

**T.C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ HASTALIĞINDA  
OKSİDATİF, NİTROZATİF VE GLİKOZATİF STRES  
DÜZEYLERİ**

**SERPİL ERŞAN**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. SEVTAP BAKIR**

**SİVAS-2016**

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi senatosunun 18.02.2015 tarih ve 4/4 sayılı kararına göre kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü tez yazım kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır. Bu tez çalışması, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No: T-639)



Canım Babam İbrahim ERŞAN'a, ruhun şad olsun...

## ÖZET

### KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ HASTALIĞINDA OKSİDATİF, NİTROZATİF VE GLİKOZATİF STRES DÜZEYLERİ SERPİL ERŞAN

**Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Sevtap BAKIR**

**2016, 76 Sayfa**

Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) kene üzerinde taşınan bir arbovirüs olan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsünün neden olduğu ve aniden başlayan yüksek ateş, şiddetli baş ağrısı, baş dönmesi, sırt ve karın ağrısıyla karakterize bir hastalıktır. KKKA patogenezi günümüzde halen tam olarak açığa kavuşturulmamıştır.

KKKA birçok yönden Sepsis ile benzerlik gösterir. Endotelyum enfeksiyonu Sepsis' de olduğu gibi, KKKA patogenezinde de önemli bir role sahiptir. Sepsis şiddetli oksidatif stres ve dengesiz oksidoredüksiyon reaksiyonları ile karakterizedir.

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) organizmalarda normal metabolik süreçlerin yan ürünleri olarak oluşmaktadır. ROS/RNS'nin aşırı üretimleri ve bunları ortadan kaldırmak için antioksidan savunma sistemlerinin kapasitesini aştığında, böyle bir dengesizlik hücrel bileşenlerin (DNA, proteinler, lipitler ve şeker), oksidatif/nitrosatif/glikosatif hasarına neden olabilir ve bu oksidatif/nitrosatif/glikosatif stres olarak adlandırılır. ROS/RNS kendileri çok reaktif ve çok kısa yarılanma ömrüne sahip olduğundan dolayı, doku ya da vücut sıvılarında bunların doğrudan saptanması genellikle pratik değildir. Bu nedenle oksitlenerek/nitrosatiflenerek değişmiş biyolojik örneklerdeki DNA, proteinler, lipitler ve şekerlerde, ROS/RNS'nin söz konusu olduğu hastalıklarda biyomarkırları tespit etmek gerekmektedir.

KKKA de oksidatif/nitrosatif/glikosatif stres biyomarkırlarının düzeylerinin incelenmesi, hastalığın seyir evrelerindeki durumlarının araştırılması, hastalığın patogenezi ve tedavisinde elde edilen sonuçlardan faydalanılması amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** KKKA (Kırım Kongo Kanamalı Ateşi), Oksidatif Stres, Nitrosatif Stres, Glikosatif Stres

## ABSTRACT

### OXIDATIVE, NITROSATIVE AND GLUCOSATIVE STRESS LEVELS IN CRIMEAN CONGO HEMORRHAGIC FEVER

Serpil ERŞAN

PhD Thesis, Department of Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Sevtap BAKIR

2016, 76 Pages

Crimean-congo hemorrhagic fever is a tick-borne disease caused by the arbovirus and characterized by a sudden onset of high fever, severe headache, dizziness, back and abdominal pains. The exact pathogenesis of CCHF has not been clarified yet.

CCHF shows similarity with sepsis in many aspects. The infection of endothelium plays an important role in the pathogenesis of CCHF and in sepsis. Sepsis is characterized by severe oxidative stress and imbalance in oxidoreduction reactions.

Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) occur as side products of normal metabolic processes. When the over produced ROS and RNS exceed the capacity of the defense mechanism which eliminates these metabolites, this can cause oxidative/ nitrosative/ glucosative?? damage of cell components and is called oxidative/ nitrosative/glucosative stress. Since the high reactivity and short half life of ROS/RNS, it is not practical to quantify these metabolites in tissues or body fluids. Therefore in diseases related with ROS/RNS, it is required to measure the levels of biomarkers of DNA, proteins, lipids and glucoses in altered biological samples with oxidation and nitrosation.

In this study we aimed to measure the levels of oxidative, nitrosative, glucosative stress biomarkers in CCHF and to investigate the relationship between these levels and the course of the disease. The results of this study may shed light into understanding of unclear pathogenesis of the disease and developing better treatment strategies.

**KEY WORDS:** Crimean-congo hemorrhagic fever, oxidative stress, nitrosative stress, glucosative stress

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalıőmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle her konuda destek veren, sonsuz anlayıőıyla rehber olan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sevtap BAKIR'a yureka dolusu teşekkür ederim.

Bu sureka bilgi, emek ve sabırla yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. V. Kenan ÇELİK'e, Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyeleri ve çalıőanlarına, çalışma grubunun oluőturulması sırasında katkı sunan Prof. Dr. Mehmet BAKIR ve Doç. Dr. Aynur ENGİN'e ve Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Lisans ve Lisansüstü eğitimimin her aőamasında tüm zor ve mutlu günlerimde yanımda olan, bana her konuda destek veren, yanımda olmaktan her zaman gurur duyduğum sevgili eőim Doç. Dr. E. Erdal ERŞAN'a, motivasyon ve sabırları için meleklerim S. Ezgi, S. Elçin ve Sanem Eylim ERŞAN'a, aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

“ **Kırım Kongo Kanamalı Ateş Hastalığında Oksidatif, Nitrozatif ve Glikozatif Stres Düzeyleri**” adlı **Doktora** Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Biyokimya** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

**Başkan**(Danışman) Prof.Dr. Sevtap BAKIR \_\_\_\_\_

Üye Doç.Dr.V.Kenan ÇELİK \_\_\_\_\_

Üye Doç.Dr. Aynur ENGİN \_\_\_\_\_

Üye Yrd.Doç.Dr.Hasan KILIÇGÜN \_\_\_\_\_

Üye Yrd.Doç.Dr.Z. Cansel ÖZMEN \_\_\_\_\_

#### ONAY

Bu tez çalışması, ..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zahid Tefik AĞAOĞLU  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MÜDÜRÜ

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	.viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi.....	4
2.1.1. Patogenez .....	5
2.1.2. Tanı ve Klinik Bulgular.....	5
2.1.3. Tedavi.....	6
2.2. Serbest Radikaller.....	6
2.2.1. Oksidatif ve Nitrozatif Stres.....	6
2.2.2. Serbest Radikaller.....	7
2.2.2.1. Serbest Radikal Reaksiyonları.....	8
2.2.3. Serbest Radikallerin Sınıflandırılması.....	9
2.2.4. Serbest Radikal Türleri.....	9
2.2.4.1. Süperoksit radikali.....	9
2.2.4.2. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	10
2.2.4.3. Hidroksil Radikali (OH <sup>•</sup> ) .....	11
2.2.4.4. Singlet O <sub>2</sub> ( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> ) .....	12
2.2.4.5. Karbon Merkezli Radikaller (R <sup>•</sup> ).....	12
2.2.5. Reaktif Nitrojen Türleri (NO, NO <sub>2</sub> , NO <sup>+</sup> , NO <sup>-</sup> ).....	12
2.2.5.1. Nitrik Oksitin Biyosentezi.....	13
2.2.5.2. Nitrik Sentaz (NOS) Enzimleri.....	14
2.2.5.3. Nitrik Oksitin Fonksiyonları.....	16
2.2.6. Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....	16
2.2.6.1. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....	16
2.2.6.2. Eksojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....	18
2.2.7. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri.....	19



2.2.7.1. Serbest radikallerin Lipitlere Etkileri.....	19
2.2.7.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	20
2.2.7.3. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri.....	20
2.2.7.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri.....	21
2.3. Oksidatif, Nitrozatif ve Glikozatif Stres ve Biyobelirteçler.....	21
2.3.1. Biyobelirteç.....	21
2.3.2. Oksidatif, Nitrozatif ve Glikozatif Stres Biyobelirteçleri.....	23
2.3.2.1. Protein Oksidasyon Nitrasyon Biyobelirteçleri.....	24
2.3.2.1.1. Protein Karbonil Grupları.....	24
2.3.2.1.2. Tirozinin Nitrasyonu.....	25
2.3.2.2. DNA Oksidasyon Nitrasyon Biyobelirteçleri.....	27
2.3.2.2.1. Hidroksi-2'-deoksiguanozin.....	27
2.3.2.2.2. 8-Nitroguanin.....	28
2.3.2.3. Lipit Oksidasyon, Nitrasyon Biyobelirteçleri.....	28
2.3.2.3.1. Malondialdehit (MDA).....	28
2.3.2.3.2. F2-İzoprostanlar.....	30
2.3.2.4. Şekerlerin Oksidatif Modifikasyonu:Gelişmiş Glikasyon Son Ürünleri (AGE).....	33
2.3.2.4.1. Glikozilasyon ve Glikasyon.....	33
2.3.2.4.2. Proteinlerin Glikasyonu.....	33
2.3.2.4.3. Lipitlerin Glikasyonu .....	36
2.3.2.4.4. Nükleik Asitlerin Glikasyonu.....	37
2.3.2.4.5. AGE'lerin Doku ve Hücre Düzeyinde Etkileri.....	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	40
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	40
3.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler.....	41
3.3. Hasta ve Kontrol Grubu.....	41
3.3.1. Hastalar.....	41
3.3.2. Kontroller.....	42
3.4. Kan Örneklerinin Toplanması.....	42
3.5. Malondialdehit Tayini (MDA).....	42
3.6. Total Oksidan Kapasite (TOS) Ölçümü.....	43
3.7. Total Antioksidan Kapasite (TAS).....	44
3.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ).....	44

