileştirici özellikleri

NO'nun yaygın olarak tanımlanan biyolojik işlevlerinden bazıları trombosit oluşumunu inhibe etmesi, anti-inflamatuar aktiviteler gerçekleştirmesinin yanı sıra monositleri inaktive etmesidir. NO yara ile ilişkili faaliyetlerde çok önemli bir rol oynamasına rağmen, doku mühendisliği uygulamalarında bu materyalin tanınırlığı hala çok azdır. Endojen olarak üretilen NO birçok işlevi yerine getirir ancak bunun en önemli işlevlerinden biri vazodilatör olmasıdır. Endotel hücrelerinin çoğalmasını sağlayarak ve hücre proliferasyonunu teşvik ederek anjiyojenik aktiviteyi destekler. Antimikrobiyal bir ajan olarak hareket ederek yara iyileşme aktivitesini muazzam ölçüde artırır ve hücrelerin yaralı bölgeye göçünü teşvik eder (Kumar ve ark., 2017). NO sürekli olarak endojen olarak üretilir ve bu da yara iyileşme sürecine doğal olarak yardımcı olur, ancak hidrofobik ve hidrofobik NO-donörlerinin eksojen olarak uygulanması, yara kapanma sürecini büyük ölçüde hızlandırabilir (Akhtar ve ark., 2019). Ancak bazı sınırlamalar NO-donörlerinin geniş ölçekli uygulanabilirliğini kısıtlamıştır ve bunlardan biri de NO'nun donör moleküllerinden daha hızlı bozunması ve patlayarak salınmasıdır. Patlama salınımını ve NO'nun yaşam süresini önlemek için, bu sinyal molekülü hidrojel veya nanofiber matlar gibi biyomalzeme iskelelerine dahil edilir. NO-donörlerinin bu şekilde kapsüllenmesi, yara bölgesine sürekli NO tedarik edilmesini sağlar ve böylece membran hasarı ve deoksiribonükleik asit (DNA) deaminasyonu yoluyla hücre bağlanmasını engelleyerek bakterilerin büyümesini önler (Mihu ve ark., 2010). Ayrıca, NO'nun yaralı bölge üzerinde kullanılması kanamayı durdurarak homeostazı tetikler, inflamasyonu azaltır ve yaranın iyileşme sürecini hızlandırır (Kim ve ark., 2011).

YARA İYİLEŞMESİ İÇİN BİYOMATERYAL MATRİSLER

Sağlık hizmetlerinde kullanılan yara iyileştirici matrisler normalde biyolojik olarak parçalanabilen doğal veya sentetik malzemelerden hazırlanmaktadır. Doğal malzemelerden oluşan ve düşük maliyetli, hızlı iyileşme oranlarına sahip ve kullanıcılar için çevre dostu olan matrisler daha geniş kabul görmektedir. Sağlık sektöründe, yüksek şişme özellikleri gösteren (ekstra eksüdaları emebilen) ve yüksek gözenekliliğe sahip (gazların, özellikle de oksijenin daha iyi difüzyonuna izin veren) yara iyileştirici matrisler tercih edilmektedir. Ayrıca, antibakteriyel ve anjiyojenik ajanlarla emprenye edilmiş

yara iyileştirici örtüler de bakteriyel çoğalmayı kolayca engelleyebildikleri ve anjiyojenik aktiviteyi teşvik edebildikleri için oldukça faydalı kabul edilmektedir (Mihai ve ark., 2019). Nemi emebilen ve yara bölgesini nemli tutabilen pansumanların yaraları daha hızlı iyileştirdiği görülmektedir. Bunun aksine, buharlaşma yoluyla su kaybını durduramayan yara iyileştirici sargılar, hücrelere besin tedarikinin azalmasına ve dolayısıyla yara iyileşmesinin azalmasına neden olur. Çeşitli yara iyileştirici biyomateryal sargılar arasında hidrojeller, yara yüzeyini nemli tutmak için kullanılan boyutlarına kıyasla büyük miktarda su emme kabiliyetine sahip hidrofilik matris özellikleri gösterir (Caló ve Khutoryanskiy, 2015). Biyomateryallerden oluşan hidrojellerin bir diğer faydalı yönü de yaralardaki nekrotik dokuların debridmanını kolaylaştırmalarıdır. Bu faydanın yanı sıra, hidrojel iskelelerin esnek ve kauçuksu yapıları ile yaralardan kolayca çıkarılabilmeleri gibi başka avantajları da vardır (Kamoun ve ark., 2017). Hidrojellerin benzersiz özelliklerinden biri, yüzeylerinde gazların, suyun ve besin maddelerinin düzgün akışına izin veren ve böylece bu malzemeleri içlerinde yüklü hücrelere sağlayan çok sayıda gözenek bulunmasıdır. Bu besinler aynı zamanda hidrojel sargıların uygulandığı yara dokularına da geçer. PAA:F127/GSNO hidrojellerinden topikal NO salınımı eksüda emilimi ile tetiklenir ve kortikal dokuda TGF, IGF-1, SDF-1 ve IL-10 gen ekspresyonunun yanı sıra anjiyogenez ve kolajen lif organizasyonunun artmasına yol açar (Champeau ve ark., 2018). B-galaktosidaz katalizi, fizyolojik koşullar altında PCL/CS-NO sargısından NO salınımını kontrol eder. PCL/CS-NO biyomateryallerinden oluşan yara örtüsünün *in vivo* yara iyileşmesinde uygulanması, yeniden epitelizasyon ve granülasyon oluşumunu artırmanın yanı sıra epidermal-dermal bağlantı dahil olmak üzere rejenere dokuların organizasyonunu iyileştirerek yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırmıştır. Bu durum NO tarafından sağlanan pro-anjiyogenez, immünomodülasyon ve gelişmiş kolajen sentezine bağlanmıştır (Zhou ve ark., 2017). Başka bir çalışmada, PEI-PO-NONOate polimeri, bu formülasyonun yara iyileşmesi üzerindeki etkisini incelemek için farelerde tam kalınlıkta eksizyonel kutanöz yara modellerine uygulanmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, PEI-PO-NONOate polimeri, artan granülasyon dokusu gelişimi, kolajen birikimi ve anjiyogenez ile kutanöz yara iyileşmesini ve kapanmasını kolaylaştırmıştır (Zhang ve ark., 2019). NO salan polimerin, proanjiyojenik davranışlarını artırarak ekzozom aracılı proanjiyojenik

potansiyeli geliştirebileceği daha ileri çalışmalarla ortaya konmuştur. NO stimülasyonuna yanıt olarak insan plasentasından türetilen MSC'lerden (hP-MSC'ler) üretilen eksozomlar, insan umbilikal ven endotel hücrelerinin (HUVEC'ler) *in vitro* anjiyojenik etkilerini artırmaktadır. Bir fare arka bacak iskemi modelinde, NO stimülasyonu ile hP-MSC'lerden üretilen eksozomlar üstün anjiyojenik etkiler göstermiştir ve uzuv fonksiyonunu iyileştirmiştir. NO stimülasyonu ile hP-MSC'lerden üretilen eksozomlardaki gelişmiş VEGF ve miR-126 seviyeleri, daha ileri araştırmalara göre, bu eksozomların anjiyojenik süreçleri uyarma kapasitesinin artmasına katkıda bulunan yeni bir mekanizma olarak bulunmuştur. Eksojen NO telafisi umut verici bir tedavi yöntemi olmasına rağmen, stabil NO moleküllerinin yokluğu sıklıkla hayal kırıklığı yaratan klinik sonuçlara yol açmaktadır. Galaktoz tarafından inhibe edilen ve yalnızca glikozidaz varlığında gerçekleşen CS-NO polimerinin parçalanmasının kontrol edilmesi, isteğe bağlı NO salınımına izin verir. CS-NO polimerleri, yüksek stabiliteleri nedeniyle destekleyici membranlar veya enjekte edilebilir hidrojeller olarak da işlenebilir ve klinik vaatlerini kanıtlar. Trombositten zengin plazma (PRP) deneyinde, NO salan membranın trombosit yapışmasını engellediğini ve aktive parsiyel tromboplastin süresini (APTT) uzattığını gördük. *İn vitro* NO içeren membran üzerinde, insan umbilikal ven endotel hücre büyümesinin arttığını ancak vasküler düz kas hücre proliferasyonunun azalmıştır. Ayrıca, arka bacak iskemisi olan diyabetik farelerde, CS-NO solüsyonunun *in vivo* tedavisi anjiyogenezi büyük ölçüde artırmıştır (Du ve ark., 2017).

DİYABETİK YARA İYİLEŞMESİNDE NİTRİK OKSİT VE NİTRİK OKSİT YÜKLÜ YAMALAR

Yamalara yüklenen nitrik oksit salan ajanlar, anjiyojenik aktiviteyi, doku yeniden şekillenmesini ve rejenerasyonu artırarak yara kapanma sürecini hızlandırır.

Nitrik oksit ve diyabetik yara iyileşmesi

Diyabet sırasında, pankreas β hücreleri tarafından insülin salgılanması ve vücut hücrelerinin insüline verdiği yanıt önemli ölçüde azalır. Çalışmalar, insülinin salgılanması, serbest bırakılması ve sinyalizasyonunun özellikle NO seviyelerine bağlı olduğunu ve bu nedenle NO üretimindeki herhangi bir değişikliğin diyabet etiyolojisini etkileyebileceğini göstermektedir. Endojen

olarak L-arginin sentezi azaldığında ve NO'nun O2 ile etkileşimi arttığında yetersiz miktarda NO salınır. Diyabet sırasında plazmadaki L-arginin seviyesi büyük ölçüde düşer ve NO ile ilişkili yolların üretimi ve işleyişi azalır. Argininle zenginleştirilmiş gıda takviyelerinin alımının artırılması sadece kan plazmasındaki L-arginin miktarını artırmakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli sinyal yollarının etkinliğini de geliştirir. Seifter ve arkadaşları, hayvanların diyetine arginin takviyesinin, artan kolajen birikimi ve yara kırılma gücü ile değerlendirildiği üzere yara iyileşmesini iyileştirdiğini göstermiştir (Seifter ve ark., 1978). Ayrıca, Witte ve arkadaşları diyabetik hayvanlara bir NO-donörü olan molsidomin verilmesinin de yara kırılma gücünü önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Witte ve ark., 2002). 2014'te gerçekleştirilen çift kör bir klinik çalışmada, zayıf uzuv perfüzyonu ve/veya plazmada 40 g/l'den az albümin içeriği olan diyabetik hastalarda oral diyetle arginin takviyesi, kontrollere göre yaklaşık 1,7 kat daha fazla yara iyileşmesine neden olmuştur. Ancak bu çalışmada NO'nun yara özellikleri üzerindeki doğrudan etkileri belirsiz kalmıştır (Armstrong ve ark., 2014). Diyetle alınan arjinin dışında, yaralara doğrudan arjinin uygulanması da iyi sonuçlar vermiştir. Heffernan ve arkadaşları aynı topikal arginin uygulama prensibini kullanmış ve yara kapanma oranları üzerindeki etkisini bulmak için doku morfolojisini incelemişlerdir. Arginin takviyeli grupta keratinositler (daha düz, kübik morfolojiye sahip daha ince epidermise sahip) bulmuşlardır. Araştırmacılar, bu morfolojik değişikliklerin keratinositlerin çoğalmasını ve farklılaşmasını artırdığı ve bunun da arginin verilen gruptaki hızlandırılmış yara iyileşme oranlarını açıkladığı sonucuna varmışlardır (Heffernan ve ark., 2006). Reesi ve arkadaşları, kontrollü arginin salınımı için nanofibröz hidrokolloid bazlı yara örtüsü kullanarak muazzam sonuçlar elde etmiştir. Nanoliflerin yüksek en-boy oranına ve yara eksüdalarını emen ve cildin yenilenmesini, homeostazını ve hücre proliferasyonunu destekleyen 3 boyutlu bir yapıya sahip olduğu kanıtlanmıştır (Liu ve ark., 2018). Ayrıca, plazmadaki L-arginin miktarının artırılması da β-hücre kütlesini/işlevlerini artırmakta ve aşırı NO üretimi yoluyla insülin duyarlılığını geliştirmektedir. Bu da NO'nun enerji regülasyonunda, endotele bağlı gevşemede ve vasküler rahatsızlıkların azaltılmasında önemli bir rolü olduğuna dair yeterli kanıt sağlamaktadır. Daha yüksek L-arginin miktarları pankreastaki β-hücrelerinin rejenerasyonunun artmasına neden olur (Vasilijević ve ark., 2007) ve böylece insülin üretimini ve

salgılanmasını arttırır (Lajoix ve ark., 2001). Farklı yollarla artan L-arginin miktarları, endojen NOS inhibitörü ADMA'nın (asimetrik dimetil-L-arginin) katyonik anyon taşıyıcı yoluyla ortadan kaldırılmasına neden olarak L-argininin önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca, diyabette ADMA miktarının azaltılması vasküler komplikasyonların çoğunu önemli ölçüde azaltmaktadır (Strobel ve ark., 2013).

Bir diğer önemli faktör de NO'nun biyoyararlanımının azalmasının hiperglisemi ve hiperlipidemi ile bağlantılı olmasıdır. Bu koşullar sırasında, O_2^- sürekli olarak üretilir ve sonuç olarak, O_2^- ile NO etkileşimine kıyasla O_2^- dismutasyon oranı oldukça düşük olur ve bu da NO'nun biyoyararlanımının azalmasına katkıda bulunan bir faktör olabilir. Diyabetik koşullar altında, NO ve O_2^- seviyelerini kontrol etmek için (süperoksit dismutaz) SOD taklitleri kullanılabilir. Çalışmalar, SOD taklitlerinin öncelikle anormal derecede yüksek O_2^- seviyelerine karşı koymak için tasarlanmış olmasına rağmen, sonraki araştırmalar bu taklitlerin aynı zamanda $ONOO^-$'yu da büyük ölçüde azalttığını ortaya koymuştur. Mitokondrinin işlevselliğini artırarak enerji üretme kapasitesini geri kazandıran bileşikler kullanılarak insülin duyarlılığı artırılabilir ve diyabetteki metabolik komplikasyonlar azaltılabilir (Sivitz ve Yorek, 2010).

Nitrik oksit salan yara örtülerinin diyabetik yaralarda kullanımı

NO, çok çeşitli fizyolojik aktivitelere sahip güçlü bir şekilde aktif bir radikaldir. Daha önce de belirtildiği gibi, konsantrasyonuna bağlı olarak NO hücre proliferasyonunu artırabilir ve anjiyogenezi teşvik ederek daha iyi ve daha hızlı yara iyileşmesine yol açabilir. Anjiyogenez, önceden var olan vasküler yataktan yeni kan damarlarının üretildiği karmaşık bir süreçtir ve farklı büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından organize edilir. Yara iyileşme sürecinde vasküler bütünlüğün korunması son derece önemlidir. NO, vasküler homeostazı düzenlemek için vasküler endotelyal hücreler tarafından üretilir, dolayısıyla bu üretimdeki bozukluk vasküler sistem üzerinde birçok olumsuz etkiye yol açabilir. Son zamanlarda VEGF'nin EDNO'ya bağlı bir yolla anjiyogenezin indüklenmesindeki rolü vurgulanmıştır (Papapetropoulos ve ark., 1997). Arka bacak iskemi tedavisinde plasenta kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin etkinliğini artırmak için NO salan kitosan hidrojeli dahil ettikten

sonra anjiyogenezi teşvik etmek için umut verici sonuçlar bulunmuştur (Stallmeyer. Ve ark., 2002). NO'nun anjiyogenezdeki rolünü ve anti-kanser etkilerini anlamak ve manipüle etmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

SONUÇLAR

Normal fizyolojik koşullar altında endotel hücreleri tarafından endojen olarak üretilen NO, hücre çoğalmasını, hücre göçünü ve kök hücrelerin farklılaşmasını uyararak damarlanmanın artmasını ve yaraların daha hızlı iyileşmesini sağlar. Diyabetik yaralarda, NO'nun endojen kaynağı azalır veya yavaşlar. Bu yetersiz NO kaynağı, esas olarak anjiyojenik aktivite eksikliği nedeniyle büyüyen hücrelere mikrobiyal enfeksiyonlar, kronik inflamasyon ve besin eksikliği gibi kritik zorlukları karşılayamaz. NO-donörleri gibi eksojen kaynaklardan elde edilen NO'nun topikal uygulaması bu ihtiyaçları karşılayabilir, ancak NO-donörlerinin hızlı bozunma oranları, bozulmuş diyabetik yaralara sorunsuz ve sürekli tedariki önler. Bu nedenle, NO-donörlerinin veya NO'nun kontrollü salınımını korumak ve kolaylaştırmak için hidrojellerin ve diğer polimerlerin kullanılması diyabetik yara tedavisinde umut verici bir yaklaşımdır. Halihazırda önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da gelecekteki çalışmalar olası yan etkileri azaltmayı, NO salınımını kontrol etmeyi ve NO-donörlerinin stabilitesini artırmayı amaçlayan yaklaşımlara odaklanmalıdır.

KAYNAKÇA

Achuth, H. N., Moochhala, S. M., Mahendran, R., & Tan, W. T. L. (2005). Nitrosoglutathione triggers collagen deposition in cutaneous wound repair. *Wound repair and regeneration*, 13(4), 383-389.

Ahmed, R., Augustine, R., Chaudhry, M., Akhtar, U. A., Zahid, A. A., Tariq, M., Falahati, M., Ahmad, I. S., & Hasan, A. (2022). Nitric oxide-releasing biomaterials for promoting wound healing in impaired diabetic wounds: State of the art and recent trends. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *149*, 112707.

Akhtar, S., Chandrasekhar, B., Yousif, M. H., Renno, W., Benter, I. F., & El-Hashim, A. Z. (2019). Chronic administration of nano-sized PAMAM dendrimers in vivo inhibits EGFR-ERK1/2-ROCK signaling pathway and attenuates diabetes-induced vascular remodeling and dysfunction. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, *18*, 78-89.

Albina, J. E., Mills, C. D., Barbul, A., Thirkill, C. E., Henry Jr, W. L., Mastrofrancesco, B., & Caldwell, M. D. (1988). Arginine metabolism in wounds. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *254*(4), E459-E467.

Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical journal*, *357*(3), 593-615.

Armstrong, D. G., Hanft, J. R., Driver, V. R., Smith, A. P. S., Lazaro-Martinez, J. L., Reyzelman, A. M., ... & Diabetic Foot Nutrition Study Group. (2014). Effect of oral nutritional supplementation on wound healing in diabetic foot ulcers: a prospective randomized controlled trial. *Diabetic Medicine*, *31*(9), 1069-1077.

Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S., & Murad, F. (1977). Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3′: 5′-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(8), 3203-3207.

Atlas, IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation.

Attinger, C. E., Janis, J. E., Steinberg, J., Schwartz, J., Al-Attar, A., & Couch, K. (2006). Clinical approach to wounds: debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants. *Plastic and reconstructive surgery*, *117*(7S), 72S-109S.

Bahadoran, Z., Carlström, M., Mirmiran, P., & Ghasemi, A. (2020). Nitric oxide: To be or not to be an endocrine hormone?. *Acta Physiologica*, *229*(1), e13443.

Barbul, A., Lazarou, S. A., Efron, D. T., Wasserkrug, H. L., & Efron, G. (1990). Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery*, *108*(2), 331-6.

Bulgrin, J. P., Shabani, M., & Smith, D. J. (1993). Arginine-free diet suppresses nitric oxide production in wounds. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *4*(10), 588-593.

Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European polymer journal*, *65*, 252-267.

Champeau, M., Póvoa, V., Militão, L., Cabrini, F. M., Picheth, G. F., Meneau, F., Jara, C. P., de Araujo, E. P., & de Oliveira, M. G. (2018). Supramolecular poly(acrylic acid)/F127 hydrogel with hydration-controlled nitric oxide release for enhancing wound healing. *Acta biomaterialia*, *74*, 312–325.

Cherry, P. D., Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V., & Jothianandan, D. (1982). Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(6), 2106-2110.

Chu, C., Lyu, X., Wang, Z., Jin, H., Lu, S., Xing, D., & Hu, X. (2020). Cocktail polyprodrug nanoparticles concurrently release cisplatin and peroxynitrite-generating nitric oxide in cisplatin-resistant cancers. *Chemical Engineering Journal*, *402*, 126125.

Coneski, P. N., & Schoenfisch, M. H. (2012). Nitric oxide release: Part III. Measurement and reporting. *Chemical Society Reviews*, *41*(10), 3753-3758.

Du, W., Zhang, K., Zhang, S., Wang, R., Nie, Y., Tao, H., ... & Li, Z. (2017). Enhanced proangiogenic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by a nitric oxide releasing polymer. *Biomaterials*, *133*, 70-81.

Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *nature*, *288*(5789), 373-376.

Hakim, T. S., Sugimori, K., Camporesi, E. M., & Anderson, G. (1996). Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. *Physiological measurement*, *17*(4), 267.

Heffernan, D., Dudley, B., McNeil, P. L., & Howdieshell, T. R. (2006). Local arginine supplementation results in sustained wound nitric oxide production and reductions in vascular endothelial growth factor expression and granulation tissue formation. *Journal of Surgical Research*, *133*(1), 46-54.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(24), 9265-9269 a.

Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., & Wood, K. S. (1987). Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and

chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation research*, *61*(6), 866-879 b.

Kamoun, E. A., Kenawy, E. R. S., & Chen, X. (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of advanced research*, *8*(3), 217-233.

Kim, J., Lee, Y., Singha, K., Kim, H. W., Shin, J. H., Jo, S., ... & Kim, W. J. (2011). NONOates–polyethylenimine hydrogel for controlled nitric oxide release and cell proliferation modulation. *Bioconjugate chemistry*, *22*(6), 1031-1038.

Kumar, S., Singh, R. K., & Bhardwaj, T. R. (2017). Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *85*, 182-201.

Liu, Y., Zhou, S., Gao, Y., & Zhai, Y. (2019). Electrospun nanofibers as a wound dressing for treating diabetic foot ulcer. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *14*(2), 130-143.

Marsh, N., & Marsh, A. (2000). A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *27*(4), 313-319.

Martinengo, L., Olsson, M., Bajpai, R., Soljak, M., Upton, Z., Schmidtchen, A., ... & Järbrink, K. (2019). Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Annals of epidemiology*, *29*, 8-15.

Michel, T., & Feron, O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?. *The Journal of clinical investigation*, *100*(9), 2146-2152.

Mihai, M. M., Dima, M. B., Dima, B., & Holban, A. M. (2019). Nanomaterials for wound healing and infection control. *Materials*, *12*(13), 2176.

Mihu, M. R., Sandkovsky, U., Han, G., Friedman, J. M., Nosanchuk, J. D., & Martinez, L. R. (2010). The use of nitric oxide releasing nanoparticles as a treatment against Acinetobacter baumannii in wound infections. *Virulence*, *1*(2), 62-67.

Moradi, S., Mahdizadeh, H., Šarić, T., Kim, J., Harati, J., Shahsavarani, H., ... & Moore, J. B. (2019). Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 1-13.

Papapetropoulos, A., García-Cardeña, G., Madri, J. A., & Sessa, W. C. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*, *100*(12), 3131-3139.

Reichner, J. S., Meszaros, A. J., Louis, C. A., Henry Jr, W. L., Mastrofrancesco, B., Martin, B. A., & Albina, J. E. (1999). Molecular and metabolic evidence for the

restricted expression of inducible nitric oxide synthase in healing wounds. *The American journal of pathology*, *154*(4), 1097-1104.

Rippa, A. L., Kalabusheva, E. P., & Vorotelyak, E. A. (2019). Regeneration of dermis: scarring and cells involved. *Cells*, *8*(6), 607.

Seifter, E., Rettura, G., Barbul, A., & Levenson, S. M. (1978). Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery*, *84*(2), 224-230.

Shi, H. P., Efron, D. T., Most, D., Tantry, U. S., & Barbul, A. (2000). Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery*, *128*(2), 374-378.

Shi, H. P., Most, D., Efron, D. T., Witte, M. B., & Barbul, A. (2003). Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats. *Wound repair and regeneration*, *11*(3), 198-203.

Sivitz, W. I., & Yorek, M. A. (2010). Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, *12*(4), 537-577.

Stallmeyer, B., Anhold, M., Wetzler, C., Kahlina, K., Pfeilschifter, J., & Frank, S. (2002). Regulation of eNOS in normal and diabetes-impaired skin repair: implications for tissue regeneration. *Nitric Oxide*, *6*(2), 168-177.

Strobel, J., Müller, F., Zolk, O., Endreß, B., König, J., Fromm, M. F., & Maas, R. (2013). Transport of asymmetric dimethylarginine (ADMA) by cationic amino acid transporter 2 (CAT2), organic cation transporter 2 (OCT2) and multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE1). *Amino acids*, *45*(4), 989-1002.

Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P., & Lancaster Jr, J. R. (2001). The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(1), 355-360.

Vaughn, M. W., Kuo, L., & Liao, J. C. (1998). Estimation of nitric oxide production and reactionrates in tissue by use of a mathematical model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *274*(6), H2163-H2176.

Villanueva, C., & Giulivi, C. (2010). Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *49*(3), 307-316.

Witte, M. B., & Barbul, A. (2002). Role of nitric oxide in wound repair. *The American Journal of Surgery*, *183*(4), 406-412.

Witte, M. B., Kiyama, T., & Barbul, A. (2002). Nitric oxide enhances experimental wound healing in diabetes. *British journal of surgery*, *89*(12), 1594-1601.

Zhang, K., Chen, X., Li, H., Feng, G., Nie, Y., Wei, Y., ... & Li, Z. (2020). A nitric oxide-releasing hydrogel for enhancing the therapeutic effects of mesenchymal stem cell therapy for hindlimb ischemia. *Acta biomaterialia*, *113*, 289-304.

Zhang, Y., Tang, K., Chen, B., Zhou, S., Li, N., Liu, C., ... & He, W. (2019). A polyethylenimine-based diazeniumdiolate nitric oxide donor accelerates wound healing. *Biomaterials science*, *7*(4), 1607-1616.

Zhou, X., Wang, H., Zhang, J., Li, X., Wu, Y., Wei, Y., ... & Zhao, Q. (2017). Functional poly (ε-caprolactone)/chitosan dressings with nitric oxide-releasing property improve wound healing. *Acta biomaterialia*, *54*, 128-137.

BÖLÜM 15

YARA İYİLEŞMESİNDE BAZI TIBBİ BİTKİLERİN BİYOLOJİK VE FİTOKİMYASAL AKTİVİTELERİ

Doç. Dr. E. Gülçeri GÜLEÇ PEKER[1]

[1] Giresun Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Giresun Türkiye
ORCID ID: 0000-0001-7244-0281 gulceri.peker@giresun.edu.tr

GİRİŞ

Deri, vücudun dış çevreden korunmasında hayati bir rol oynayan en büyük organdır. Kesikler, yanıklar ve bazı hastalık ya da durum komplikasyonlarının (diyabetik ayak, venöz ülserler, bası yaraları vb.) neden olduğu cilt bütünlüğünün zarar görmesi yara olarak kabul edilir. Yaraların etkili tedavisi insan sağlığı için büyük bir önem taşımaktadır. İyileşmenin bozulması ve iyileşme süresinin uzaması sağlık kurumları ve profesyonelleri, hastalar ve aileleri için ekonomik ve sosyal maliyetleri artırmaktadır (Cacioppo ve Hawkley, 2003; Young ve McNaught, 2011; Ghomi, ve ark., 2022). Bozulmuş yara iyileşmesi için uygun olmayan tedavilerin uygulanması, kanama, enfeksiyon, iltihaplanma, yara izi ve anjiyogenez ve rejenerasyonda zorluk gibi birçok soruna neden olabilir (Sharifi ve ark., 2021). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünya nüfusunun yaklaşık %80'inin birinci basamak sağlık hizmetleri için geleneksel uygulamalara bağlı olduğunu ve bu bölümün %85'inin bitkisel tedavi kullandığını tahmin ediyor. Bu popülasyonların ortodoks tedavi biçimlerine erişiminin zor olduğunu göz önünde bulunduran DSÖ, sağlığı korumak için bir araç olarak geleneksel uygulamaların benimsenmesini önermekte ve bunları 191 üye ülkesinin resmi sağlık sistemine dahil etmek için kamu politikalarının geliştirilmesini teşvik etmektedir. DSÖ istatistiklerine göre, bozulmuş/gecikmiş yara iyileşmesi sebebi ile her yıl yaklaşık 5 milyon insan ölebileceği öngörülmektedir.

Yara iyileşmesinde ve yarada mikrobiyal enfeksiyonların önlenmesinde fitokimyasal tedaviler umut verici sonuçlar doğurmuştur (Ayaz ve ark., 2015a; Ayaz ve ark., 2017b). Anti-mikrobiyal ve antioksidan etkileri ile fitokimyasallar kanın pıhtılaşmasını teşvik eder, enfeksiyonla savaşır ve yaraların iyileşmesini hızlandırır. Polifenoller açısından zengin şifalı bitkilerin kayda değer yara iyileştirme aktivitesine sahip olduğu da çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir (Mehta ve ark., 2015; Ovais ve ark., 2018; Zohra ve ark., 2019). Fenolik bileşikler, esas olarak yara kontraksiyonunu arttırıcı, antimikrobiyal ve serbest radikal süpürücü özelliklerinden dolayı yara iyileşmesini destekler (Lopes ve ark., 2005; Deshmukh ve ark., 2009). Flavonoidler gibi polifenolik bileşenler, muhtemelen antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri aracılığıyla, hücre hasarının önlenmesine ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederek, kollajen sentezinin arttırılması ile yaraların düzgün şekilde iyileşmesini teşvik edebilir (Getie ve ark., 2002; Shetty ve ark., 2008). Dünyanın az gelişmiş bölgelerindeki

birçok insan, özellikle yaraları tedavi etmek için hala geleneksel tıbbı ve bitkileri kullanmaktadır (Edeoga ve ark., 2005).