3.9. Nitrik Oksit Ölçümü.....	44
3.9.1. NO Düzeylerinin Hesaplanması.....	45
3.10. 3-NT Düzeyi Ölçümü.....	46
4.10.1. 3-NT Düzeylerinin Hesaplanması.....	46
3.11. 8-OHdG Düzeyi Ölçümü.....	47
3.11.1. 8-OHdG Düzeylerinin Hesaplanması.....	48
3.12. 8-izo-PGF <sub>2α</sub> Düzeyi Ölçümü.....	48
3.12.1. 8-izo-PGF <sub>2α</sub> Düzeylerinin Hesaplanması.....	49
3.13. CML Düzeyi Ölçümü.....	50
3.13.1. CML Düzeylerinin Hesaplanması.....	51
3.14. 8-NG Düzey Ölçümü.....	51
3.14.1. 8-NG Düzeylerinin Hesaplanması.....	52
3. 15. İstatistiksel Analiz.....	53
3.16. Araştırmanın Etik Yönü.....	53
4. BULGULAR.....	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	58
6. KAYNAKLAR.....	66
İZİNLER.....	75
EK 1. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı Kurul Kararı.....	
ÖZGEÇMİŞ.....	76

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 2.1: Oksidatif Stres Belirteçlerini Etkileyen Faktörler.....	7
Şekil 2.2: Nitrik Oksitin Sentezi.....	13
Şekil 2.3: Nitrik Oksitin HücreSEL Etkisi.....	14
Şekil 2.4: Nitrik Oksitin Sentez İzoenzimlerince Nitrik Oksit Sentezi.....	15
Şekil 2.5: Oksidatif, Nitrozatif ve Glikozatif Stres Biyobelirteçleri.....	24
Şekil 2.6: 8-Hidroksi Guanin Oluşum Mekanizması.....	27
Şekil 2.7: Reaktif Oksijen türlerine Bağlı Oluşan Lipit Peroksidasyon Ürünleri	30
Şekil 2.8: 8-İsoPGF2 $\alpha$ Oluşum Mekanizması.....	31
Şekil 2.9: Proteinlerin Glikasyonu ve AGE Oluşumu.....	35
Şekil 2.10: AGE Oluşum Mekanizması.....	36
Şekil 3.1: MDA Standart Eğrisi.....	43
Şekil 3.2: Nitrik Oksit Standart Eğrisi.....	45
Şekil 3.3: 3-NT Standart Eğrisi.....	47
Şekil 3.4: 8-OH dG Standart Eğrisi.....	48
Şekil 3.5: 8-İzoPGF2 $\alpha$ Düzeyi.....	50
Şekil 3.6: KML Standart Eğrisi.....	51

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Çizelge 1: Oksijen Türevi Bileşikleri.....	9
Çizelge 2: Fagositlerin Ürettiği Reaktif Oksidan Ürünler.....	18
Çizelge 3.1: SGS Sistemine Göre Oluşturulan Hasta Gruplarında Cinsiyet Dağılımı.....	42
Çizelge 3.2: NO ELİSA Çalışma Protokolü.....	44
Çizelge 3.3: 3-NT ELİSA Çalışma Protokolü.....	46
Çizelge 3.4: 8-OHdG ELİSA Çalışma Protokolü.....	47
Çizelge 3.5: 8-izoPGF2 $\alpha$ ELİSA Çalışma Protokolü.....	49
Çizelge 3.6: KML ELİSA Çalışma Protokolü.....	50
Çizelge 3.7: 8-NG ELİSA Çalışma Protokolü.....	52
Çizelge 4.1: Çalışma Gruplarının Yaş Ortalamaları.....	54
Çizelge 4.2: Çalışma Gruplarının Cinsiyet Özellikleri.....	54
Çizelge 4.3: Çalışma Gruplarının Biyobelirteç Ortalama ve Karşılaştırılmaları..	55
Çizelge 4.4: Hasta Alt Grupları ve Kontrol Grubuna Göre Biyobelirteç Düzeyleri.....	56
Çizelge 4.5: Hasta Grubundaki Biyobelirteçlerin Korelasyon Analizleri.....	57

## KISALTMALAR/SİMGELER

<b>KKKA</b>	Kırım Kongo Kanamalı Ateş
<b>VHA</b>	Viral Hemorajik Ateş
<b>AST</b>	Aspartat aminotransferaz
<b>ALT</b>	Alanin aminotransferaz
<b>LDH</b>	Laktat dehidrogenaz
<b>CPK</b>	Kreatin kinaz
<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>ET-1</b>	Endotelin 1
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>RNS</b>	Reaktif Nitrojen Türleri
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asid
<b>IL-1</b>	İnterlökin-1
<b>PAF</b>	Platelet aktive edici faktör
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>GM-CSF</b>	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
<b>TxA<sub>2</sub></b>	Tromboksan A <sub>2</sub>
<b>AGE</b>	Gelişmiş glikasyon son ürünleri
<b>CML</b>	Karboksimetillizin
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>RT-PCR</b>	Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>OS</b>	Oksidatif Stres
<b>SOD</b>	Süperoksid Dismutaz
<b>KAT</b>	Katalaz
<b>GSH-Px</b>	Glutasyon Peroksidaz
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<b>R·</b>	Karbon Merkezli Radikaller
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>cNOS</b>	Konstitütif Nitrik oksit sentaz
<b>iNOS</b>	İndüklenebilir Nitrik oksit sentaz
<b>eNOS</b>	Endotelyal Nitrik oksit sentaz
<b>nNOS</b>	Nöronal Nitrik oksit sentaz
<b>TNF-α</b>	Tümör nekroz faktör alfa
<b>ACh</b>	Asetil kolin
<b>GTP</b>	Guanozin trifosfat
<b>cGMP</b>	Siklik guanozin monofosfat
<b>ROO·</b>	Peroksi radikali
<b>XOD</b>	Ksantin oksidaz
<b>LPO</b>	Lipit peroksidasyonu
<b>LOOH</b>	Hidroperoksitler
<b>HNE</b>	Hidroksinonenal
<b>TBARS</b>	Tiyobarbitürik asit reaktif maddesi
<b>MDA</b>	Malondialdehid
<b>TAS</b>	Total Antioksidan Kapasite
<b>TOS</b>	Total Oksidan Kapasite
<b>OSİ</b>	Oksidatif Stres İndeksi

CRP	C-reaktif protein
PCO	Protein karbonil türevleri
DNPH	Dinitrofenilhidrazin
Cys	Sistein aminoasidi
Lys	Lizin aminoasidi
Arg	Arjinin aminoasidi
HOCl	Hipokloröz asit
Tyr	Tirozin aminoasidi
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
8-OHdG	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
GC	Gaz kromatografisi
HPLC	Yüksek basınçlı likit kromatografi ()
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GCMS	Gaz Kromatografisi Kütle Spektrofotometresi
PUFA	Poliansatüre yağ asitleri
PLA2	Fosfolipaz A2
izoPs	İzoprostanlar
PGG2	Prostaglandin G2
PGF2 $\alpha$	Prostaglandin F2 alfa
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
HBA1c	Hemoglobin A1c
PE	Fosfotiletanolamin
RAGE	AGE reseptörleri
COX	Siklooksijenaz
CYP450	Sitokrom p450
HETE	Hidroksiekozetetraenoik asit
MAPK	Mitojen-Aktive eden protein kinaz
SGS	Şiddet derecelendirme Skoru
TBA	Tiyobarbitürik asit

## 1. GİRİŞ

Kırım Kongo Kanamalı Ateş (KKKA) hastalığı bir Viral Hemorajik Ateş (VHA) hastalığıdır. VHA hastalıklarında görülen ortak klinik tablo genellikle ateş ve kanamadır [1,2]. Bu hastalık, Bunyaviridae familyasının Nairovirus cinsinin bir üyesi olan Kırım Kongo Kanamalı Ateş (KKKA) virüsü ile enfekte olduğunda meydana gelmektedir.

Endotelyum enfeksiyonu sepsis' de olduğu gibi, KKKA patogenezinde de önemli bir role sahiptir. Endotelyum hasarı, trombosit agregasyonunu ve degranulasyonunu, intrinsik kaogulasyon kaskadının aktivasyonu ile sonuçlanmasını uyararak hemostatik bozukluğa katkıda bulunur [1]. KKKA enfeksiyonunun tipik seyri 4 ana bölümde tanımlanır; inkübasyon, prehemorajik, hemorajik ve konvelesan dönemler. Trombositopeni enfeksiyonun değişmez bulgusudur. Hastalarda lökopeni, AST, ALT, LDH ve CPK yükseklikleri vardır. KKKA hastalığının patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Viral hemorajik ateşlerin ortak özelliği antiviral yanıtı başlatan hücelere saldırması ve konağın immün yanıtının bozulmasıdır. Mononükleer fagositler, endotel hücreleri ve hepatositler KKKA'de temel hedefler olup, hastalığın belirti ve bulguları virüsün hedef organlara direkt etkilerinin sonucunda oluşur [3]. Patogenezi endotel enfeksiyonu en önemli basamaktır. Endotel disfonksiyonu, Nitrik Oksit (NO) üretiminde bozulma ve endotel kaynaklı Endotelin 1(ET-1), anjiyotensin ve oksidanlar gibi gevşeme ve kasılma faktörlerinde dengesizliği ifade eder [4].

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) tüm organizmalarda normal metabolik süreçlerin yan ürünleri olarak oluşmaktadır. Fizyolojik koşullar altında, bu türlere karşı vücut antioksidan savunma sistemleri ile hücre ve dokuları korur. ROS/RNS'nin aşırı üretimleri ve bunları ortadan kaldırmak için antioksidan savunma sistemlerinin kapasitesini aştığında, böyle bir dengesizlik DNA, proteinler, lipitler gibi hücresel bileşenlerin oksidatif, nitrozatif, glikozatif hasarına neden olabilir ve bu oksidatif/nitrosatif/glikosatif stres olarak adlandırılır. Birçok çalışma oksidatif, nitrosatif stresin bazı hastalıkların çeşitli dejeneratif süreçlerinden sorumlu olduğunu göstermiştir [5-7].

Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve fonksiyonlarının kaybına neden olur. ROS için potansiyel hedef olan endotel hücreleri, aynı zamanda ROS'nin de oluşumundan sorumludur. Mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan Endotelin (ET)'ni ve NO'nin üretimini endotel gerçekleştirir. Arteriyel dolaşımda ET'in daralması etkisini tersine çeviren NO, venlerde bunun tersi bir etki gösterir. Kompleman sistemin aktivasyonu endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucunda olur ve lökosit edhezyon moleküllerinin sentezi artar. Endotel hücreleri IL-1, PAF, Prostaglandinler (PGI2, PGE2), GM-CSF, büyüme faktörleri,

endotelin, NO ve tromboksan A2 (TxA2)'yi ROS etkisi ile hasara cevap olarak salgırlar [8].

Radikal olarak reaktivitesi düşük olan Nitrik Oksitlerin, yapılarında metal bulunduran bileşikler ve radikaller ile oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girdikleri bilinmektedir. Özellikle NO'ya antioksidan özellik kazandıran lipid radikallerle reaksiyona girmesi oldukça önemlidir. NO'nun fizyolojik derişimde oksihemoglobin tarafından nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oksitlenmesiyle aktivitesi sonlandırılır. NO'ı oksijen radikallerindeki gibi ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim bulunmamaktadır. NO üretiminin, özellikle indüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonuyla artması oksidasyonda da artışa neden olur ve bunun sonucu olarak reaktif nitrojen türleri meydana gelir. NO'nun dolaylı etkileri bu reaktif türlerden kaynaklanır ve hüresel moleküllerde nitrozilasyon, nitrasyon, nitrozasyon olaylarına neden olarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına yol açabilirler [8].

Gelişmiş glikasyon son ürünleri (AGE), indirgen şekerler tarafından proteinlerin nonenzimatik glikasyon ürünleridir. Bu AGE'ler yaş, diyabet, böbrek yetmezliği ve Alzheimer hastalığı olanların plazma ve dokularında biriktiği bildirilmiştir. Bunlar glisemik kontrol takibinde, diyabete bağlı klinik komplikasyonların riskini tahmin etme ve nöropati, nefropati, retinopati ile diyabetik hastaların tedavi etkisini takibinde potansiyel yararlı biyobelirteçler olarak kabul edilir. Karboksimetillizin (KML) ve pentosidin, AGE'lerin belirlenen biyobelirteçleridir ve oksidasyon eşliğinde glikasyon (glikozatif stres) ürünleridir. Yakın zamanda yapılan toplum tabanlı 18 yıllık izlem çalışmasında diyabetik olmayan kadınlarda AGE'lerin düşük serum düzeylerinin, kardiyovasküler hastalık ve koroner kalp hastalığından kaynaklı mortaliteyi önlediği bildirilmiştir [5].

Reaktif oksijen türlerinin inaktivasyonunda önemli olan endojen antioksidan sistemler iyi araştırılmış olmasına rağmen; ancak son zamanlarda organizmanın hayatta kalması için kritik olan "nitrozatif stresin düzenlenmesi" önem kazandı. Çünkü KKKA gibi mortalite oranlarının yüksek olduğu ağır sepsiste de, yoğun nitrozatif stres tablosu ile karşılaşılır [9].

Bu çalışmanın ana hedefi; TAS (Total Antioksidan Kapasite), TOS (Total Oksidatif Durum), OSİ (Oksidatif Stres İndeksi), 8-izoProstaglandinF2 $\alpha$  (8-izoPGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) ve MDA'nın bulunduğu oksidatif; 8-Nitroguanin (8-NG), Nitrik oksit (NO) ve 3-Nitrotirozin (3-NT) nitrozatif, Karboksimetillizin (KML) olarak glikozatif stres biyobelirteç düzeylerinin saptanması ve KKKA hastalığı patogenezi ve prognozu yönünden incelenmesidir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kırım Kongo Kanamalı Ateşi

Kırım-Kongo kanamalı ateşi (KKKA)'ne ilk kez 1944 ve 1945 yılı yazında Kırırnda rastlanmış olup, kenelerin neden olduğu bir enfeksiyondur. Kongo'da 1956 yılında karşılaşılan hastalığın, 1969 yılında Kırım Kanamalı Ateşi ile aynı hastalık olduğu belirlenmiştir. Bugünkü ismiyle anılmaya bu tarihten itibaren başlanmıştır. 2002 yılında, özellikle bahar aylarında Türkiye'de görülmeye başlamasından sonra dikkat çekmeye başlamıştır [10].

İnsanlarda sendromlar şeklinde izlenen, sayıları gittikçe artan, klinik ve subklinik olarak seyreden, önemli bir enfeksiyon hastalığı grubudur. İnsanlardaki belirgin sendromları; ensefalitler, kısa süren ateşli hastalıklar, kanamalı ateşler, poliartrit ve döküntüler olarak görülür. Bu hastalıkların, biyolojik silah olarak kullanım potansiyeli taşımaları önemlerini daha da arttırmaktadır.

KKKA, Bunyaviridae ailesine bağılı Nairovirus soyundan virüslerin meydana getirdiği, şiddetli bir seyir gösteren ve fatalitesi oldukça yüksek olan bir hastalıktır. Hastalık hayvanlarda, insanlara nazaran daha yaygın olarak görülmekle birlikte asemptomatik seyretmekte olup, sporadik vakalar veya salgınlar şeklinde insanlarda görülebilmektedir. Bu grup virüsler, ribonükleik asit (RNA) içeren, heliksel kapsidli ve zarflı virüslerdir [11].

Serolojik olarak yakın komşularımız da daha önceden tanımlanmasına rağmen Türkiye'de ilk vaka 2002 yılında Kelkit Vadisi'nde yer alan Tokat ilinde saptanmıştır. 2002 ile 2014 yılları arasında artarak, T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından konformasyonu yapılmış 9069 vaka tanımlanmıştır. Bu vakalardan 440'ı kaybedilmiştir. Vakaların % 95'i gibi büyük oranı, İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgesi'nin kuzey bölgesinden gelmektedir. Vakaların çoğu mart ve ekim ayları arasında ve özellikle haziran ve temmuz aylarında, kenelerin yoğun olarak aktif olduğu sezonda görülmektedir. 2002 ile 2014 yılları arasındaki ölüm oranı %4,85'dir [12, 13].

KKKA virüsü 30 kadar kene türünden izole edilmelerine rağmen, bu 30 tür gerçek vektör olmayabilirler. Söz konusu bu kenelerin larva veya nimf dönemlerinde kan emdiği viremik bir konaktan virusu almaları ve gömlek değiştirdikten sonra, erişkin dönemlerinde bunu duyarlı başka konaklara verebilmeleri gerçek vektör olarak kabul edilmelerini sağlar. Bununla birlikte, bir dişi kenenin erişkin döneminde enfekte olmuş konaklardan kan emerek virusu yumurtalarına aktarabilmesi de vektörlük özelliği olarak yer alır [14].