Son zamanlarda, yara iyileşmesi sürecinde bitkisel doğal ürünlerin potansiyel faydalı ajanlar olarak kullanılmasına odaklanmış çok sayıda çalışma gerçekleştirilmekte ve her yıl artan sayıda makale yayınlanmaktadır Gerçekten de düşük maliyet, yüksek bulunabilirlik ve azaltılmış yan etkiler, bu botanik ilaçların başlıca avantajlarıdır. Bitkilerde, alkaloidler, karotenoidler, flavonoidler, tanenler, terpenoidler, saponinler ve fenolik bileşikler ailelerine ait geniş bir biyoaktif fitokimyasallar yelpazesi mevcuttur (Edeoga ve ark., 2005). Bu derleme, en sık kullanılan doğal bileşiklerin terapötik aktivitesine, etki mekanizmalarına ve klinik denemelerine odaklanarak, cilt yaralarının iyileşmesine yönelik geleneksel terapilerdeki son gelişmelere genel bir bakış sunmaktadır. Bununla birlikte geleneksel ürünlerin modern tedavilerle nasıl entegre edilip kullanılabileceği ve gelecekte alanın nasıl değişeceğine dair yeni bilgilere de değinilmektedir.

YARA İYİLEŞMESİ

Yara iyileşmesi, cildin bariyer fonksiyonunu ve mekanik bütünlüğünü nihai olarak geri kazanmayı amaçlayan iyi organize edilmiş bir dizi olayla karakterize olan kompleks bir fenomendir (Janis ve Harrison, 2014). Doku hasarı, zamana bağlı, birbiri ardınca devam eden dört evreden oluşan yara iyileşme sürecini başlatır: Koagülasyon ve hemostaz; inflamasyon; proliferasyon ve remodeling (Broughton ve ark., 2006).

Hemostaz evresi

Yaralanmadan hemen sonra, kanamayı önlemek için pıhtılaşma ve hemostaz gerçekleşir. Bu süreçler, kan damarını korumak ve iyileşmenin sonraki aşamalarında ihtiyaç duyulan hücrelerin invazyonuna izin veren bir matris sağlamak için birbirine bağlı çok sayıda adım gerektirir. Pıhtılaşma kaskadı, ekstrinsik ve intrinsik yollardan aktive edilerek trombosit agregasyonuna ve pıhtı oluşumuna yol açar (Lawrence, 1998).

Hemostaz hızlı bir biçimde, üç adımlı bir olarak gerçekleşir. İlk görülen adım vasküler spazmdır, bu kan kaybının azaltılması için kan damarların vazokonstrikte olduğu ilk tepkidir. İkinci adım, bir kan damarının epitel duvarının bozulmasından saniyeler sonra görülen, trombositler damar duvarı yırtılması üzerinde geçici bir mühür oluşturmak için birbirine yapıştığı

agregasyon aşamasıdır. Yaralanma bölgesinde açığa çıkan kolajen, trombositlerin yaralanma bölgesine yapışmasını sağlar. Üçüncü ve son aşama, pıhtılaşma olarak bilinir. Pıhtılaşma kaskadı veya ikincil hemostaz, doku hasarının neden olduğu kanamaya yanıt olarak her adımın bir sonrakini aktive ettiği ve nihayetinde bir kan pıhtısı oluşturduğu bir dizi olaylar zinciridir. Pıhtılaşma safhasında, trombosit tıkacı, "moleküler yapıştırıcı" olarak işlev gören fibrin ipliklerle güçlendirilir. İlk fibrin ipliklerinin yara ile iç içe geçmesi yaklaşık 60 saniye sürer. Birkaç dakika sonra fibrinli trombosit bloğu tamamen kurulur. Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri ve sitokinler de nötrofillerin yanı sıra makrofajlar, endotelyal hücreler ve fibroblastları aktive ederek ve kemotaksisi sağlayarak yara iyileşme sürecinde rol oynarlar (Skover, 1991; Hart, 2002).

İnflamasyon evresi

Bu faz, erken inflamatuar faz ve geç inflamatuar faz olmak üzere iki ayrı aşamadan oluşur. Erken inflamatuar fazda, nötrofillerin yara bölgesine infiltrasyonunu sağlayan moleküllerin aktivasyonu gerçekleşir. Nötrofiller, çeşitli kemoatraktan ajanlar tarafından 24-36 saat içinde yara bölgesine infiltre olmaya başlar. Nötrofiller yara ortamına girdikten sonra proteolitik enzimleri ve oksijenden kaynaklı serbest radikal türlerini serbest bırakarak yabancı maddeleri, bakterileri ve hasarlı dokuyu uzaklaştırır. Görevini tamamlayan nötrofiller yarabölgesinden uzaklaşır. Geç inflamatuar faz sırasında, yara bölgesinde makrofajlar belirir ve bir sonraki iyileşme aşamasına geçmeden önce fagositoz süreci devam eder. Makrofajlar, inflamatuar yanıtın geç evrelerinde önemli bir rol oynar, anahtar düzenleyici hücreler olarak görev yapar ve büyük miktarda güçlü doku büyüme faktörlerini serbest bırakırlar. Yara bölgesine (geç inflamatuar fazda) giren son hücreler, kollajenaz enziminin düzenlemesinde önemli bir rol oynayan ve daha sonra kollajenin yeniden şekillenmesi, hücre dışı matris bileşenlerinin üretimi ve bunların bozulması için gerekli olan lenfositlerdir (Witte ve Barbul, 1997; Ennis ve Meneses, 2000; Flanagan, 2000; Velnar ve ark., 2009).

Proliferasyon evresi

Bu aşama, iyileşme sürecinin temel basamağıdır. Yaralanmadan sonraki üçüncü gün başlar ve yaklaşık 2 hafta sürer (Witte ve Barbul, 1997). Yaralanmayı takiben, inflamatuar hücreler ve trombositler tarafından salınan

Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF) ve Trombositten Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörlerin uyarısı ile fibroblastlar ve miyofibroblastlar, yaraya göç etmeden önce ilk üç gün boyunca çevre dokuda çoğalırlar (Goldman, 2004). Fibroblastlar yara dokusuna geçtiklerinde bolca çoğalır ve hyaluronan, fibronektin, proteoglikanlar ve tip 1 ve tip 3 prokollajen gibi matris proteinleri üreterek yeni sentezlenen hücre dışı matrisin birikmesini sağlarlar. Kollajen sentezi tüm dokuların bütünlüğüne ve gücüne katkıda bulunduğundan, yara iyileşmesinin tüm aşamalarında kollajen oldukça önemli bir bileşendir (Baum ve ark., 2005). Yara iyileşmesinin bu aşaması sırasında makroskopik düzeyde, bol miktarda granülasyon dokusu oluşumu gözlemlenebilir. Devam eden birkaç gün içinde granülasyon dokusu boyunca bir mikrovasküler ağ düzenlenir. Yeni kan damarlarının modellenmesi ve oluşturulması yara iyileşmesinde kritik öneme sahiptir ve onarım sürecinin tüm aşamalarında eş zamanlı olarak gerçekleşir. Son olarak, epitelizasyon meydana gelir. Yaralanmadan birkaç saat sonra epitel hücreleri yara kenarlarından yara bölgesine göç etmeye başlar; ilerleyen epitel hücreleri buluştuğunda migrasyon durur ve bazal membran oluşmaya başlar (Ramasastry, 2005).

Remodeling

Yaranın yeniden şekillenmesi sırasında skar dokusu oluşumu gerçekleşir ve yaklaşık bir yıl veya daha fazla sürede tamamlanır. Yara iyileştikçe kılcal damarların büyümesi durur, apoptoz ile fibroblast ve makrofajların sayıları düşer, kan akımı ve metabolik aktivite azalır (Greenhalgh, 1998; Flanagan, 2000). Nihai sonuç, daha az sayıda hücre ve kan damarı içeren, yüksek gerilme mukavemetine sahip tamamen olgunlaşmış bir yara izidir.

Çoğu yara basit yaralanmaların sonucu olmasına rağmen, sistemik ve lokal faktörler hassas bir şekilde dengelenmiş onarım sürecinin seyrini değiştirebilir ve yavaşlatabilir. Bu durum zamanında ve düzenli bir şekilde iyileşmeyen ve kronik yaraların ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu nedenle dokunun yarayı tamamen onarma yeteneğine göre genellikle yara akut veya kronik yaralar olarak sınıflandırılırlar.

AKUT VE KRONİK YARALAR

Akut yara, iyileşmenin ardışık evrelerinde henüz ilerlememiş olan yeni bir yara olarak tanımlanır. Epidermisi ve dermisi kapsayan yüzeysel yaralanmalar veya subkutan tabakanın tehlikeye girdiği tam kalınlıkta cilt

hasarı şekinde olabilirler. Cerrahi insizyonlar, termal yaralar, sıyrıklar ve yırtılmalar akut yaralara örnek olarak gösterilebilir. Akut yaralar, zamanında meydana gelen rutin inflamasyon, proliferasyon ve remodeling evreleri sayesinde sorunsuz iyileşme kaydederler. Akut yara iyileşmesi, yaranın proksimalinden salınan sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir (Li ve ark., 2007).

Kronik yaralar, iyileşmenin normal evrelerinin bozulduğu, iyileşme aşamalarının düzenli gerçekleşemediği ve zamanında onarılmayan yaralardır (Falanga, 1998). İyileşme süreci, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon veya remodeling aşamalarının çeşitli faktörler tarafından sekteye uğratılır ve bozulur. Bu faktörler arasında enfeksiyon, doku hipoksisi, nekroz, aşırı eksüda birikimi ve inflamatuar sitokinlerin aşırı miktarlarda üretimi sayılabilir (Vanwijck, 2001). Yaradaki sürekli inflamasyon durumu, iyileşmeyi geciktiren ve süreci bozan bir dizi doku tepkisi yaratır. İyileşmenin koordinasyonsuz bir şekilde ilerlemesi ve hem fonksiyonel hem de anatomik sonuçlar kötü olduğundan, kronik yaralar sıklıkla nüks eder. Kronik yaralar;diyabet, nöropatik hastalıklar, basınç, arteriyel ve venöz yetmezlik, yanıklar ve/veya vaskülit gibi çeşitli nedenlerle ilişkili olabilir (Degreef, 1998).

Akut yaraların iyileşme süreci sadece birkaç hafta alırken, kronik yaraların tamamen iyileşmesi birkaç ay ya da daha uzun sürer.

YARA ÖRTÜLERİ

Tıbbi pansumanlar standart yara bakımının temel unsurudur. Geleneksel kuru pansumanların ve modern ıslak pansumanların yaraların klinik tedavisindeki terapötik etkileri iyi bilinmektedir. Türlerine ve iyileşmenin aşamalarına göre, iyileşmeyi desteklemek için yara yüzeyine pansumanlar uygulanabilir. Yaygın klinik uygulama pansumanları (gazlı bez ve bandajlar) ucuz olsa da, yalnızca fiziksel koruma sağlarlar ve iyileşme süreci ve enfeksiyon önleme açısından sınırlı faydaları vardır. Dahası, sargının yaraya yapışması, sonunda ikisi ayrıldığında ikincil hasara neden olabilir (Shi ve ark., 2020). Yüksek performanslı yara örtüleri yarayı nemli tutabilmeli, büyüme faktörlerinin çözünmesini sağlamalı, fibroblast büyümesini desteklemeli, eksüdayı emebilmeli ve oksijen alışverişi yapabilmelidir. Ayrıca, ideal yara örtüsü antibakteriyel aktiviteye ve biyouyumlu özelliklere de sahip olmalıdır (Patrulea ve ark., 2015).

YARA İYİLEŞTİRMEDE DOĞAL BİTKİLER VE BAHARATLAR

Bitkisel ilaçlar, eski çağlardan beri yara iyileşmesini hızlandırmak için halk tıbbında kullanılmaktadır. Birçok bitki ve bunların çeşitli preparatları, özellikle yara iyileşmesini etkileme potansiyelleri nedeniyle geleneksel olarak yara tedavisi ile ilgili olarak kullanılmıştır (Gupta ve Jain, 2010). Bitki bazlı ekstraktlar ve/veya izolatlar, genellikle tüm iyileşme sürecini güçlendirmek için birlikte çalışan çeşitli mekanizmalar yoluyla doku yenilenmesini destekler (Maver ve ark., 2015).

Günümüzde, bu bitkilerin birçoğunun etkinliği, etki mekanizmalarıyla birlikte iyi bir şekilde ortaya konmuştur. Bu nedenle, doğal ürünler ve bunların saf bileşikleri, aralarında yara iyileşmesinin de bulunduğu çeşitli hastalıkların tedavisi için alternatif tıbbi bileşiklerin ortaya çıkan bir kaynağını teşkil etmektedirler.

Civanperçemi

Civanperçemi (*Achillea millefolium* L.), Avrupa'dan Asya'ya birçok kültürün geleneksel tıbbında yaralar, kesikler, sıyrıklar ve diyabetik ülserler gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan Asteraceae familyasının önemli bir türüdür (Cavalcantive ark., 2006; Benedek ve Kopp 2007). Civanperçemi çiçeğinin biyoaktif kısmı olan uçucu yağlar, yara tedavisinde hemostatik olarak kullanılmaktadır. Civanperçemi çiçeklerinden elde edilen uçucu yağların %90'ı monoterpenlerdir (Başer ve ark., 2002). Civanperçeminin toprak üstü kısımlarının metanolik ekstraktında çok çeşitli diğer kimyasal bileşikler de rapor edilmiştir. Bunlar arasında bulunan klorojenik asit, rutin, luteolin-glukozit ve apigenin-glukozit gibi flavonoidler toplam ekstrakt bileşenlerinin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır (Vitalini ve ark., 2011). *Farklı in-vitro* ve *in-vivo* deneylerde, civanperçeminden elde edilen aktif bileşiklerin, -çoğunlukla flavonoidlerin varlığına atfedilen- antioksidan ve anti-inflamatuar etkinlikleri gösterilmiştir (Csupor-Löffler ve ark., 2009; De Souzave ark., 2011; Arias-Durán ve ark., 2020). Civanperçeminin geleneksel tıpta yara iyileşmesi ve deri iltihabının tedavisi için yaygın olarak kullanılmasına rağmen (Tadi´c ve ark., 2017), civanperçemi ekstraktının (CE) yara iyileşmesi üzerindeki etkilerine ilişkin modern çalışmalar hala çok sayıda değildir.