Bunun yanında, bu gibi özelliklere sahip kenelerin saha koşullarında seçtikleri konakların da hastalık etkenlerini barındıran ve üreten bir omurgalı olması gerekmektedir. Ayrıca popülasyon yoğunluğu, beslenme tarzı ve bazı iklim faktörleri de bir kene türünün etkili bir vektör olup olmayacağını belirleyen unsurlardır. Günümüzde, vektör yeteneği kanıtlanmış altısı “*Hyalomma*” soyundan olmak üzere, 10 kene türü vardır. Vektörlük potansiyeli kanıtlanmış kenelerden “*Hyalomma marginatum*”, “*Hyalomma anatolicum*” ve “*Dermacentor marginatus*” ülkemizde yaygın olarak bulunur. Ancak 2005 yılından itibaren başlayan saha çalışmalarının sonucunda KKKA epidemileri ile ilişkili kene türünün “*H. Marginatum*” olduğu tespit edilmiştir [14] .

### **2.1.1 Patogenez**

Hastalığın patogenezi tam olarak bilinmemektedir. İmmün cevabın bozulması etkene karşı cevabı başlatan hücrelerin fonksiyonlarının bozulması ile olmaktadır. Vasküler sistem ve lenfoid organların fonksiyonlarında bozulma oluşmaktadır. Vasküler endoteldeki zedelenme hastalığın patogenezinde önemli bir yer tutar. Endotel zedelenmesi indirekt olarak virüse karşı gelişen sitokinlerin endotel aktivasyonuna ve disfonksiyonuna neden olması veya ikinci olarak direk şekilde virüsün endotel hücrelerini enfekte ederek endotel hücreleri içerisinde çoğalmaları ile oluşmaktadır.

### **2.1.2 Tanı ve Klinik Bulgular**

İnsanlar, KKKA virüsüne bağlı hastalık bulgularının ortaya çıktığı bilinen tek konaktır. Hastalık klinik seyri sırasında; inkübasyon, pre-hemorajik, hemorajik ve konvalesan dönemler şeklinde dört evrede karşımıza çıkmaktadır.

Tanı konulurken hasta öyküsü alınarak klinik semptom ve bulgular değerlendirilmeli, özellikle ateş ve kanaması olan hastalar değerlendirilirken dikkatli olunmalıdır. Kesin tanı laboratuvar bulgularının yardımıyla konulur. Tanı virüsün izolasyonu, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemlere dayanılarak konulur. Özellikle Revers Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi en sensitif ve spesifik yöntemdir. Sekiz saatte tanı koydurabilen, hızlı bir tanı yöntemidir. Ayrıca bu yöntemlerin sensitifitesi ve spesifitesi diğer yöntemlere göre daha yüksektir. Tam kan sayımında beyaz küre sayısında düşüş, trombositopeni, karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma, kanama testlerinde uzama, böbrek fonksiyonlarında bozulma, laktik dehidrogenaz ve kreatin kinaz düzeylerinde artış gibi non-spesifik laboratuvar bulguları inkübasyon döneminden itibaren tespit edilebilmekle beraber hemorajik dönemde belirgin olarak görülmekte ve konvalesan dönemden itibaren düzelmeye başlamaktadır [15,16].

### **2.1.3 Tedavi**

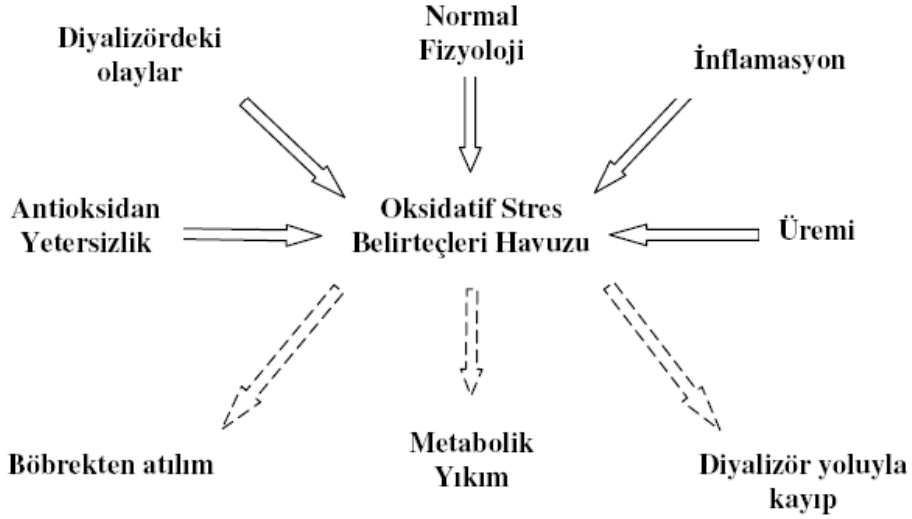
Tedavide ana unsur, destek tedavisidir. Sıvı elektrolit dengesi yeterli düzeylerde tutulmalı, gerektiğinde kan, trombosit ve taze donmuş plazma transfüzyonları yapılmalıdır. Hastalığın bugün için tedavisinde kullanılabilecek uygun antiviral ajan olmamasına karşın ribavirin günümüze kadar etkinliği gösterilen tek ilaçtır. Guanozin analogu olan ribavirinin “*Lassa virüs*”, renal sendromla giden kanamalı ateş gibi diğer kanamalı ateş vakalarında etkili olabileceği gösterilmiş olup, ebola virüsüne karşı etkisi gösterilememiştir [15, 16]. Çok sayıda çalışma ile KKKA ‘e ribavirinin etkili olabildiği göstermiştir [16-20]. Tedavinin etkinliği açısından erken tanı önemlidir, ciddi komplikasyonlar geliştikten sonra ribavirin tedavisinin etkinliği azalmaktadır [16]. Bununla birlikte KKKA’ne karşı uygulanabilecek aşı yoktur. Aşı çalışmaları sürdürülmektedir [15, 20, 21].

## **2.2. Serbest Radikaller**

### **2.2.1 Oksidatif ve Nitrozatif Stres**

Prooksidan bileşiklerin oluşumu ile antioksidan savunma sistemlerindeki yetersizlikten dolayı, oksidan bileşiklerle antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin bozularak oksidan bileşiklerin yönüne kayması sonucunda ortaya çıkan doku hasarı olarak tanımlanan olay Oksidatif stres (OS)’tir [22]. Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri (ROS, RNS), prooksidan reaktif ürünlerdir. ROS hücrede normal metabolik olayların ürünleri olup; süperoksit radikalleri ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), nitrik oksit (NO), peroksit radikalleri ( $ROO\cdot$ ), hidroksil radikalleri ( $OH\cdot$ ) ve hipoklorit radikallerini içerirler [23].

Oksidatif bileşiklerin oluşumu, fizyolojik şartlarda inflamasyon ve doku tamiri sürecinde önemli bir basamaktır. Bu oluşum doku iyileşmesi ve yeniden oluşumuna katkısıyla birlikte, yanında malign hücrelere ve vücuda giren bakteri veya diğer canlıların öldürülmesi ile savunma mekanizmasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Ateroskleroz, hipertansiyon, nörodejeneratif değişiklikler, yaşlanma ve malignite gelişim süreci ile OS arasında ilişkili bulunmuştur. Diğer taraftan, uygunsuz veya uyumsuz bir şekilde oksidatif süreç başlamasına, hücre ve doku hasarına neden olan kronik patolojik durumlar da söz konusu olabilir [23, 24]. Fizyolojik şartlarda gerçekleşen pek çok hücrel aktivite OS’yi etkileyebilmektedir (Bkz. şekil 2.1).



Şekil 2.1. Oksidatif Stres belirteçlerini etkileyen faktörler

### 2.2.2. Serbest Radikaller

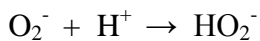
Serbest Radikaller (SR), en dış yörüngesinde bir elektron kaybetmiş, yapısında çoğunlukla oksijen yer alan kararsız molekül veya atomlardır [22, 25-27]. Kovalent bağların hemolizi sonucunda iki farklı paylaşılmamış elektron oluşturması veya redoks reaksiyonu ile bir elektronun kaybedilip kazanılması sonucunda da serbest radikal oluşumu gerçekleşebilir.

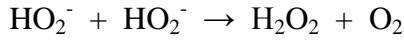
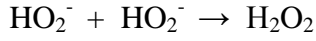


Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları ardışıktır ve oksidatif stres her iki reaksiyonda da meydana gelir. Serbest oksijen radikallerinin aktiviteleri birbirinden farklıdır; örneğin  $HO^\cdot$  gibi radikallerin aktivitesi yüksek iken, tokoferoksil gibi bileşiklerin aktiviteleri göz ardı edilebilecek kadar düşüktür [28]. SR, bir maddeyi hem oksidant hem de redüktant şekliyle kullanabilir ve reaksiyonun oluşum hızı; ortamın ısısına, PH'sına ve ortamdaki katalizörlere bağlı olarak değişir [29].

#### 2.2.2.1. Serbest Radikal Reaksiyonları

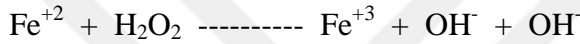
Süperoksit radikali ( $O_2^\cdot$ ), moleküler ksijenin ( $O_2$ ) bir elektron alarak indirgenmesiyle, en kolay ve en fazla oluşan ilk serbest radikal üründür. Canlılarda diğer radikallerin oluşumu genellikle  $O_2$ 'nin birikimiyle ilişkilidir.  $O_2^\cdot$  radikalının temel kaynağı ise moleküler oksijenin metabolize olduğu, mitokondriyal elektron transport zinciridir [25, 30-32] ve fizyolojik koşullarda üretilen  $O_2^\cdot$ ler dismutasyon reaksiyonu ile organizmadan uzaklaştırılır. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve perhidroksi ( $OH_2^\cdot$ ) radikalleri bu reaksiyonlarla oluşur. Süperoksit dismutaz (SOD) katalizi ile kendiliğinden dismutasyon reaksiyonları meydana gelebilir.





Süperoksit Dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzim sistemleri ile  $\text{H}_2\text{O}_2$  suya dönüştürülür.  $\text{OH}^-$  serbest oksijen radikalleri içinde en güçlü radikalidir ve yarılanma ömrü çok kısadır. Bu nedenle oluştuğu yerde çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına neden olur.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;  $\text{Fe}^{+2}$  ve geçiş metallerinin varlığında “Fenton reaksiyonu” sonucu, süperoksit radikali ile de “Haber-Weiss reaksiyonu” sonucunda  $\text{OH}^-$  radikali oluşturur.

İskemi oluştuğunda ve de özellikle reperfüzyon ile dokuların oksijenasyonu ile oluşan bu reaksiyonu demir gibi metaloproteinler, askorbik asit ve NADPH katalize edebilir [32].



### 2.2.3. Serbest Radikallerin Sınıflandırılması

Aerobik metabolizması olan memelilerde serbest radikaller başlıca oksijenden türemektedir (Bkz. Çizelge 1). Ancak organizmada oksijen türevi serbest radikaller dışında karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır [34].

Oksijen sekiz atom numaralı kararsız bir elementtir. Enerji düzeylerindeki elektronlarından dolayı doğada dioksijen ( $\text{O}_2$ ) halinde bulunur [35]. Oksijen molekülündeki 2P son orbitalında bulunan ve aynı yönde dönen iki elektron önemlidir. Oksijenin bu elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle “singlet oksijen” oluşur. Reaktif oksijen türleri tarafından etkilenen araşidonik asitler, lipid oksidasyonunun alt ürünleri, aldehitler, hücre içi enzim ve metaller ile doku hasarı meydana gelir [36].

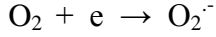
Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil ( $\text{HO}^\cdot$ )	Hidrojen Peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
Alkoksil ( $\text{RO}^\cdot$ )	Singlet Oksijen ( $\text{O}_2^{\uparrow\downarrow}$ )
Peroksil ( $\text{ROO}^\cdot$ )	Ozon ( $\text{O}_3$ )
Superoksit ( $\text{O}_2^-$ )	Hipoklorid ( $\text{HOCl}$ )
Nitrik oksit ( $\text{NO}^\cdot$ )	Lipid hidroperoksit ( $\text{LOOH}$ )
Azot dioksit ( $\text{NO}_2$ )	Peroksinitrit ( $\text{ONOO}^\cdot$ )

Çizelge 1. Oksijen türevi bileşikleri

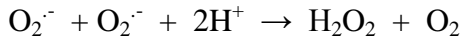
## 2.2.4. Serbest Radikal Türleri

### 2.2.4.1. Süperoksit Radikali

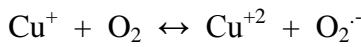
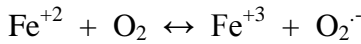
Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda oluşmaktadır.



Bu radikalden spontan ya da enzimatik dismutasyon ile ikinci bir ara ürün,  $H_2O_2$  oluşur:

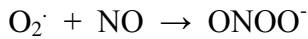


Demir (Fe) ve Bakır (Cu) gibi geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından da önemlidir:



Süperoksit radikali biyolojik dokulara direkt olarak fazla zarar vermez. Ancak,  $H_2O_2$  oluşumunda kaynak olarak rol alması ve geçiş metalleri iyonlarının da indirgeyicisi olması onun ne kadar önemli olduğunun göstergesidir [37, 38].

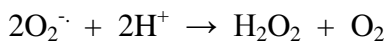
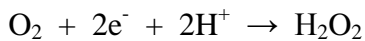
NO ile süperoksitin reaksiyonu sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot-}$ ) meydana gelir. Bu reaksiyonun oluşum hız sabiti, SOD ile NO'nin de hem bileşikleri ile olan reaksiyon hız sabitlerinden oldukça büyüktür. Bu nedenle NO'nin normal aktivitesi inhibe edilir. Ayrıca peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zarar verirken, azot dioksit ( $NO_2$ ), hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) ve nitronyum iyonu ( $NO_2^{\cdot-}$ ) gibi daha birçok toksik ürünlere dönüştürler [39].



Süperoksit radikali, bir proton alarak daha reaktif olan perhidroksil radikaline ( $HO_2^{\cdot}$ ) düşük PH durumlarında kolaylıkla dönüşür. Ancak, ortam PH'sı fizyolojik sınırlarda iken oluşan perhidroksil formu oldukça düşük düzeydedir [37].

### 2.2.4.2. Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )

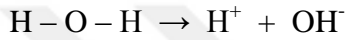
$H_2O_2$  aerobik hücrede, normal koşullarda çeşitli metabolik işlemler ve oksidatif stres sonucunda oluşur [40].  $H_2O_2$ , süperoksit radikalının aksine membranlardan kolayca geçerek oluştuğu yerden uzakta reaksiyona girebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Biyolojik sistemlerde süperoksitin dismutasyonu ile hidrojen peroksit oluşur ki; bu reaksiyon  $H_2O_2$ 'in esas oluşum kaynağıdır.  $H_2O_2$  ve moleküler oksijenin oluşumu, İki  $O_2^{\cdot-}$  molekülünün iki proton almasıyla gerçekleşir [41].



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bir serbest radikal tanımına uymadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> ile reaksiyona girerek OH<sup>-</sup> radikali oluşumuna neden olduğundan dolayı ROS'leri içerisinde yer alır. Bu nedenle oldukça önemlidir. Ultraviyole ışınları ile kolaylıkla parçalanabilmektedir. KAT ve GSH-Px ile enzimatik olarak, piruvat ve geçiş metal iyonlarının katalizlediği "Fenton reaksiyonu" ile nonenzimatik olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parçalanır ve zararsız hale dönüştürülür [42].

### 2.2.4.3. Hidroksil Radikali (OH<sup>-</sup>)

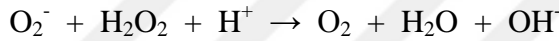
Biyolojik sistemlerde OH<sup>-</sup> bilinen en reaktif serbest radikaldir. Radyasyona maruz kalan dokularda enerjinin büyük bir kısmı, hücre içindeki su tarafından absorblanır ve bu radyasyon oksijen-hidrojen atomları arasında kovalent bağa sebep olur. Sonuç olarak biri hidrojen (H), diğeri hidroksil radikali (OH<sup>-</sup>) olmak üzere iki radikal meydana gelir [38].



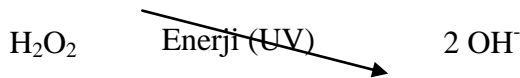
OH<sup>-</sup>, Fenton reaksiyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesi sonucunda meydana gelir:



Haber-Weis reaksiyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup>, bakır ve demir iyonları varlığında reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur:



Ayrıca OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ultraviyole ışığına maruz kalması ile de oluşabilir:



Hidroksil radikalinin yarılanma ömrü oldukça kısa olduğu için, oluştuğu yerde büyük bir hızla reaksiyona girerek hasara sebep olur [40]. Başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere tüm hücrel moleküllerle bu radikaller reaksiyona girebilirler. Özellikle DNA içeriğinde bulunan bir karbonhidrat olan deoksiriboz ile reaksiyona girmesi sonucunda çeşitli mutasyonlara ve mutant molekül oluşumlarına neden olabilir. Bununla birlikte OH radikalleri, DNA ve RNA'daki pürin ve pirimidinlere kendilerinin aromatik halkaya katılma özelliklerinden dolayı katılarak serbest radikal oluşumuna neden olurlar. OH radikalleri DNA'nın baz ve şekerlerinde, DNA'da iplik kırılmaları oluşturacak boyutta ciddi hasarlar meydana getirir ve hücrel koruyucu mekanizmalar tarafından bu büyük hasarlar onarılmaz ise, çeşitli mutasyonlar ve hücre ölümleri görülür [38, 41, 42].