Dorjsembe ve arkadaşları (2017) civanperçemi çiçeklerinin alkollü ekstraktının kutanöz yara iyileşmesi üzerindeki etkisini *in vitro* ve *in vivo* modellerde araştırmış ve %3' lük CE tedavisinin epitelizasyonu önemli ölçüde artırdığını ve yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermişlerdir. Bu iyileştirici etki β-katenin ve Akt ekspresyonlarındaki artışla ilişkilendirilmiştir (Dorjsembe ve ark., 2017). Ayrıca, *in-vitro* deneylerde, CE tedavileri (25-50 mg/mL), Hs68 fibroblast hücre hattında TGF-β'yı aktive ederek kolajen ekspresyonunu uyarmış ve RAW 264.7 makrofajlarında Nitrik Oksit (NO) ve prostaglandin E2 salınımını azaltarak anti-inflamatuar aktivite göstermiştir. Bu sonuçlara dayanarak, civanperçemi çiçeği ekstraktının yara iyileşmesi üzerinde faydalı bir olumlu etkisi olduğu varsayılabilir (Dorjsembe ve ark., 2017).

Aloe vera

Aloe vera L. veya *Aloe barbadensis* Miller (Xanthorrhoeaceae familyası) parlak sarı boru şeklinde çiçekleri olan çok yıllık yeşil bir bitkidir. Müsilajlı jeli, farmakolojik ve kozmetik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Long, 2016). A, C, E ve B12 vitaminleri, enzimler (amilaz, katalaz ve peroksidaz), mineraller (çinko, bakır, selenyum ve kalsiyum), şekerler (glukomannanlar, asetillenmiş mannanlar, polymannanlar), polifenoller (antrakinonlar), steroller (lupeol ve kampesterol) ve hormonlar (oksinler ve gibberellinler) dahil olmak üzere 75'ten fazla farklı biyoaktif sahiptir. Bu tıbbi bitki, gençleştirme, yara iyileşmesi ve diğer dermatolojik durumlar, yani yanıklar ve enflamatuar süreçler gibi farklı cilt sorunlarını tedavi etmek için kullanılmıştır. Aslında, bir halk ilacı olarak yaygın kullanımına rağmen, yara onarımındaki fizyolojik işlevi üzerine bilimsel çalışmalar ancak yakın zamanda yapılmıştır. Pazarlanan çok sayıdaki *A. vera* jel bazlı kozmetik ve tıbbi ürün, *A. vera* yapraklarının müsilajlı dokusundan yapılmaktadır. Bununla birlikte, Aloe jeli cilt iltihabı için çeşitli faydalı etkiler ve terapötik endikasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Sánchez-Machado ve ark., 2017).

A. vera jelinin bileşenleri münferit olarak uygulandığında hayvan modellerinde yara iyileşmesini destekleyebilir ve jel çeşitli hayvan modellerinde akut yaralara uygulandığında spesifik glikoproteinler yararlı etkilerden sorumludur; ancak, insanlarda yapılan kontrollü klinik çalışmalar topikal tedaviye *A. vera* dahil edildiğinde hiçbir fayda sağlamadığını gösterilmiş ve bir çalışmada da yara iyileşmesinin geciktiği bildirilmiştir

(Roberts ve Travis, 1995; Zhang ve Tizard, 1996; Gallagher ve Gray, 2003). Sıçan kutanöz yara modellerinde *A. vera*'nın topikal kullanımının, yara kontraksiyonu, epitelizasyon ve matürasyon oranını önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, kontrol lezyonlarına kıyasla kolajen ve glikozaminoglikan konsantrasyonunu artırarak inflamasyonu azaltır, skar dokusu boyutunu azalttığı ve rejenere skar dokusunun hizalanmasını ve organizasyonunu arttırdığı da gösterilmiştir (Gallagher ve Gray, 2003).

A. vera 'nın inflamasyonu modüle ettiği mekanizmayı açıklığa kavuşturmak için Hormozi ve ark. (2017) fare embriyonik fibroblast hücrelerini 12 ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (50-150 µg/mL) *A. vera* jeline maruz bırakmış ve TGF1 ve bFGF protein genlerinin ilk 12 saat boyunca up-regüle olduğunu ve inkübasyon sonunda down-regüle olduğunu bulmuşlardır. Bu durum, *A. vera* 'nın kolajen birikimini, fibroblast proliferasyonunu ve anjiyogenezi uyararak ve hipertrofik skarlaşmaya neden olan matris proteinlerinin aşırı üretimini ve birikimini engelleyerek faydalı etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır (Hormozi ve ark., 2017).

İnsan derisi fibroblastları ve keratinositlerinin *in vitro* modellerinde (Yamao ve ark., 2015; Oliveira ve ark., 2016; Wahedi ve ark., 2017; De Oliveira ve ark., 2018). *A. vera* fibroblast ve keratinosit proliferasyonunu güçlü bir şekilde uyararak ve hücre göçünü orta derecede uyararak yara iyileşmesini hızlandırmıştır.

Yakın zamanda yapılan bir incelemeye göre aloesin gibi *A. vera* bileşikleri inflamatuar yanıtı modüle edebilir (Oliveira ve ark., 2016). Aloesin, yara iyileşmesinin erken aşamalarında lökosit ekstravazasyonunun yanı sıra sitokin ve büyüme faktörü salınımını teşvik eder. Sonuç olarak, aloesin hem fibroblast hem de lökosit göçünü etkiliyor gibi görünmektedir (Hormozi ve ark., 2017). Aloesinin, aktin dinamiklerini ve hücre polarizasyonunu koordine eden ve düzenleyen iki sinyal proteini olan Cdc42 ve Rac1'i fosforile ederek lökosit göçünü etkilediği düşünülmektedir / Wahedi ve ark., 2017). Aloesin varlığında TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6 ve TGF-1 mediyatörleri, lökosit sinyalizasyonuna, göçüne ve fagositoza aracılık eden pro-inflamatuar belirteçlerdir (Yamao ve ark., 2015). De Oliveira ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, *A. vera* ekstraktının iyileştirici özelliğinin 50 mg/kg dozunda gözlenebildiği, ancak aynı dozda periferik kanda mutajenik ve sitotoksik etkilerin gözlendiği tespit edilmiştir.

Bazı çalışmalar, *A. vera* tedavisi ve kontrol grupları arasında yara iyileşmesi açısından önemli bir fark bulamamıştır; mikroorganizma konsantrasyonlarını azalttığına veya yanık yaralarında skar olgunlaşmasını iyileştirdiğine dair çok az kanıt vardır, fibroblast göç dinamiklerinde önemli bir değişiklik yoktur ve yara onarımı açısından örnek grupları arasında bir fark bulunmamıştır (Oliveira ve ark., 2016). Bunun nedeni muhtemelen ekstrakt konsantrasyonlarının standardizasyonu sorunudur. Bu çalışmalardan bazılarında, anti-inflamatuar ve proliferatif etkileri bilinen aktif bileşiklerin yetersiz konsantrasyonlarına sahip Aloe özütleri kullanmış olabilir veya diğer uygun olmayan alternatif tedavilerle kombine edilmiş olabilir.

Aynısefa

Asteraceae familyasına ait olan aynısefa (*Calendula officinalis*), Avrupa, Asya, Çin, Amerika Birleşik Devletleri ve Hindistan'da tıbbi olarak kullanılan yaygın bir bahçe bitkisidir. Geleneksel olarak, küçük yaraları, yanıkları ve diğer cilt sorunlarını tedavi etmek için harici olarak kullanılmıştır (John ve Jan, 2017). Aynısefa bitkisi, infüzyon, tentür, sıvı ekstrakt, krem veya merhem şeklinde uçuk, yara, yara izi, cilt ve saç rahatsızlıklarının tedavisi de dahil olmak üzere çok sayıda amaç için kullanılmaktadır (Arora ve ark., 2013).

Aynısefanın akut yaraların iyileşmesindeki rolüne ilişkin araştırmaların çoğu *in vitro* (fibroblast ve keratinosit hücre kültürleri) ve *in vivo* (kemirgen hayvan modelleri) çalışmalardan elde edilmiştir. Aynısefa çiçeği alkol ekstreleri (AE) *in vitro* anti-inflamatuar ve antiödematöz özellikler göstermiştir. Ayrıca, insan fibroblast ve keratinosit proliferasyonunu ve göçünü artırmış, koryoallantois membran modelinde anjiyogenezi teşvik etmiş ve kolajenaz aktivitesini azaltmıştır (Nicolaus ve ark., 2017). AE, transkripsiyon faktörü NF-kB'yi aktive ederek ve hem transkripsiyonel hem de translasyonel seviyelerde kemokin IL-8 miktarını artırarak keratinositlerdeki inflamatuar fazı etkilerken, keratinosit göçü üzerinde küçük bir etkisi olmuştur. AE aynı zamanda fibroblast proliferasyonunu indükler (Shafeie ve ark., 2015) ve yara iyileşmesinin erken aşamalarında bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) ve alfa-düz kas aktin (alfa-SMA) ekspresyonunu yukarı doğru düzenler *İn vivo* bir çalışmada AE, sıçan kutanöz yara modelinde kolajen birikimini artırırken fibrin ve hiperemi varlığını azaltmıştır. Bu bulgular AE'nın anti-bakteriyel özelliklere sahip olduğunu, fibroplazi ve anjiyogenezi uyardığını ve kutanöz yaraların

iyileşme sürecinin inflamatuar ve proliferatif aşamalarını olumlu yönde etkilediğini göstermektedir (Parente ve ark., 2012). Anı sefa bitkisinin baskın biyoaktif bileşikleri terpenoidler, tüm bu etkilerden birincil olarak sorumlu gibi görünmektedir.

Zerdeçal

Zerdeçal baharatı, Zingiberacee familyasına ait otsu, çok yıllık, rizomlu bir bitki olan *Curcuma longa*'nın rizomundan elde edilir ve polifenolik antioksidan bileşikler içerir (Hassan, 2006). Zerdeçal, ayurveda ve halk tıbbında, çeşitli inflamatuar hastalıkları tedavi etmek için uzun süredir kullanılmaktadır. Zerdeçalın anti-inflamatuar etkisi; histamin üretimini azaltma ve doğal anti-inflamatuar adrenal hormon olan kortizolün etkisini uzatma kabiliyetinden kaynaklanmaktadır.

Zerdeçalın sağlık üzerindeki etkileri genellikle turuncu-sarı renkli, lipofilik bir polifenol bileşiği olan "kurkumin" adı verilen ana bileşenine atfedilir (Anamika, 2012). Kurkumin, zerdeçalda bulunan üç kurkuminoidden biridir ve baharatın %2 ila 5'ini ve tekil ekstraktın yaklaşık %77'sini oluşturur. Kurkuminin (1,7-bis (4-hidroksi-3metoksifenil)-1,6-hepadien-3,5-dion) yapısı ilk olarak 1910 yılında Milobedska ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Kurkumin oldukça pleiotropik bir moleküldür. Son zamanlarda, anti-kanser, anti-aging, antiviral, antibakteriyel ve yara iyileştirici ajan olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (Agrawal ve Mishra, 2010; Memarzia ve ark., 2021). Kurkuminin yara iyileştirme potansiyeli, anti-inflamatuar, antioksidan ve radikal süpürücü aktivitelerine bağlanmaktadır (Ak ve Gülçin, 2008). Kurkumin tüm yara iyileşmesinin tüm aşamalarında etkilidir. İnflamasyon aşamasında, kurkuminin NF-kB aktivitesini ve TNF-alfa ve IL-1 üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Thangapazham ve ark., 2013).

Kurkuminin radikal süpürücü faaliyetleri yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir, ancak bu bileşik yüksek dozlarda kullanıldığında pro-oksidan olarak hareket edebilir (Barzegar ve Moosavi-Movahedi, 2011). Keratinositler ve fibroblastlar üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda, kurkumin hidrojen peroksite karşı optimum koruma sağlamıştır. Proliferatif aşamada, kurkumin fibroblast göçünü, granülasyon dokusu oluşumunu, kolajen birikimini ve re-epitelizasyonu artırır. Kurkumin, TGF-beta üretimini ve sonuç olarak fibroblast proliferasyonunu artırarak remodeling aşamasında yara

kontraksiyonunu da arttırır. Akut ve kronik inflamasyonun baskılanması ise siklooksijenazlar, lipoksijenazlar ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimlerinin blokasyonu ederek gerçekleşir (Tejada ve ark., 2016).

Adaçayı

Adaçayı (*Salvia officinalis* Lodunsu gövdeli, grimsi yapraklı ve maviden morumsu çiçeklere sahip çok yıllık, yaprak dökmeyen bir çalı türüdür (Wang ve ark., 1998). Adaçayı bitkisi, Lamiaceae (eski adıyla Labiatae) familyasında yaklaşık 900 türden oluşan önemli bir cinstir. Adaçayı türleri Akdeniz bölgesine özgüdür ve halk tıbbı ve mutfak amaçlı kullanım için dünya çapında yetiştirilmektedir. Bu bitki çok çeşitli tıbbi kullanımlara sahiptir ve geleneksel olarak altmıştan fazla hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Topçu, 2006).

Bitkiden elde edilen uçucu yağların analizine göre, bu türler yağ asitleri, karbonhidratlar, alkaloidler, glikozit saponinler, terpenler, fenolik asitler, flavonoidler ve poliasetilenler dahil olmak üzere yaklaşık 120 fito bileşen içerir (Topçu 2006). Yağ ve sulu ekstraktların biyolojik etkileri arasında anti-inflamatuar, antibakteriyel ve antioksidan aktivite bulunmaktadır (Ghorbani ve Esmaeilizadeh, 2017). Çok sayıda çalışma, adaçayı uçucu yağının bileşiminin mevsimsel varyasyon, genetik çeşitlilik, bitki bölümlerindeki savunma ve gelişim aşaması farklılıklarıyla ilişkili olarak önemli değişikliklere uğradığını göstermiştir (Perry ve ark., 1999).

Çok sayıda araştırma adaçayının yara iyileşmesi üzerindeki etkisini ortaya koymuştur. Farahpour ve arkadaşları (2020), farelerdeki tam kat deri yaraları üzerinde %2 ve %4 (w/w) adaçayı yağı topikal merhemlerinin, kontrol grubuna kıyasla pro-inflamatuar sitokinleri ve genel bakteri sayısını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Bu çalışmadaki veriler, bu tedavinin IL-6, IL-1 ve TNF-alfa mRNA ekspresyon seviyelerini azaltarak pro-inflamatuar yanıtı bastırdığını ve siklin-D1 ekspresyonunu artırarak fibroblast proliferasyonunu teşvik ettiğini göstermiştir. Ayrıca, adaçayının yara kenarında ve bazal keratinositlerde VEGF transkripsiyonunu ve sekresyonunu ve FGF-2 ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir (Farahpour ve ark., 2020). Sıçanlarda bir yara modeli kullanılarak yapılan başka bir çalışmada %1, 3 ve 5 adaçayının hidroetanolik yaprak ekstrelerinin topikal uygulaması, özellikle yüksek dozlarda, yara kasılma yüzdesini, re-epitelizasyon süresini, kopma mukavemeti oranını ve kontrol grubuna kıyasla hidroksiprolin içeriğini önemli ölçüde

artırmıştır. Ayrıca, adaçayı ekstraktı yeni damar oluşumunu ve fibroblast dağılımını önemli ölçüde artırmıştır (Karimzadeh ve Farahpour, 2017).