Hidroksil radikali, lipid peroksidasyonunda etkili olan önemli bir radikaldir. Lipid peroksidasyonu hem intrasellüler hem de ekstrasellüler antioksidan potansiyele sahiptir. OH, özellikle membran fosfolipidlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerinin metilenik

karbonlarından hidrojen atomu koparmak için saldırır. Hidrojen atomunun koparılmasıyla oluşan karbon merkezli radikal konjuge dien şekline çevrilir ve sonra moleküler oksijenle peroksi radikalini oluşturur. Bu peroksil radikalleri, diğer doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerine atak yaparak membran lipid hidroperoksidlerin birikimine yol açar. Böylece membran fonksiyonu bozulur ve bazı enzimlerin aktiviteleri artar [35, 43, 44].

#### **2.2.4.4. Singlet O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)**

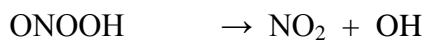
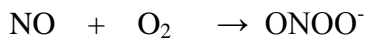
Yapısında eşleşmemiş elektron içermediğinden radikal olmayan reaktif bir oksijen parçasıdır. Genellikle oksijen serbest radikalleri ile birlikte ve enerji absorpsiyonu ile oluşur. Singlet oksijenin iki formu vardır: Zıt spinli elektronların aynı orbitalde olduğu delta formu ve ayrı ayrı orbitallerde olduğu sigma formudur. Bu iki formun reaktivitesi oldukça yüksektir. Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya kendi enerjisini transfer eder ya da kovalent tepkimelere girer [41, 45].

#### **2.2.4.5. Karbon Merkezli Radikaller (R<sup>•</sup>)**

Karbon merkezli radikaller protein, karbonhidrat, lipid veya nükleik asit gibi biyolojik moleküllere serbest radikal etkisi sonucunda oluşmaktadır. Bu radikaller oksijen molekülü ile hızlı bir reaksiyona girerek peroksil radikallerini (ROO<sup>•</sup>) ve sonrada ROO<sup>•</sup> de reaksiyona girerek alkoksil radikallerini (RO<sup>•</sup>) meydana getirebilirler [46].

#### **2.2.5. Reaktif Nitrojen Türleri (NO, NO<sub>2</sub>, NO<sup>+</sup>, NO<sup>-</sup>)**

Nitrik Oksit (NO), yüksek konsantrasyonlarda oksijensiz ortamda oldukça kararlı olup, düşük konsantrasyonlarda ise oksijen varlığında bile kararlıdır. NO, biyolojik olarak aktif olan memeli hücrelerinin bilinen en küçük molekül ağırlıklı ürünüdür [47-49]. NO, düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik görevleri vardır [47, 50]. NO, moleküler oksijen ile bağlanıp nitrojendioksit (NO<sub>2</sub>) oluşturarak metabolize olur. NO<sup>-</sup>'in diğer bir önemli etkisi güçlü bir oksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturmasıdır. Bu molekül de biyolojik olarak oksidan özellik kazanabilmekte ve önemli patolojik süreçlerde rol oynayabilmektedir [49]. Sonuçta NO, endotel hücre disfonksiyonu ve bununla ilişkili olan birçok önemli hastalıklarda etkili olabilmektedir [45].



NO hemostatik olaylarda ve organizmanın savunma mekanizmalarında otokrin ve parakrin etkisi olan bir araçtır. Makrofajlar, nötrofiller, hepatositler ve endotel hücreler

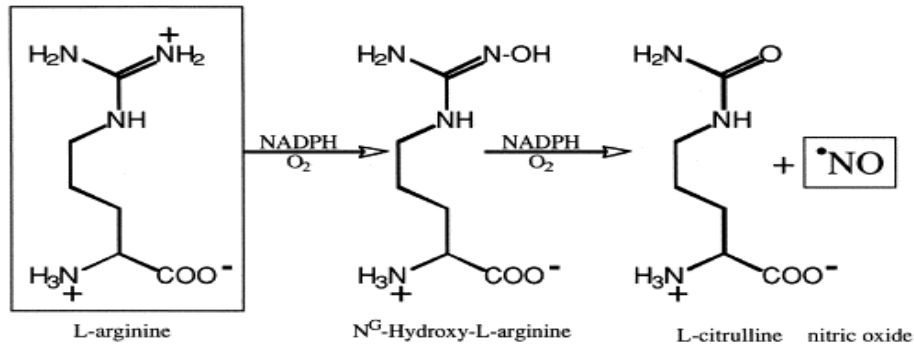


tarafından üretilir. En önemli fonksiyonu vücudun çeşitli dokularında interlökin-1 ve sitokinlerin etkilerine paralel bir işlev görmesidir [51].

Tümör hücrelerini, parazitleri, bakteri ve mantar hücrelerini öldürmede görev alır. Ancak yüksek konsantrasyonlarda normal hücreler üzerinde toksik etki gösterir. Spontan olarak parçalanarak nitrojen dioksit oluşturur [37, 39].

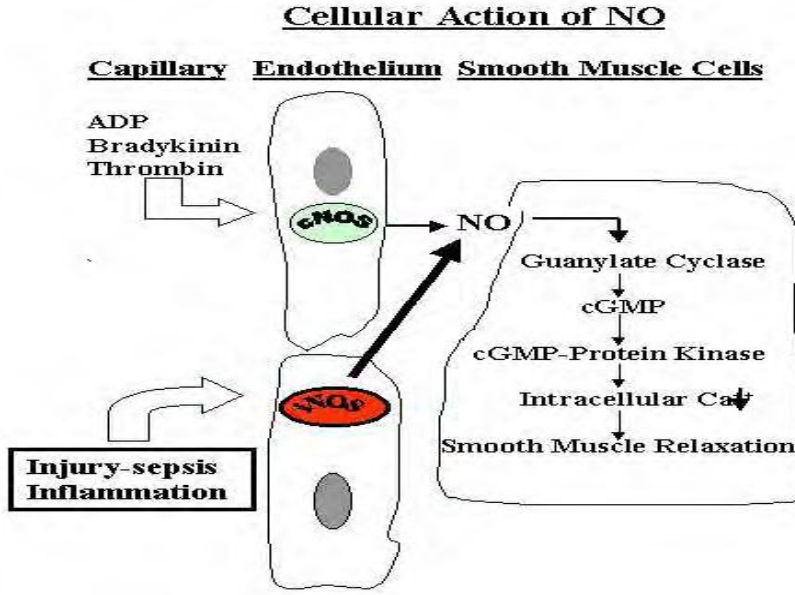
### 2.2.5.1. Nitrik Oksitin Biyosentezi

Nitrik oksit, arjinin aminoasitinden üretilir. Memelilerde arjinin aminoasiti yarı esansiyel bir aminoasittir [52]. NO, endotelden salınan, suda çözünebilen, çeşitli renal ve ekstrarenal etkileri bulunan, vasküler düz kas tonusunu azaltarak damar genişlemesine yol açan ve yarı ömrü birkaç saniye olan bir moleküldür. Ayrıca NO' Lipofilik olduğu için membranları kolayca geçebilir. NO sentezleyen enzimlerin (NOS) katalizi ile L-arjininden L-sitrullin ve NO sentezlenir. Bu reaksiyonun ilk evresinde N-Hidroksi Arjinin (N-OH-Arjinin) oluşur. Bu ara ürün oldukça kararludur. Enzime sıkı bağlı olan ara ürün ise ikinci aşamada sitrullin ve nitrik oksite çevrilir (Bkz. Şekil 2.2) [53, 54].



Şekil 2.2. Nitrik Oksitin Sentezi

NO arjininden çok çeşitli canlı türlerinde sentezlenir ve NO birçok fizyolojik aktiviteye sahiptir (Bkz. Şekil 2.3) [49].

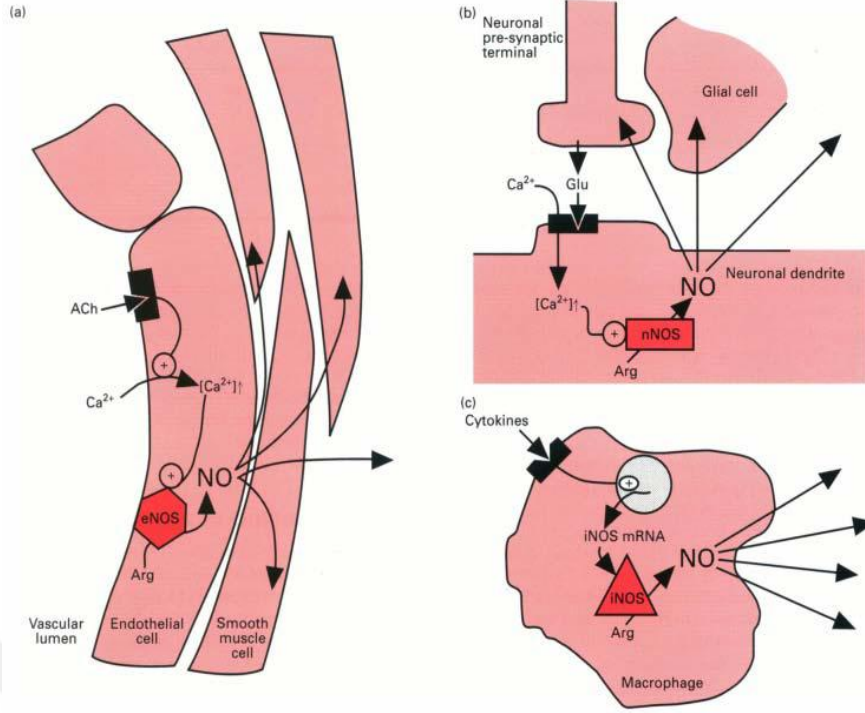


Şekil 2.3. NO'nin Hücresel Etkisi

### 2.2.5.2. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Enzimleri

Nitrik oksit sentezini NOS enzimleri katalizler ve NOS enzimleri iki temel izoformda bulunur. Bunlar; konstitütif veya yapısal (cNOS) ve indüklenbilir (iNOS) olarak adlandırılır. Yapısal NOS enzimlerinin endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) olarak iki izoformu vardır. eNOS, membranda bulunur ve endotel kaynaklı gevşeme faktörünün sentezini; nNOS ise, merkezi sinir sistemi ve nöronlarda haberci molekül olan NO<sub>2</sub>'nun üretimini gerçekleştirir.

Yapısal NOS kofaktör olarak Ca<sup>+2</sup>/kalmodülin bağımlı olup, düşük aktivite ile aralıklarla küçük miktarlarda NO üretirler. Endotelial tipi mast hücreleri, plateletler, pankreasın beta adacıklarında, vasküler düz kas hücrelerinde bulunan enzimlerin aktiviteleri glikokortikoidlerden etkilenmez. Sinir sistemi, adrenal bez (medulla ve korteks) ve astrositlerde ise nNOS izoformu bulunur. NOS enziminin indüklenbilir olan izoformu (iNOS) ise Ca<sup>+2</sup> dan bağımsız olup, alt birim olarak kalmodüline ihtiyaç duyar. iNOS sitoplazmik, aktivitesi yüksek bir enzimdir ve indüklendiğinde uzun süreli, büyük miktarlarda NO üretebilir. İlk olarak makrofajlardan saflaştırılan iNOS izoformu endotoksin ve inflamatuvar sitokinler (interferon gama, IL1, IL2, TNF- $\alpha$  gibi) tarafından indüklenir. iNOS enziminin sentezi sadece fagositik lökositlerde değil, uygun indüksiyon sağlandığında bütün çekirdekli hücrelerde de gerçekleşebilir [49].



Şekil 2.4. NOS izoenzimlerinden NO sentezi (Knowles ve Moncada 1994).

- Asetil kolin (ACh) tarafından vasküler endotel hücrelerin stimülasyonu ile eNOS tarafından NO sentezi.
- Nöronal dentritin Glutamat tarafından stimülasyonu ile nNOS tarafından NO sentezi.
- Bir makrofajın sitokinlerle ve sentezlenen iNOS mRNA ile indüksiyonu sonucu iNOS tarafından NO sentezi.

Nitrik oksit sentaz enzimi iki şekilde uyarılmaktadır;

- Yapısal tipe özgün olarak: asetilkolin gibi bir haberci, endotel hücresi üzerindeki reseptörüne bağlanarak,  $Ca^{+2}$  iyon kanallarının açılmasını sağlar ve hücrede  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu artır. Ardından  $Ca^{+2}$ /kalmodüline kompleksi oluşur ve bu kompleks yapısal bir enzim olan eNOS'u indükler. eNOS aktivitesiyle oluşan NO, endotelden düz kas hücrelerine geçerek sitozoldeki guanilat siklaz'ın hem grubundaki demir atomuna bağlanır ve onu aktive eder. Böylece GTP'den cGMP oluşumu artar. Artan cGMP ile düz kaslar gevşeyerek ve sonuçta damarlarda vazodilatasyon meydana gelir (Bkz. Şekil 2.4.a).

Ayrıca diğer bir yapısal enzim olan nNOS da aynı şekilde uyarılır (Bkz. Şekil 2.4.b)

- Uyarılabilir tipe spesifik olarak: burada lipopolisakkaritler ve sitokinler gibi ajanların  $Ca^{+2}$ 'ye bağımlı olmayan NOS'u indüklemeleri söz konusudur. İlgili hücrede önceden NOS yoktur veya çok azdır. Uyarıcılar tarafından transkripsiyonel olarak mRNA üzerinden enzim eksprese edilir ve NOS ile NO sentezlenir. Bu sistem özellikle makrofajlarda görülür, bu tip enzim indüklenebilir NOS (iNOS) olarak adlandırılır (Bkz. Şekil 2.4.c).

### 2.2.5.3.Nitrik Oksitin Fonksiyonları

1. Trombositlerin agregasyonunu, adezyonunu ve aktivasyonunu inhibe etmesinin yanı sıra, pıhtı oluşumunun erken fazının düzenlenmesinde görev almaktadır [55].
2. Vasküler ya da vasküler olmayan düz kasların gevşemesini sağlar. Böylece sistemik kan basıncının ve dolaşımının düzenlenmesinde rol oynar [56].
3. ROO'ni yakalayabilmesi nedeniyle güçlü bir lipit peroksidasyonu inhibitörüdür [57].
4. Lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu ve migrasyonunu önler. Lenfosit aktivasyonunu indirgeyerek, kronik ve akut inflamatuvar reaksiyonları düzenler [58].

### 2.2.6. Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller, organizmada normal hücre metabolizması sırasında oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluşabildiği gibi çeşitli dış kaynaklı nedenlerle (stres, radyasyon, ksenobiyotikler gibi ) de oluşabilir. Mitokondriyal elektron transport sistemi (ETS), sitokrom P-450, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, iskemi, travma ve entoksikasyon gibi durumlar, katekolamin ve antibiyotikler gibi moleküller serbest radikalleri oluşturabilirler [45, 59].

#### 2.2.6.1. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Fizyolojik koşullarda metabolizmada, bazı metabolik olayların idamesi için meydana gelen birçok biyokimyasal reaksiyonun çeşitli basamaklarında, serbest radikaller oluşmaktadır. Bunlar;

##### A. Mitokondriyal Elektron Transport Sistemi (ETS)

Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında O<sub>2</sub> kullanılır ve bunun %1-5'i kadarı süperoksit ile sonlanır. ETS'de NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene olan elektron transferiyle radikal oluşur [60].

##### B. Endoplazmik Retikulum (ER)

ER'da bulunan sitokrom P-450 sistemi birçok substratı oksitleyebilir. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanırken, diğer atomu su oluşturur. Kimyasal ajanların radikal oluşturmadaki en önemli mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemi aktivasyonudur ve bu sistemde moleküller ya indirgenerek ya da oksitlenerek serbest radikal oluşturur [60].

##### C. Redoks Döngüsü

Ksenobiyotiklerden serbest radikaller mikrozomal reaksiyonlarla oluşturulduğu gibi redoks siklusu (menadion, nitrofurantoin, gibi ek elektron kazanma eğilimindeki bileşikler) yoluyla da meydana gelebilir. Oluşan radikaller, tekrar ana bileşiğe dönüşmek için oksijenle oksitlenir ve süperoksit radikalini meydana getirirler [61].

#### D. Araşidonik Asit Metabolizması

Hücre membranlarındaki prostaglandinlerin kaynağı araşidonik asittir. Araşidonik asit, peroksitlerle aktive olan iki enzim olan siklooksijenaz ve lipooksijenazın katalizlediği tepkimeler sırasında serbest radikaller meydana gelir [62].

#### E. Fagositoz

Aktive fagositler patojen mikroorganizmalarla savaşta önemli intrasellüler radikal oluşumuna neden olurlar. Ksenobiyotikler, radyasyon ve stres aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttıırırlar.

Trombositler	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , OH.
Nötrofiller	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , OH, HOCl
Eozinofiller	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , OH, HOCl
Makrofajlar	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , OH, HOCl, NO

Çizelge 2. Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler

Doku makrofajları, monositler, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller gibi hücreler immünolojik veya özel bir uyarıyla uyarıldıklarında lizozomlarını dışarı verip reaktif oksijen oluşumunun yanı sıra, mitokondri dışındaki oksijen üretiminde bir patlama (solunumsal patlama; respiratory burst) neden olurlar. Fagosit edilmiş patojenler oksidan ajanlarca yok edilir ve bu oksidanlar solunumsal patlama ile sağlanır. Oluşan oksidan ajanlar myeloperoksidaz sistemi üzerine de etkilidir. Fagositik kaynaklı oksidanlar; ototoksik, immunosupresif ve mutajenik etki gösterebilirler [62].