Bir başka çalışmada, iki farklı adaçayı türünün (*Salvia kronenburgii* (SK) ve *Salvia euphratica* (SE)) etanol yaprak ekstraktlarının iki farklı konsantrasyonda (%0,5 ve %1 (w/w)) diyabetik sıçanlarda insizyon ve eksizyon yara modelleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu özütler bakteri, virüs ve mantarlarla mücadele etme kabiliyetleri açısından test edilmiştir. *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis*'in yanı sıra *Escherichia coli, Aeromonas hydrophila* ve *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı en iyi sonucu vermişlerdir. Ayrıca, SK ve SE merhemlerinin her iki konsantrasyonu da referans ilaç kadar etkili bulunmuş ve 14. günden sonra eksizyon ve insizyon yara modellerinde %96,9-99,9 aralığında önemli yara kapanma oranları göstermiştir (Güzel ve ark., 2019). Bu sonuçlar, doğada yaygın olarak bulunan adaçayı türlerinin, yüksek maliyet ve yan etkilere sahip sentetik ilaçlara alternatif olarak bulaşıcı hastalıkların tedavisi için umut verici antimikrobiyal ve yara iyileştirici ajanlar olabileceğini göstermektedir.

Biberiye

Genellikle baharat olarak kullanılan biberiye (*Rosmarinus officinalis* L)., Lamiaceae familyasının bir üyesidir. Biberiye, dünya çapında yaygın olarak yetiştirilen ve halk tıbbında kullanılan kokulu, iğne benzeri yapraklı bir bitkidir. Karnosol/karnosik ve ursolik asitlerin varlığı nedeniyle, biberiye tedavi edici özelliklere sahiptir ve özellikle antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri için ilaç ve kozmetik endüstrilerinde kullanılmaktadır (Al-Sereiti ve ark., 1999). Yara iyileşmesi, cilt kanseri ve mikoz tedavileri de dahil olmak üzere diğer kullanım alanları da araştırılmıştır. Ultraviyole hasarı ve yaşlanma gibi patolojik olmayan cilt koşullarının tedavisinde potansiyel uygulamalar gösterilmiştir (Begum ve ark., 2013; Raškovic´ ve ark., 2014).

Biberiye, önemli miktarda fenolik bileşikleri (diterpenoidler ve flavonoidler) ve bununla birlikte çok sayıda ikincil metabolitleri içerir (Begum ve ark., 2013). Biberiyede keşfedilen flavonoidler (eriocitrin, luteolin 3′-O-D-glucuronide, hesperidin, diosmin, isoscutellarein 7-O-glucoside, hispidulin 7-O-glucoside ve genkwanin) bitkinin çeşitli kısımlarında tespit edilmiştir (del Baño ve ark., 2004).

Diyabetik sıçanlarla yapılan bir *in vivo* çalışmada, biberiye esansiyel yağları ile tedavi edilen grup, kontrol grubuna kıyasla iyileşme, anjiyogenez ve granülasyon dokusu oluşumunda önemli gelişmeler göstermiştir (Abu-Al-Basal, 2010). Başka bir çalışmada, %10 derişimindeki biberiye yağı ile topikal olarak tedavi edilen diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanların yara iyileşmesinin hızlandığı gösterilmiştir (Umasankar ve ark., 2012). Sıçanlarda eksizyon yara modeli kullanılarak yapılan bir çalışmada, çay ağacı esansiyel yağı, biberiye esansiyel yağı veya iki yağın bir kombinasyonunu içeren üç kitosan bazlı topikal formülasyonun yara iyileşme potansiyeli incelenmiştir. Uçucu yağlarla veya tedavisiz grup ile karşılaştırıldığında, her iki yağın karışımını içeren kitosan bazlı bir ürünün topikal uygulaması yara büzülmesini önemli ölçüde artırmıştır. Ayrıca, histopatolojik inceleme, iki uçucu yağ birleştirildiğinde saç foliküllerinin tamamen yeniden epitelize olduğunu ve aktivasyonunu ortaya koymuştur. Uçucu yağların monoterpen içeriği, antioksidan ve yara iyileştirici özelliklerine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur (Labib ve ark., 2019). Sonuç olarak, biberiye özü büyük bir terapötik potansiyele sahiptir ve yaraların farklı aşamalarda iyileşmesine yardımcı olabilir.

SONUÇLAR

Yara iyileşmesinde meydana gelen aksaklıklar dünya çapında insanların yaşam kalitesini olumsuz etkileyen ciddi bir durumdur. Yaraların etkili tedavisi, uygun hücre tiplerinin, hücre yüzeyi reseptörlerinin ve hücre dışı matrisin terapötik ajanlarla etkileşimine bağlıdır. Cilt dokusu yapısının karmaşıklığı nedeniyle, hızlı ve etkili bir iyileşme sürecine yol açabilecek ideal bir ilacın geliştirilmesi hala bir zorluktur.

Son beş yılda elde edilen bilimsel kanıtlar, bitkisel ilaçların yara iyileşmesi üzerindeki etkileri ve altta yatan moleküler mekanizmalar hakkındaki bilgilerimizi genişletmemizi sağlamıştır. Bu derlemede rapor edilen tüm bitkiler antioksidan, anti-inflamatuar ve antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Son çalışmalar, yara iyileşmesinde aktif olan bitkisel ilaçların aktivitesinin esas olarak çeşitli mekanizmalar yoluyla sürecin farklı aşamalarında etkili olabilen flavonoidler, alkaloidler, saponinler, fenolik bileşikler ve polisakkaritlere atfedildiğine dair yeni kanıtlar sağlamıştır. Artan araştırmalar sayesinde, polifenolik bileşiklerin inflamatuar tepkileri kontrol

ederek ve modüle ederek yara iyileşmesinde terapötik ajanlar olduğu doğrulanmıştır. Tıbbi bitkilerde bulunan triterpenoidler, kurkumin vb. gibi birçok fitokimyasalın, fibroblast proliferasyonunu veya kolajen üretimini teşvik ederek hemostaz, re-epitelizasyon ve rejenerasyonda anahtar faktörler olduğu bulunmuştur. Yara örtülerindeki karotenoidler, flavonoidler ve triterpenoidler oksidatif stresi engeller ve antioksidan aktiviteyi destekler. Reaktif oksijen türleri (ROT), immünositlere ve lenfoid olmayan hücrelere ikincil haberciler olarak etki ederek, onarım sürecinde, lenfoid hücrelerin aktive edilmesinde, anjiyogenezde ve yara bölgesindeki patojenlerin yok edilmesinde rol oynar. ROT'nin aşırı üretimi in vivo olarak tespit edilmiş ve bozulmuş yara onarımı ile ilişkilendirilmiştir. Pro-inflamatuar sitokin salgılanmasını ve matriks metaloproteazların indüksiyonunu teşvik etmenin yanı sıra, aşırı ROT üretimi, dermal fibroblastlar ve keratinositler üzerinde olumsuz etkileri olan hücre dışı matriks proteinlerini de değiştirebilir veya bozabilir.

Bu derlemenin sonuçlarından, ekstraksiyon yöntemleri, uygulama şekli ve deneysel modeller de dahil olmak üzere deneysel tasarım ve protokollerdeki çeşitlilik eksikliği açıkça ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, fitokimyasalların yara iyileşmesinde kullanımında önemli konular, optimum dozların ve uygulama yolunun tanımlanmasıdır. Bu amaçla, araştırmalar en etkili fitokimyasal karışımını, en iyi bitki kaynağını ve uygulama şeklini belirlemeye odaklanmalıdır.

Yara bakımındaki mevcut eğilimler, bitkisel iyileştirici ajanların kullanımını modern ürün ve uygulamalarla birleştiren yenilikçi yara bakım tedavilerinin geliştirilmesine doğru ilerlemektedir. Son yıllarda, nano yapılar ve nano-formülasyonlar, yaygın ilaçların dezavantajlarının üstesinden gelme konusunda umut vaat etmektedir. Bu yeni uygulamalar terapötiklerin salınımını düzenler, iyileşme için gereken dozları azaltır ve suda çözünmeyen bitkisel bileşenlerin çözünürlüğünü ve yara iyileştirme etkinliğini artırırlar. İyi düzenlenmiş gözeneklilik ve nanoliflerin cilt dokusuna benzerliği, onları yara yönetimi için idealyara örtüleri haline getirmektedir. Araştırmacılar, *A. vera* yüklü aljinat hidrojeller, adaçayı ekstraktlı pansuman filmleri, safran bileşenleri içeren hidrojel tabakalar ve kurkumin içeren nanofibröz iskele gibi yara örtüleri için nanofibröz mimarilere doğal maddelerin dahil edilmesini araştırmışlardır. Doğal lipidler veya polisakkarit matriks ve bitkisel özlerden oluşan biyouyumlu

bir formülasyon kullanma olasılığı, tüketiciye "yeşil" bir seçenek sunacak ve cilde uygulandıktan sonra neredeyse hiçbir yan etkisi olmayacaktır.

Bu gözlemlere dayanarak, yara iyileşme sürecini hızlandırmak ve yara komplikasyonlarını önlemek için yaraların, özellikle de kronik yaraların tedavisinde farklı terapötik stratejiler eş zamanlı olarak kullanılmalıdır. Ayrıca, yara bakımında doğal maddelerin etkinliğini ve kullanımını artırmak için bazı sorunların çözülmesi gerekmektedir. Ürünlerin güvenliğini belirlemek, yan etkilerini araştırmak ve çift kör kontrollü klinik deneyler yapmak için çok disiplinli çabalar gerekmektedir. İyi üretim uygulamaları ve düzenleyici mevzuat da klinisyenlerin fitoterapi kullanımını artırmada ve ulusal sağlık sistemlerine entegrasyonunu teşvik etmede kritik bir rol oynamaktadır.

KAYNAKÇA

Abu-Al-Basal, M.A. Healing Potential of Rosmarinus officinalis L. on Full-Thickness Excision Cutaneous Wounds in Alloxan- Induced-Diabetic BALB/c Mice. J. Ethnopharmacol. 2010, 131, 443–450.

Agrawal, D.K.; Mishra, P.K. Curcumin and Its Analogues: Potential Anticancer Agents. Med. Res. Rev. 2010, 30, 818–860.

Ak, T.; Gülçin, I. Antioxidant and Radical Scavenging Properties of Curcumin. Chem. Biol. Interact. 2008, 174, 27–37.

Al-Sereiti, M.R.; Abu-Amer, K.M.; Sen, P. Pharmacology of Rosemary (Rosmarinus Officinalis Linn.) and Its Therapeutic Potentials. Indian J. Exp. Biol. 1999, 37, 124–130.

Anamika, B. Extraction of Curcumin. J. Env. Sci Toxicol Food Technol 2012, 1, 1–16.

Arias-Durán, L.; Estrada-Soto, S.; Hernández-Morales, M.; Chávez-Silva, F.; Navarrete-Vázquez, G.; León-Rivera, I.; Perea-Arango, I.; Villalobos-Molina, R.; Ibarra-Barajas, M. Tracheal Relaxation through Calcium Channel Blockade of Achillea millefolium Hexanic Extract and Its Main Bioactive Compounds. J. Ethnopharmacol. 2020, 253, 112643.

Arora, D.; Rani, A.; Sharma, A. A Review on Phytochemistry and Ethnopharmacological Aspects of Genus Calendula. Pharmacogn. Rev. 2013, 7, 179–187.

Ayaz, M.; Sadiq, A.; Junaid, M.; Ullah, F.; Subhan, F.; Ahmed, J. Neuroprotective and Anti-Aging Potentials of Essential Oils from Aromatic and Medicinal Plants. Front. Aging Neurosci. 2017, 9, 168. (b)

Ayaz, M.; Subhan, F.; Ahmed, J.; Khan, A.-U.; Ullah, F.; Ullah, I.; Ali, G.; Syed, N.-I.-H.; Hussain, S. Sertraline Enhances the Activity of Antimicrobial Agents against Pathogens of Clinical Relevance. J. Biol. Res. 2015, 22, 4. (a)

Barzegar, A.; Moosavi-Movahedi, A.A. Intracellular ROS Protection Efficiency and Free Radical Scavenging Activity of Curcumin. PLoS ONE 2011, 6, e26012.

Başer, K.H.; Demirci, B.; Demirci, F.; Koçak, S.; Akıncı, Ç.; Malyer, H.; Güleryüz, G. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Achillea multifida. Planta Med. 2002, 68, 941–943.

Baum, C.L.; Arpey, C.J. Normal CutaneousWound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events. Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. 2005, 31, 674–686, discussion 686.

Begum, A.; Sandhya, S.; Shaffath Ali, S.; Vinod, K.R.; Reddy, S.; Banji, D. An In-Depth Review on the Medicinal Flora Rosmarinus Officinalis (Lamiaceae). Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 2013, 12, 61–73.

Benedek, B.; Kopp, B. Achillea millefolium L. s.l. Revisited: Recent Findings Confirm the Traditional Use. Wien. Med. Wochenschr 2007, 157, 312–314.

Broughton, G.; Janis, J.E.; Attinger, C.E. The Basic Science of Wound Healing. Plast. Reconstr. Surg. 2006, 117, 12S–34S.

Cacioppo, J.T.; Hawkley, L.C. Social Isolation and Health, with an Emphasis on Underlying Mechanisms. Perspect. Biol. Med. 2003, 46, S39–S52.

Cavalcanti, A.M.; Baggio, C.H.; Freitas, C.S.; Rieck, L.; de Sousa, R.S.; Da Silva-Santos, J.E.; Mesia-Vela, S.; Marques, M.C.A.Safety and Antiulcer Efficacy Studies of Achillea millefolium L. after Chronic Treatment in Wistar Rats. J. Ethnopharmacol. 2006, 107, 77–284.

Csupor-Löffler, B.; Hajdú, Z.; Zupkó, I.; Réthy, B.; Falkay, G.; Forgo, P.; Hohmann, J. Antiproliferative Effect of Flavonoids and Sesquiterpenoids from Achillea millefolium s.l. on Cultured Human Tumour Cell Lines. Phytother. Res. 2009, 23, 672–676.

De Oliveira, A.C.L.; Tabrez, S.; Shakil, S.; Khan, M.I.; Asghar, M.N.; Matias, B.D.; da Silva Batista, J.M.A.; Rosal, M.M.; de Lima, M.M.D.F.; Gomes, S.R.F. Mutagenic, Antioxidant andWound Healing Properties of Aloe vera. J. Ethnopharmacol. 2018, 227, 191–197.

De Souza, P.; Gasparotto, A.; Crestani, S.; Stefanello, M.É.A.; Marques, M.C.A.; da Silva-Santos, J.E.; Kassuya, C.A.L. Hypotensive Mechanism of the Extracts and Artemetin Isolated from Achillea millefolium L. (Asteraceae) in Rats. Phytomedicine 2011, 18, 819–825.

Degreef, H.J. How to Heal aWound Fast. Dermatol. Clin. 1998, 16, 365–375.

del Baño, M.J.; Lorente, J.; Castillo, J.; Benavente-García, O.; Marín, M.P.; Del Río, J.A.; Ortuño, A.; Ibarra, I. Flavonoid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of Rosmarinus Officinalis. Postulation of a Biosynthetic Pathway. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 4987–4992.

Deshmukh, P.T.; Fernandes, J.; Atul, A.; Toppo, E. Wound Healing Activity of Calotropis Gigantea Root Bark in Rats.J. Ethnopharmacol. 2009, 125, 178–181.

Dorjsembe, B.; Lee, H.J.; Kim, M.; Dulamjav, B.; Jigjid, T.; Nho, C.W. Achillea Asiatica Extract and Its Active Compounds Induce Cutaneous Wound Healing. J. Ethnopharmacol. 2017, 206, 306–314.

Edeoga, H.O.; Okwu, D.E.; Mbaebie, B.O. Phytochemical Constituents of Some Nigerian Medicinal Plants. Afr. J. Biotechnol. 2005, 4, 685–688.

Ennis, W.J.; Meneses, P. Wound Healing at the Local Level: The Stunned Wound. Ostomy Wound Manag. 2000, 46, 39S–50S.

Falanga, V.Wound Healing and Chronic Wounds. J. Cutan. Med. Surg. 1998, 3, S1–S5.

Farahpour, M.R.; Pirkhezr, E.; Ashrafian, A.; Sonboli, A. Accelerated Healing by Topical Administration of Salvia officinalis Essential Oil on Pseudomonas Aeruginosa and Staphylococcus Aureus InfectedWound Model. Biomed. Pharmacother. Biomed. Pharmacother. 2020, 128, 110120.

Flanagan, M. The Physiology ofWound Healing. J. Wound Care 2000, 9, 299–300.

Gallagher, J.; Gray, M. Is Aloe vera Effective for Healing ChronicWounds? J. Wound Ostomy Cont. Nurs. Off. Publ. Wound Ostomy Cont. Nurses Soc. 2003, 30, 68–71.

Getie, M.; Gebre-Mariam, T.; Rietz, R.; Neubert, R.H.H. Evaluation of the Release Profiles of Flavonoids from Topical Formulations of the Crude Extract of the Leaves of Dodonea Viscosa (Sapindaceae). Die Pharmazie 2002, 57, 320–322.

Ghomi, E.R.; Shakiba, M.; Ardahaei, A.S.; Kenari, M.A.; Faraji, M.; Ataei, S.; Kohansal, P.; Jafari, I.; Abdouss, M.; Ramakrishna, S.Innovations in Drug Delivery for Chronic Wound Healing. Curr. Pharm. Des. 2022, 28, 340–351.

Ghorbani, A.; Esmaeilizadeh, M. Pharmacological Properties of Salvia officinalis and Its Components. J. Tradit. Complement. Med. 2017, 7, 433–440.

Goldman, R. Growth Factors and Chronic Wound Healing: Past, Present, and Future. Adv. Skin Wound Care 2004, 17, 24–35.

Greenhalgh, D.G. The Role of Apoptosis in Wound Healing. Int. J. Biochem. Cell Biol. 1998, 30, 1019–1030.

Gupta, N.; Jain, U. Prominent Wound Healing Properties of Indigenous Medicines. J. Nat. Pharm. 2010, 1, 2.

Güzel, S.; Özay, Y.; Kuma¸s, M.; Uzun, C.; Özkorkmaz, E.G.; Yıldırım, Z.; Ülger, M.; Güler, G.; Çelik, A.; Çamlıca, Y.; et al. Wound Healing Properties, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Salvia Kronenburgii Rech. f. and Salvia Euphratica Montbret, Aucher & Rech. f. Var. Euphratica on Excision and Incision Wound Models in Diabetic Rats. Biomed. Pharmacother. Biomed. Pharmacother. 2019, 111, 1260–1276.

Hart, J. Inflammation. 1: Its Role in the Healing of Acute Wounds. J. Wound Care 2002, 11, 205–209.

Hassan, A. Curcuma Longa, Turmeric: A Monograph. Aust. J. Med. Herbal. 2006, 18, 66–76.

Hormozi, M.; Assaei, R.; Boroujeni, M.B. The Effect of Aloe vera on the Expression of Wound Healing Factors (TGF 1 and BFGF) in Mouse Embryonic Fibroblast Cell: In Vitro Study. Biomed. Pharmacother. Biomed. Pharmacother. 2017, 88, 610–616.

Janis, J.E.; Harrison, B.Wound Healing: Part I. Basic Science. Plast. Reconstr. Surg. 2014, 133, 199e–207e.

John, R.; Jan, N. Calendula officinalis—An Important Medicinal Plant with Potential Biological Properties. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. 2017, 93.

Karimzadeh, S.; Farahpour, M.R. Topical Application of Salvia officinalis Hydroethanolic Leaf Extract ImprovesWound Healing Process. Indian J. Exp. Biol. 2017, 55, 98–106.

Labib, R.M.; Ayoub, I.M.; Michel, H.E.; Mehanny, M.; Kamil, V.; Hany, M.; Magdy, M.; Moataz, A.; Maged, B.; Mohamed, A. Appraisal on theWound Healing Potential of Melaleuca Alternifolia and Rosmarinus officinalis L. Essential Oil-Loaded Chitosan Topical Preparations. PLoS ONE 2019, 14, e0219561.

Lawrence, W.T. Physiology of the Acute Wound. Clin. Plast. Surg. 1998, 25, 321–340.

Li, J.; Chen, J.; Kirsner, R. Pathophysiology of Acute Wound Healing. Clin. Dermatol. 2007, 25, 9–18.

Long, V. Aloe vera in Dermatology—The Plant of Immortality. JAMA Dermatol. 2016, 152, 1364.

Lopes, G.C.; Sanches, A.C.C.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Hernandes, L.; de Mello, J.C.P. Influence of Extracts of Stryphnodendronpolyphyllum Mart. and Stryphnodendron obovatum Benth. on the Cicatrisation of Cutaneous Wounds in Rats. J. Ethnopharmacol. 2005, 99, 265–272.

Maver, T.; Maver, U.; Stana Kleinschek, K.; Smrke, D.M.; Kreft, S. A Review of Herbal Medicines in Wound Healing. Int. J. Dermatol. 2015, 54, 740–751.

Med. Surg. 1991, 8, 723–756.

Mehta, P.; Shah, R.; Lohidasan, S.; Mahadik, K.R. Pharmacokinetic Profile of Phytoconstituent(s) Isolated from Medicinal Plants—A Comprehensive Review. J. Tradit. Complement. Med. 2015, 5, 207–227.

Memarzia, A.; Khazdair, M.R.; Behrouz, S.; Gholamnezhad, Z.; Jafarnezhad, M.; Saadat, S.; Boskabady, M.H. Experimental and Clinical Reports on Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Immunomodulatory Effects of Curcuma Longa and Curcumin, an Updated and Comprehensive Review. BioFactors Oxf. Engl. 2021, 47, 311–350.

Nicolaus, C.; Junghanns, S.; Hartmann, A.; Murillo, R.; Ganzera, M.; Merfort, I. In Vitro Studies to Evaluate the Wound Healing Properties of Calendula officinalis Extracts. J. Ethnopharmacol. 2017, 196, 94–103.

Oliveira, R.N.; Mancini, M.C.; de Oliveira, F.C.S.; Passos, T.M.; Quilty, B.; Thiré, R.M.d.S.M.; McGuinness, G.B. FTIR Analysis and Quantification of Phenols and Flavonoids of Five Commercially Available Plants Extracts Used in Wound Healing. Matér. Rio Jan. 2016, 21, 767–779.

Ovais, M.; Ahmad, I.; Khalil, A.T.; Mukherjee, S.; Javed, R.; Ayaz, M.; Raza, A.; Shinwari, Z.K.Wound Healing Applications of Biogenic Colloidal Silver and

Gold Nanoparticles: Recent Trends and Future Prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018, 102, 4305–4318.

Parente, L.M.L.; de Lino Júnior, R.S.; Tresvenzol, L.M.F.; Vinaud, M.C.; de Paula, J.R.; Paulo, N.M. Wound Healing and Anti- Inflammatory Effect in Animal Models of Calendula officinalis L. Growing in Brazil. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2012, 2012, e375671.

Patrulea, V.; Ostafe, V.; Borchard, G.; Jordan, O. Chitosan as a Starting Material forWound Healing Applications. Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV 2015, 97, 417–426.

Perry, N.B.; Anderson, R.E.; Brennan, N.J.; Douglas, M.H.; Heaney, A.J.; McGimpsey, J.A.; Smallfield, B.M. Essential Oils from Dalmatian Sage (Salvia officinalis L.): Variations among Individuals, Plant Parts, Seasons, and Sites. J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 2048–2054.

Purna, S.K.; Babu, M. Collagen Based Dressings—A Review. Burns J. Int. Soc. Burn Inj. 2000, 26, 54–62.

Ramasastry, S.S. AcuteWounds. Clin. Plast. Surg. 2005, 32, 195–208.

Raškovic´, A.; Milanovic´, I.; Pavlovic´, N.; C´ ebovic´, T.; Vukmirovic´, S.; Mikov, M. Antioxidant Activity of Rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) Essential Oil and Its Hepatoprotective Potential. BMC Complement. Altern. Med. 2014, 14, 225.

Roberts, D.B.; Travis, E.L. Acemannan-Containing Wound Dressing Gel Reduces Radiation-Induced Skin Reactions in C3H Mice. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 1995, 32, 1047–1052.

Sánchez-Machado, D.I.; López-Cervantes, J.; Sendón, R.; Sanches-Silva, A. Aloe vera: Ancient Knowledge with New Frontiers. Trends Food Sci. Technol. 2017, 61, 94–102.

Shafeie, N.; Naini, A.T.; Jahromi, H.K. Comparison of Different Concentrations of Calendula officinalis Gel on CutaneousWound Healing. Biomed. Pharmacol. J. 2015, 8, 979–992.

Sharifi, S.; Hajipour, M.J.; Gould, L.; Mahmoudi, M. Nanomedicine in Healing ChronicWounds: Opportunities and Challenges. Mol. Pharm. 2021, 18, 550–575.

Shetty, N.P.; Jørgensen, H.J.L.; Jensen, J.D.; Collinge, D.B.; Shetty, H.S. Roles of Reactive Oxygen Species in Interactions between Plants and Pathogens. Eur. J. Plant Pathol. 2008, 121, 267–280.

Shi, C.; Wang, C.; Liu, H.; Li, Q.; Li, R.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Shao, Y.; Wang, J. Selection of Appropriate Wound Dressing for Various Wounds. Front. Bioeng. Biotechnol. 2020, 8, 182.

Skover, G.R. Cellular and Biochemical Dynamics of Wound Repair. Wound Environment in Collagen Regeneration. Clin. Podiatr.

Tadi´c, V.; Arsi´c, I.; Zvezdanovi´c, J.; Zugi´c, A.; Cvetkovi´c, D.; Pavkov, S. The Estimation of the Traditionally Used Yarrow (Achillea millefolium L. Asteraceae) Oil Extracts with Anti-Inflamatory Potential in Topical Application. J. Ethnopharmacol. 2017, 199, 138–148.

Tejada, S.; Manayi, A.; Daglia, M.; Nabavi, F.S.; Sureda, A.; Hajheydari, Z.; Gortzi, O.; Pazoki-Toroudi, H.; Nabavi, M.S.Wound Healing Effects of Curcumin: A Short Review. Curr. Pharm. Biotechnol. 2016, 17, 1002–1007.

Thangapazham, R.L.; Sharad, S.; Maheshwari, R.K. Skin Regenerative Potentials of Curcumin. BioFactors Oxf. Engl. 2013, 39, 141–149.

Topçu, G. Bioactive Triterpenoids from Salvia Species. J. Nat. Prod. 2006, 69, 482–487.

Umasankar, K.; Nambikkairaj, B.; Backyavathy, D.M. Effect of Topical Treatment of Rosmarinus Officinalis Essential Oil on Wound Healing in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. Nat. Environ. Pollut. Technol. 2012, 11, 5.

Vanwijck, R. Biologie Chirurgicale de La Cicatrisation. Bull. Mém. Acad. R. Méd. Belg. 2001, 156, 175.

Velnar, T.; Bailey, T.; Smrkolj, V. TheWound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. J. Int. Med. Res. 2009, 37, 1528–1542.

Vitalini, S.; Beretta, G.; Iriti, M.; Orsenigo, S.; Basilico, N.; Dall'Acqua, S.; Iorizzi, M.; Fico, G. Phenolic Compounds from Achillea millefolium L. and Their Bioactivity. Acta Biochim. Pol. 2011, 58, 203–209.

Wahedi, H.M.; Jeong, M.; Chae, J.K.; Do, S.G.; Yoon, H.; Kim, S.Y. Aloesin from Aloe vera Accelerates Skin Wound Healing by Modulating MAPK/Rho and Smad Signaling Pathways in Vitro and in vivo. Phytomed. Int. J. Phytother. Phytopharm. 2017, 28, 19–26.

Wang, M.; Li, J.; Rangarajan, M.; Shao, Y.; LaVoie, E.J.; Huang, T.-C.; Ho, C.-T. Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (Salvia officinalis). J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 4869–4873.

Witte, M.B.; Barbul, A. General Principles ofWound Healing. Surg. Clin. N. Am. 1997, 77, 509–528.

Yamao, M.; Naoki, H.; Kunida, K.; Aoki, K.; Matsuda, M.; Ishii, S. Distinct Predictive Performance of Rac1 and Cdc42 in Cell Migration. Sci. Rep. 2015, 5, 17527.

Young, A.; McNaught, C.-E. The Physiology ofWound Healing. Surg. Oxf. 2011, 29, 475–479.

Zhang, L.; Tizard, I.R. Activation of a Mouse Macrophage Cell Line by Acemannan: The Major Carbohydrate Fraction from Aloe vera Gel. Immunopharmacology 1996, 35, 119–128.

Zohra, T.; Ovais, M.; Khalil, A.T.; Qasim, M.; Ayaz, M.; Shinwari, Z.K. Extraction Optimization, Total Phenolic, Flavonoid Contents, HPLC-DAD Analysis and Diverse Pharmacological Evaluations of Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants. Nat. Prod. Res. 2019, 33, 136–142.

BÖLÜM 16

TRİCHOMONAS VAGINALIS VE EPİDEMİYOLOJİSİ

Dr. Türkan Mutlu YAR[1]

[1]İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı, Malatya/Türkiye. muyluyarr@gmail.com, Orcid ID: 0000-0002-7145-7476

GİRİŞ

Trichomonas vaginalis, toplumların büyük çoğunluğunda görülebilen, ürogenital sisteme yerleşerek insanları etkileyen, genelde kadınlarda semptomatik erkeklerde ise çoğunlukla semptomsuz ilerleyen bir parazitozdur.

Tek konağı insan olan bu parazitozun kadında vagina ve üretraya erkekte ise prostat, epididim ve üretraya yerleşerek oluşturduğu infeksiyona trichomoniosis adı verilir.

TARİHÇE

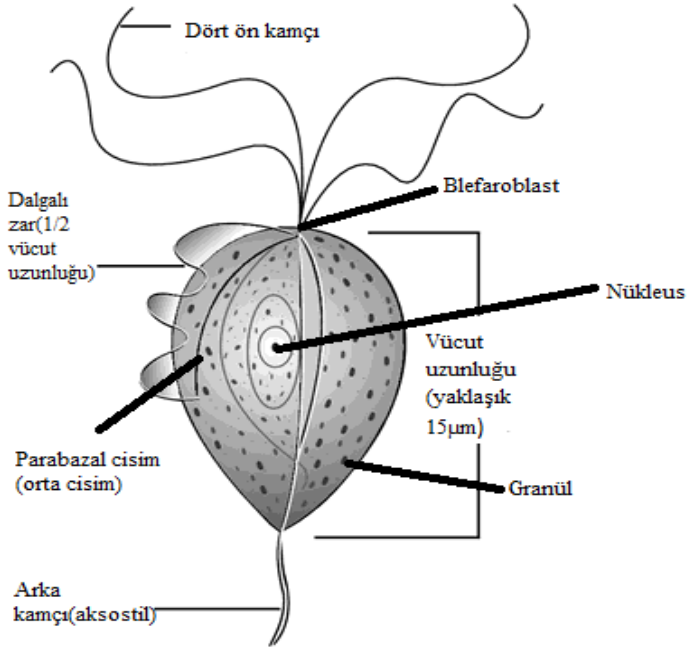
T.vaginalis'in, ilk klinik izolatı 1836 yılında Donne tarafından vaginal akıntıdan elde edilmiş ve isim olarak da Trico - monas ismini vermiştir, 1838 yılında ise Ehlrenberg tarafından bu isim değiştirilip şimdi kullandığımız *Trichomonas vaginalis* ismi kullanılmıştır. 1868 yılında bu parazitin idrar yolu tutulumuna sebep olduğu Salisbury tarafından rapor edilirken daha sonraki yıllarda *T. vaginalis* ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. *T. vaginalis*'in erkek hastaların genital sisteminde de olduğu, bu parazitin vaginit etkeni olduğu ayrı ayrı bilim adamları tarafından rapor edilmiştir. 1917 yılında Lynch *T.vaginalis*'in ilk kültürünü gerçekleştirilmiştir. 80'li yıllarda artık bilim adamları parazitin immonoloji, patonogenezini belirlemek amacıyla immünolojik ve moleküler teknikler uygulamaya başlamışlardır (Shafir, 2006).

SINIFLANDIRMA

Phylum (Alem): Protozoa
Class (Sınıf): Zoomastigophora
Subclass (Altsınıf): Mastigophora
Order (Takım): Trichomonadida
Family (Aile): Trichomonadidae
Genus (Cins): Trichomonas
Species (Tür): *Trichomonas vaginalis*

MORFOLOJİ

Trichomonas vaginalis'in evrim döneminde sadece trofozoit şekli vardır. Kist şekli bulunmamaktadır. Trofozoit şekli oval, armut şeklinde 10-20 (8-30) um boyunda ve 7(5-15) um enindedir. Kamçıları ve dalgalanan zar ile boyuna ekseni etrafında dönerek hareket ederler.



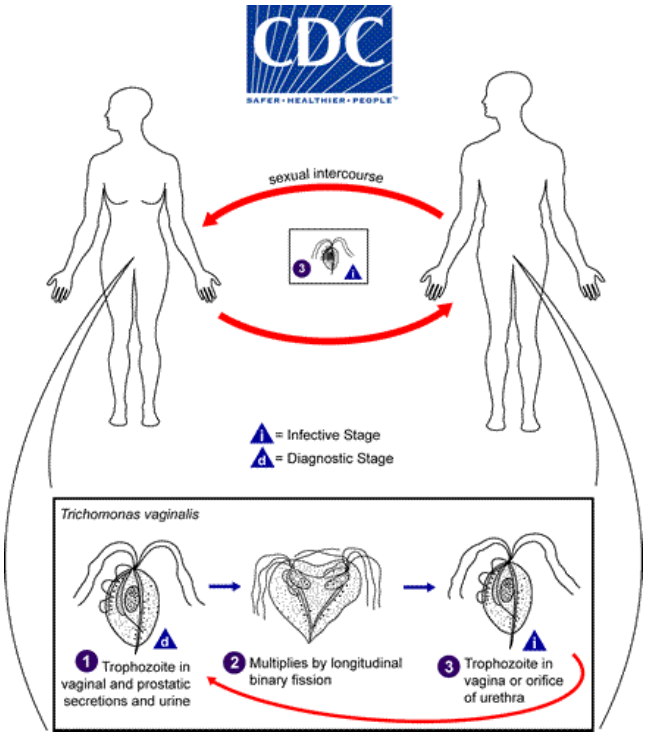
Şekil 1:*T.vaginalis*'in Şematik görüntüsü (Unat ve ark,1991)

Trofozoit büyük bir nükleusa sahiptir ve nükleusun içinde ince granüllü kromatin tanecikleri dağılmıştır. Nukleusa yaslanmış gibi duran kromatin taneciklerine bleforoplast adı verilmektedir. Kromatin taneciklerinin her birinden kamçı denilen uzantılar çıkar ve sayıları 4 tanedir. Beşinci kamçı olarak adlandırılan dalgalı zar ise trofozoitin membranı boyunca aşağı doğru trofozoitin sivri ucuna varmadan membranın üçte biri boyunda sonlanmaktadır. Dalgalanan zarın bir tarafı Kosta denilen bir organele bitişik olup diğer tarafı serbest haldedir. Parazitin sivri ucundan çıkan mikrotubuler yapıya aksostil adı verilmiştir ve bunlar vücudun sabit görünmesine neden olan yapılardır. Nukleus ve dalgalı zar arasında parabazal cisim ve kenarında lif bulunmaktadır. Mitokondri anoloğu olan ve kosta ile aksostil etrafında daha çok görülen hidrogenozomlar bulunur. Bunlar parazitin karbonhidratları parçalanmasını sağlar ve 'adenosintri fosfat' (ATP) oluşumunda rol alır (Unat ve ark,1991; Polat ve ark,2011). *T. vaginalis* ikiye bölünerek çoğalmakta ve oluşan *T.vaginalis*'te ikişer tane kamçı vardır, dalgalı zar, kosta ve parabazal cisim bir

hücre tarafında kalırken, nukleus ve bleferoplast ikiye bölünüp parazitteki eksik olan yapıları tamamlamaktadır (Özcel ve ark, 2007). Kadınlarda vajinanın pH'ı 3,8-4,4 arasında değişmektedir. *Trichomonas vaginalis* enfeksiyonlarında pH'ın, 6,5 ve üstü olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda vajen ortamındaki bakterilerin azalıp kaybolduğu, lökositler, epitel hücreleri ve kokların arttığı bildirilmektedir (Donders, 2007).

EVRİM

T. vaginalis'in tek konağı insan olduğundan monoksen bir parazittir. Konak zinciri insan – insan- insan olarak uzanır. *T. vaginalis*'in daha önce yapılan deneylerde sıçan ve kobayların vaginaların da yaşamlarını sürdürdükleri rapor edilmiştir. *T. vaginalis*'in kist şekli olmadığından bulaşım trofozoit şekli ile olmaktadır. Bazen hastaların hiçbir klinik bulgusu yoktur, bu tarz hasta insanlar taşıyıcı olarak hastalığı yaymaktadır (Polat ve ark, 2011).



Şekil 2: *Trichomonas vaginalis* evrim döngüsü
https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html

T. vaginalis'te kaynak enfekte kadın ve erkek olup bulaşma genel olarak cinsel ilişki ile olur, nadir olarak ise kontamine nemli bezler, çamaşırlar, klozetler, tuvalet kağıtları, medikal özellikle kadın doğum aletleri, ortak kullanılan havuz, şezlong, havluile bulaş mümkün olmaktadır. Trofozoitler dış şartlara karşı dayanıklı değillerdir. İdrarda 24 saat canlı kalabilmekte, suda ise 1 saat içinde ölmektedirler *T. vaginalis* trofozoitlerinin tuvalet kağıdında 1.5-48 saat, pamuklu bezde 1-5 saat, klozet, pens ve spekulumda 4-6 saat, kuyu ve şebeke suyunda 16 saat canlı kaldığı bildirilmiştir (Karaman ve ark, 2004). Bu parazitin doğum sırasında anneden bebeğe geçebildiği bildirilmiş ve enfekte annenin küçük kız çocuğunu kucağına alıp yıkarken de bulaşma olabileceği iddia edilmiştir (Carter ve ark, 2008). Bu parazitte erkekler hastalık asemptomatik seyrettiği için çoğunlukla taşıyıcı rolü oynarlar. Trichomoniosis taşıyan enfekte bir kişi ile cinsel ilişkiye giren sağlam insan parazitoza yakalandıktan sonra cinsel ilişkiye girdiği kişiye paraziti bulaştırabilecek duruma gelir ve döngü yeniden başlar (Kulda ve ark, 1970).

EPİDEMİYOLOJİ

Ülkemizde trichomoniosis yayılımına yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Çalışmalar gerek yaygınlığı gerekse daha çok semptom verdiği bilindiği için genel olarak kadınlarda nadiren erkek hastalar üzerinde yapılmıştır. Sosyal yaşantısı iyi olmayan, genelevlerde çalışan ve hamile kadınlarda bu hastalığın yaygın olduğu belirtilmiştir (Özcel ve ark, 2007).

Trichomoniosis, Dünya Sağlık Örgütünün cinsel yolla geçebilen ve viral olmayan enfeksiyon hastalıkları içerisinde ilk sırada yer alır. DSÖ tarafından 2008 yılında tüm dünyada yaklaşık 276 milyon olgu olduğu bildirilmiştir (Sönmez C ve ark, 2018). DSÖ' nün 2016 yılında yayınladığı raporda, *T. vaginalis* kaynaklı enfeksiyonlarının 156 milyon olduğu rapor edilmiştir. Ülkemizde ise bu pozitiflik oranı%3.9-4 arasında değişmektedir (Özel ve ark, 2022). DSÖ'nün 2019 daki verilerine göre ise her yıl yaklaşık 250 milyon *T.vaginalis* enfeksiyonu saptanmakta bununda yarısından fazlasının erkeklerde görüldüğü rapor edilmiştir. Fakat ayrı zamanda görülen vakaların %89'unun kadınlar arasında bulunduğu bildirilmiştir (WHO, 2019).

Dünyada yapılan bazı çalışmalarda kadın mahkumlarda ve yoksul kadınlarda %61-62 oranında trichomoniosis saptanmış, hamile kadınlarda ise %10-42.7 arasında bir pozitiflik bulunmuştur ve aynı çalışmada hamile

olmayan kadınlarda bu hastalığın daha az rastlanıldığı bilgisi verilmiştir (Herbst ve ark,1960). Amerika Birleşik Devletleri'nde 'Center for Diseases Control '(CDC) 2000 yılında sadece Amerika da trichomoniosis için yılda 8 milyon yeni olgu görüldüğü rapor edilmiştir. Gelişmekte olan ülkelerde viral olmayan vaginal hastalıklarda %40 oranında yaygın olduğu ve en fazla görüldüğü ülkeler ise Güney Afrika, Yeni Girne ve Bengladesh olarak bildirilmiştir. Erkeklerde yapılan çalışmalarda *T.vaginalis* 261 erkekte PZR ile 177 (%71.7) olarak bulunmuştur(Sena AC ve ark,2007). Bir diğer çalışmada Hanyang Üniversitesi Üroloji polikliniğine gelen 33 erkek hastada yapılan çalışmada PZR yöntemi ile 7(%21.2)lik pozitiflik kaydedilmiştir (Lee ve ark, 2012). Başka bir çalışmada yine erkeklerde PZR yöntemi ile %17, kültür yöntemi ile %5 hasta pozitif bulunmuştur (Schwebke ve ark, 2002).

Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda ise Ege bölgesinde yapılan bir çalışmada %25.7 oranında trichomoniosisli kadın tespit edilmişken, aynı bölgedeki başka bir çalışmada 18-54 yaş arasında kadınlarda bu oran %71 olarak bildirilmiştir. Manisada yapılan bir çalışmada vaginal akıntılı kadınlarda %4,7 oranı bulunmuştur (Demirel, 1972; Östan ve ark, 2005). İzmir'de bu hastalığın yaygınlığını belirlemek için yapılan bir çalışmada vaginal akıntıya sahip 1613 kadından 248(%15.37)'inin trichomoniosis olduğu tespit edilmiştir (Yazar ve ark, 2002). İstanbul'da Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde Kadın hastalıkları doğum kliniğine akıntı problemi ile başvuran 223 hastanın %41'inde trichomoniosise rastlanılmıştır (Ersoy, 1971). Ankara'da yapılan bir çalışmada genel evde çalışan kadınlar arasında %4.9 *T.vaginalis* pozitifliğine rastlanıldığı rapor edilmiştir (Aral ve ark, 2003). Erkekler üzerinde yapılan çalışmalarda ise 1492 örnek incelenen çalışmada 3 erkek hastada (%0.2) *T.vaginalis* trofozoitleri saptanmıştır(Üstün ve ark, 2004). Çetin ve ark. yaptığı çalışmada erkeklerde %4-9 arasında trichomoniosis bulunmuş, Özbilgin ve ark. ise erkeklerle yaptıkları çalışmada bu oranı %12 olarak bulmuşlardır. Merdivenci ve ark. %20 olarak rapor etmiştir (Merdivenci, 1981- Özbilgin ve ark, 1992). Çulha ve ark üretritli erkeklerde yaptıkları çalışmada 110 idrar numunesi çalışmışlar ve %2.7 pozitiflik saptamışlardır (Çulha ve ark, 2008). Yar ve ark. ise 138 erkek hastadan alınan örnekte nested PZR yöntemi ile 9(%6.5) hastada pozitiflik bulmuşlardır ve pozitif bulunan hastalar ile idrar yolu enfeksiyonu arasındaki ilişkide istatiksel olarak anlamlı bir farklılık oluğunu tespit etmişlerdir (Yar, 2015).

Patojenite ve Klinik Belirtiler

Trichomoniosis, cinsel yolla bulaşan ve tedavi edilebilen bir hastalık olup, insanlar için patojen olduğu ve hastalık oluşturabileceği bildirilmektedir (Honiberg, 1978). Bu enfeksiyon kadınlarda %85 oranında erkeklerde de %77 oranında semptomatik seyretmekte, asemptomatik hastalar altı aylık süreçte semptomatik hale gelmektedir (Petrin ve ark, 1998). *T.vaginalis* gerekli enerjiyi vagina epitelyum hücrelerinden ve genital sistemden alır ve gelişebilmek için vagina florasını bozarak glikojene ihtiyacı olan Lactobacillus acidophilus bakterilerinin üremesini olumsuz etkiler, bu sebeple normalde asit olan vagina pH derecesi alkaliye doğru yükselir ve vagina mukozasında yangı oluşturarak *T.vaginalis*'in üremesi için gerekli şartları sağlamaktadır. Bu tabloya vajinit de denilmektedir (Kulda ve ark, 1970).

Kadınlarda infeksiyon vulvit, üretrit, sistit, endometrit, peritonite sebep olabilmekte ve vaginal bölgede pis kokulu sarı ya da yeşil renkte akıntı, vulvada tahriş, vagina kaşıntısı ve karın ağrısı görülebilmektedir. Erkeklerde ise genelde hiç semptom görülmez, genelde taşıyıcı rol oynarlar, bazen de penisten gelen bir iki damla akıntıya sebep olan üretrit, prostalit ve epididimit görülebilmektedir(McLaren ve ark, 1983). 1983 yılında yapılan bir çalışmada ise *T.vaginalis*'in yeni doğan bebeklerde pnömoniye sebep olabileceği bildirilmiştir (Özcel ve Zeyrek, 2007). Parazitle enfekte kadınların %2 sinde *T.vaginalis*'e özgü olan vagina mukozasının ağaç çileği (Strawberry cervix) manzarasındaki görüntüsü görülmektedir, %12 sinde ise sulu mukuslu, krem kıvamında, yeşil, pis kokulu ve köpüklü akıntı görüldüğü bildirilmiştir (Shafir, 2006).

TANI

Trichomoniosis, bazen hiç semptom vermez bazen de klinik semptomları diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklarla karışabilmektedir. Bu yüzden en doğru tanı yöntemi etkenin kendisini görebilmektir. Vaginal akıntının alınması bazen çok zor olduğu için idrar sedimenti de tanı da kullanılmaktadır. Erkekte ise prostat masajı ile elde edilen akıntı tanı için kullanılabilmektedir. Kadınlarda vaginal akıntı alınması spekulumla vagina açılır ve arka forniksten steril bir eküvyonyada pipetle akıntı alınmaktadır (Özcel ve Zeyrek, 2007).

Tanı direkt ve indirekt yöntemlerle yapılabilir.

Direkt Mikroskobik inceleme: Vaginal akıntı, idrar sedimenti, prostat akıntısı gibi örneklerden birer damla alınarak bir damla serum fizyolojik ile karıştırılıp üzerine lamel kapatarak mikroskopta incelenmektedir. Hareketsiz trofozitleri tekrar harekete geçirebilmek için preparat üzerine bir damla %5lik para-amino-salisilik asit damlatılması önerilmektedir. Direkt mikroskobi incelenmesinde duyarlılık %40-70 olarak bildirilmiştir (Stemmer,2012).

Boyama: Örnekler yayma yapılıp tespit edildikten sonra Giemsa boyası ile boyama yapılıp immersiyon objektifi ile incelenmektedir. Giemsa dışında May Granland, Gram ve Papanicalaou boyama yöntemleri kullanılabilmektedir. Boyalı preparatlarda parazitin kamçıları, nukleus, bleforoplast, aksostil ve dalgalı zarı görülerek parazitin trofozoit hali kolayca tanınabilir (Thomason ve ark, 1988).

Kültür: Kültür yöntemi bu parazit için altın standart olarak kabul edilmektedir. Çeşitli besiyerlerinde parazitlerin üreyebilmesi için en uygun 37°C olup, parazitler en erken 9-12 saatte çoğalabilmektedir (Özcel ve Zeyrek, 2007).

T.vaginalis kültürleri yapılırken, Modifiye Diaomond (MD), Laktoz, Sistein, Karaciğer tozu ekstresi, Maltoz(CPLM) besiyeri, Tripticase-Yeast Extract Maltose (TYM) ve VF Diaomond besiyerleri kullanılmaktadır. Bu yöntemin duyarlılığı %95'lere ulaşmaktadır (Özcel ve Zeyrek,2007).

Özel ve ark. yaptıkları bir çalışmada mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan dört farklı besiyerleri ile *T.vaginalis* üretmeyi amaçlamışlar, Tıyoglukolat besiyeri(THIO), brainheartinfusion besiyeri(BHI), tryptic soya broth besiyeri(TSB) ve Brucella Broth besiyeri(BRB) olmak üzere dört farklı besiyeri tercih etmişler ve referans olarakda TYM besiyerini kullanmışlardır. Sonuç olarak kullanılan besiyerlerin *T.vaginalis*'in üreme potansiyelinin TYM besiyeri ile kıyaslanabilir olduğunu rapor etmişlerdir (Özel ve ark, 2022).

Serolojik Testler: *T. vaginalis*'in tanısında çok nadir kullanılan bir yöntemdir. Çeşitli yöntemlerle hazırlanan antijen ve insan serumundaki antikorları aramak için İndirek hemaglutinasyon (IHA), İndirek Flüoresan

antikor testi(IFAT), Direk Flüoresan antikor testi (DFAT) ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kullanılan testlerdir (Özcel ve Zeyrek,2007).

Hızlı Tanı Kitleri: Bazı bilim adamları Trichomonas antijenlerini veya nükleik asitlerini aramaya yönelik testler geliştirmişlerdir ve bu testler 10-60 dakika da sonuç verebilen testlerdir (Hobbs ve Sena,2013).

Nükleik asit taraması için yapılan AffirmVPII (Becton Dickinson, ABD), Antijenlere yönelik yapılan OSOM Trichomonas Rapid Test (Sekisui Diagnostics, ABD) ve Kalon TV Lateks Aglutinasyon testi (Kalon Biologica, İngiltere) kullanılmaktadır. Bu tanı kitlerinin duyarlılığı %40-95 arasında değişmekte, fakat seçicilikleri %92-100 arasında yüksektir (Suud ve Kapil,2008).

Moleküler Testler: Moleküler tanı yöntemleri arasında en bilineni PZR'dır. Bu yöntem sayesinde, parazitin genetik tiplendirmesi, karakterizasyonu, tanınması, klinik teşhisi yapılabilmektedir (Monis ve ark, 2002). PZR yönteminin duyarlılığı ve seçiciliği oldukça yüksektir ve parazitin tanısına rekombinant teknoloji ile aşı geliştirmesine, immunoloji ve konak parazit etkilerinin araştırılmasına, sekans analizlerine olanak sağlamaktadır.

TEDAVİ

Trichomoniosis tedavisinde mutlaka eşlerin birlikte tedavi edilmesi gerekmektedir. Tedavide etkin olan ilaçlar nitroimidazol türevi ilaçlardır. Metronidazole, Trichomoniosis için standart en yaygın kullanılan ilaçtır. Bu tedavide 250 mglık tabletlerden günde 3 kere verilerek 7 günlük tedavi sürecinin başarılı olduğu bildirilmiştir (Polat ve ark, 2011).

Metronidazol parazite difüzyon yoluyla penetre olur ve hücre içinde serbest radikallere dönüşüp hücre DNA'sına bağlanmaktadır. DNA replikasyonu ilaç sayesinde duracağından hücre ölümleri meydana gelebilmektedir (Aksoy ve Özkoç, 2005). Metronidazol'un yan etkileri ve tedavisinin uzun sürmesi sebebi ile bazen yerine Seknidazol, tinidazol ve ornidazol da kullanılmaktadır. Seknidazol için 500 grlık tabletlerden tek doz 4 adet (2 gr) alındığı takdirde 3 saat sonra en yüksek değere ulaşmaktadır (Özcel ve Zeyrek, 2007). Bir çalışmada Amfoterisin B türevi olan ve Hindistanda kullanılan hamisin denilen organik bileşiğin metronidazol dirençli olgularda

etkili olduğu bildirilmiştir (Aksoy ve Özkoç, 2005). Tedavi gerçekleştikten 3 ay sonra hastalar kontrol edilmelidir.

KAYNAKÇA

Aksoy, Ü., Özkoç, S. (2005). Barsak ve genital protozoon hastalıklarında tedavi. Tıbbi Parazitolojide Tedavi. Akısü, Ç., Korkmaz, M. (Ed). (33-51) içinde İzmir, Tıbbi Parazitoloji Derneği Yayınları, No:20

Aral,Akarsu, G., Çelik,T., Güngör, Ç.,Altıntaş, K.. (2003). Ankara'da çalışan genel ev kadınlarında *T.vaginalis* sıklığı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 27: 252-54.

Carter, J.E., Whithaus, K.C. (2008). Neonatal respiratory tract involvement by *Trichomonas vaginalis*: a case report and review of the literature. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78(1), 17-9

Çulha, G., Görür, S., Helli A., Akçin, S., Kiper, A.N. (2008). Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Üroloji polikliniğine başvuran üretritli erkek olgularda *T.vaginalis* sıklığı. *TürkHijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* 65(1): 37-41.

Demirel, E. (1972). *T.vaginalis* ile mast hücresi ile ilişkisi. Doktora tezi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı.

Donders, G.G. (2007). Definition and classification of abnormal vaginal flora. Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology. 21(3), 355-373.

Ersoy, C. (1971). Aile huzur ve ekonomisini etkileyen mikro parazit (T.vaginalis). Dirim, 46(12)545-48.

Hobbs, M.M., Sena, A.C. (2013). Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. Sex Transm Infect. 89(6), 434-438

Honiberg, B.M. (1978). Trichomonas of importance in human medicine. Parasitic Protozoa. Kraiger, JP., (Ed.) (275-454) içinde Academic Press. New York.

Karaman, Ü., Atambay, M., Aycan, ÖM., Daldal, N. (2004). *Trichomonas vaginalis*'in çeşitli ortamlarda ve farklı ısılarda yaşam süresi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 28(1), 18-20.

Karaman, Ü., Atambay, M., Yazar, S., Daldal, N. (2006). Kadınlarda *Trichomonas vaginalis*'in çeşitli sosyal değişkenler açısından yaygınlığının incelenmesi (Malatya İli Örneği). *TürkiyeParazitoloji Dergisi* . 30(1), 11-15.

Kulda, J., Honiberg, BM., Frost, JK., Hollanber, DH. (1970). Pathogenicity of *T.vaginalis*, A clinical and biological study, *Am J Obstet Gynec* 108(6), 908-18.

Lee, JJ., Moon, HS., Lee, TY., Hwang, SH., Ahn, MH., Ryu, JS. (2012). PZR for diagnosis of male *T. vaginalis* infection with chronic prostatitis and urethritis. *Korean J Parasitol* 50(2):157-9.

McLaren, L., Davis, L., Healy, G., James, G. (1983). Isolation of *Trichomonas vaginalis* from the respiratory tract of infants with the respiratory diseases. *Pediatrics* 71: 888-90.

Merdivenci, A. (1981). Medikal Protozooloji. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi. Yay. No:80.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Saint,CP. (2002). Molecular biology techniques in parasite ecology. International *Journal for Parasitology.* 32, 551–562.

Östan, İ., Sözen, U., Limoncu, ME., Kilimcioğlu, M., Özbilgin, A. (2005). Manisa' da vaginal akıntılı kadınlarda *T. vaginalis* sıklığı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*.29:7-9.

Özbilgin, A., Nazlı, O., Özbel, Y., Tuzcuoğlu, Y., Özcel, MA., Mülazımoğlu, N .(1992). Erkeklerde nongonokoksik üretrit'de Trichomoniosis. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.*16:43-8.

Özcel, M.A., Zeyrek, FY.(2007). Trichomoniasis. Özcelin Tıbbi Parazit Hastalıkları. İzmir: Meta Basım. 431-437.

Özel, Y., Yılmaz, U., Ünlü, G., Özbilgin, A., Ünlü, M. (2022) Rutin Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında bulunan temel besiyerlerinde *T. vaginalis*'in üretilmesi. *Türkiye Parazitol.Derg.* 46(1):7-13.

Petrin, D., Delgaty, K.., Bhatt, R., Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis. Clinical Microbiology Reviews* l1(2), 300-317.

Polat, E., Sirekbasan, S., Yıldırım, Z., Bağdatlı, Y., Çepni, İ., Çift, T., Baltalı, N..D. (2011). İstanbul 'da kadın hastalıkları hastaları ile hayat kadınlarında *T.vaginalis* görülme sıklığının, 10 yıl önceki oranla karşılaştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* 35 : 68-71.

Schwebke, J.R., Lawing, L.F. (2002). Improved detection by DNA amplification of *Trichomonas vaginalis* in males. *J Clin Microbiol* 40(10):3681-3.

Sena, A.C., Miller, W.C., Hobbs, MM., Schwebke, JR., Leone, PA., Swygard, H., et al. (2007). *T.vaginalis* infection in male sexual partners : implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clin İnfect. Dis.* 1:44(1) 13-22.

Shafir, S.C. (2006). Diagnosis and viability of the sexually transmitted protozoal parasite *T. vaginalis* from the urine of men who have sex with men. Dissertation. University of California, Los Angeles.

Sönmez , C., Usluca, S. (2018). Ürogenital akıntısı olan olgularda: *Trichomonas vaginalis* sıklığı? *Flora.* 23(2): 79-83.

Stemmer, SM., Adelson, ME., Trama, JP., Dorak, MT., Mordechai, E. (2012). Detection Rates of *Trichomonas vaginalis*, in Different Age Groups, Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Lower Genital Tract Disease* 16(4), 352-357.

Suud, S., Kapil, A. (2008). An update on *Trichomonas vaginalis. Indian J Sex Transm Dis* 29, 7- 14.

Thomason, JL., Gelbert, SM., Bobun, JM., Schulien, MB., Hamilton, PR. (1988). Comparison of four methods to detection of *T. vaginalis. J.Clin. Microbiol* 26: 1869.

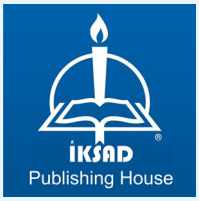
Unat, EK., Yücel, A., Altaş, K., Samastı, M. (1991). Unat'ın Tıp Parazitolojisi. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi. Yayın : 162.

Üstün, Ş., İlter, T. (2004). Gastroenteroloji kliniği idrar Laboratuvarına başvuran hastalarda *T.vaginalis* sıklığının araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* 28(2): 83-5.

WHO, (2008). Global incidence and prevalance of selected curable sexually transmitted infections. Erişim adresi: https://apps.who.int/iris/handle/10665/75181

Yar, M.T. (2015). *Erkek hastalarda Tichomoniosis tanısında PZR kullanımının etkinliğinin araştırılması* (Doktora tezi).İnönü Üniversitesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim dalı, Malatya.

Yazar, S., Dağcı, H., Aksoy, Ü., Üstün, Ş., Akısü, Ç., A.K, M., Daldal, N. (2002). İzmir de vaginal akıntılı kadınlarda *Trichomonas vaginalis* sıklığı. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 9: 159-61.





ISBN: 978-625-6380-16-5