#### F- Otoksidasyon

Doku bileşenlerinin çoğu moleküler oksijenin varlığında kimyasal olarak kararlı olmayıp, normal şartlar altında metabolizmada az ya da çok otoksidasyona uğrarlar. Kolayca

otookside olabilen hemoglobin, hormonlar, tiyoller, doymamış membran lipitleri gibi doku ve hücrelerin son derece önemli bileşenleridirler [63].

#### G- Oksidan Enzimlerin Reaksiyonları

Glikojen oksidaz, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz, NADH oksidaz, diamin oksidaz, urat oksidaz enzim sistemlerinde olduğu gibi Aerobik birçok reaksiyonda oksijenin tek değerlikli indirgenmesiyle süperoksid anyonu oluşabilir [64].

#### 2.2.6.2. Eksojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

A- İyonizan ve non iyonizan radyasyon

B- Isı şoku

C- Antineoplastik ajanlar

D- Alkol, uyuşturucu gibi bağımlılık yapan maddeler

E- Stres; streste kan katekolamin düzeyi artmakta ve bunun sonucunda artan katekolaminlerin oksidasyona uğraması ile radikal üretimi artmaktadır.

F- Anestezik maddeler, aromatik hidrokarbonlar, solventler, hiperoksi, hava kirliliği, sigara dumanı, pestisitler vb.

H-Güneş ışığı'dır [34].

#### 2.2.7. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri

##### 2.2.7.1. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

Hücrelerin membranlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri okside edici serbest radikaller tarafından kolaylıkla etkilenebilmektedir. Poliansature yağ asitlerinin oksidatif hasarı lipit peroksidasyonu (LPO) olarak da adlandırılmaktadır. LPO sonucunda hücrede kendiliğinden devam eden zincir reaksiyonları başlamaktadır. Oksidasyon sonucunda oluşan LPOO'leri bir sonraki doymamış yağ asidini okside ederek yeni zincir reaksiyonları başlatırlar. Zincirleme reaksiyonlar sonucunda hidroperoksitler (LOOH) oluşmaktadır. LOOH'de daha zararlı radikal özelliği olan türlere, özellikle aldehitlere çevrilirler [41].

Aldehitlerin çoğu biyolojik olarak aktiftirler ve lipit hidroperoksitler parçalandığında oluşurlar. Bunlardan en çok bilineni 'hidroksialkenoller'dir ve bu da 4-Hidroksinonenal (HNE) üyesidir. Bu bileşikler oluştukları yerden diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine giderek hasara neden olabilmektedirler. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitleri ve aldehitler, TBARS (tiyobarbitürik asit reaktif maddesi) olarak adlandırılır ve Malondialdehid (MDA) eşdeğerleri olarak spektrofotometrik ve florometrik metotlarla dokuda veya vücut sıvılarında ölçülebilir [65].

Lipit peroksidasyonunu hızlandırarak hücre membranının akışkanlığını ve geçirgenliğini bozan Fe ve Cu tuzları, bu şekilde membran bütünlüğünün bozmuş olurlar. Bu hasar lizozomal membranlarda da olur ve hidrolitik enzimler salınarak hücre içi sindirime yol açarlar. Hidroperoksitlerin toksik etkilerinin yanı sıra, birikimleri ile sistein, histidin, metyonin, lizin gibi aminoasit kalıntılarında etkiyerek okside edebilir ve zincir polimerizasyon reaksiyonları ile enzimlerin inaktivasyonunu sağlayabilir [66, 67].

### **2.2.7.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri**

Reaktif oksijen türleri özellikle de hidroksil radikali olmak üzere hücre içi proteinlerde geri-dönüşümsüz oksidatif modifikasyonlara ve sonuçta oksidatif hasara neden olurlar [68, 69]. Okside olan hücre içi protein yapıları yan zincirleri (prolin, arjinin, lizin, ve treonin) üzerinde karbonil grupları oluşur.  $\alpha$ -amidasyon yolağı ve glutamil yan zincirlerin oksidasyonu sonucunda proteinlerin parçalanması ile de protein karbonil yapıları ortaya çıkabilir.

Proteinler üzerinde karbonil grupları, protein yan zincirleri üzerindeki sistein, histidin ve lizin kalıntılarının lipit peroksidasyonu sonucu oluşan aldehitler (MDA, HNE), indirgeyici şekerler tarafından oluşturulan karbonil türevleri (ketoaminler ve ketoaldehitler) ve proteinlerin lizin kalıntılarının oksidasyon ürünleri (glikasyon, glikoksidasyon) ile sekonder reaksiyonları sonucunda da oluşabilir [70]. Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif modifikasyonlar, hücre iskeletini oluşturan proteinler ve enzimlerde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana getirir. Geri-dönüşümsüz oksidatif modifikasyonlar olarak, protein karbonilasyonu ve tirozin nitrosasyonu iken; geri dönüşümlü oksidatif modifikasyon ise sistein modifikasyonları olarak kabul edilir [68, 69]. Birçok hastalığın patogenezinde bu modifikasyonlar sorumludur [71].

### **2.2.7.3 . Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri**

Başta karsinogenezis olmak üzere, birçok hastalığın patogenezinde oksidatif DNA hasarı önemli bir rol oynar. Reaktif hidroksil radikalleri DNA bazlarındaki çift bağlara H atomu ekleyerek veya 2-deoksiribozun C-H bağlarından ve timin yapısındaki metil gruplarından H atomu çıkararak DNA molekülü ile reaksiyona girer [72]. Oluşan timin peroksil radikallerinin indirgenmesi sonucunda hidroksihidroperoksit, timin glikol, 5-hidroksimetilurasil, 5-formilurasil ve 5-hidroksi 5-metilhidantoin gibi oksidasyon ürünlerine dönüşürler [73].

DNA üzerine oksidatif hasarın diğer bir etkisi de oluşan bazı radikallerin proteinlerin aromatik aminoasitleri ile birleşerek "DNA-protein" çapraz bağları meydana getirmesidir [74]. Bunun yanı sıra DNA üzerindeki şeker kalıntılarında, OH radikalleri H atomu koparır ve şeker modifikasyonları ile zincir kırılmalarına sebep olur. Sonuç olarak hücreler  $H_2O_2$  veya

diğer oksidan maddelere maruz kalarak replikasyon ve transkripsiyon üzerine etki eder. Bununla birlikte DNA tamir mekanizmalarını da baskılayarak DNA hasarını arttırır [75]. Karsinogenezisin DNA hasarının etkilediği en önemli patolojik durum olduğu bilinir. Karsinogenezisin başlangıç, ilerleme ve malign dönüşüm evreleri üzerinde de önemli olduğu düşünülmektedir [76].

#### **2.2.7.4.Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri**

Serbest Radikallerin etkisiyle, fizyolojik PH ve sıcaklıkta hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehid yapısında ürünler glukoz gibi monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu oluşur. DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağ oluşturabilme özelliklerinden dolayı okzoaldehidler, antimitotik etki gösterirler. Bu nedenle kanser ve yaşlanma gibi olaylarla ilişkili oldukları düşünülmektedir [77, 78]. Özellikle glikozaminoglikan olan ve sinovyal sıvının viskozitesinde önemli rol oynayan hiyaluronik asit, O<sub>2</sub> tarafından depolimerize olarak, bağ dokunun stabilitesinin bozulmasına ve sıvının viskozitesinin kaybına neden olmaktadır [79].

### **2.3.Oksidatif, Nitrozatif ve Glikozatif Stres ve Biyobelirteçler**

#### **2.3.1. Biyobelirteçler**

Biyobelirteçler, organizmada ya da ürünlerinde ölçülebilen ve bir hastalığın varlığı, gidişi veya sonucu ile ilgili bilgi verebilen ve hastalığı etkileyebilen herhangi bir madde, yapı ya da süreç olarak ifade edilebilir [80]. Belirli bir enzim, hormon konsantrasyonu veya biyolojik bir maddenin varlığı, vücut sıvılarında veya dokularda yer alan ve kimyasal bir sürecin belirteci olarak görev alan bu biyolojik moleküllere örnek olarak gösterilebilir. Bununla birlikte hastalık riski, psikiyatrik bozukluklar, çevre etkileri ve metabolik süreç gibi sağlık durumlarını değerlendiren bir gösterge olarak biyobelirteçleri söyleyebiliriz [81].

Genel olarak normal biyolojik ve patolojik süreçlerin ve tedaviye yönelik uygulamalarda kullanılan farmakolojik yanıtların göstergeleri olarak somut bir şekilde ölçülüp değerlendirilebilmelidir. Biyobelirteçler, vücut sıvılarında, dokularda ve tüm organlarda ölçülebilir düzeyde bulunan, hücrenin normal ve patolojik durumlarını değerlendirebilen, aynı zamanda tedaviye yanıt olarak da düzeyinde değişiklik meydana gelen moleküllerdir [82].

Biyobelirteçler, invaziv biyopsi işlemlerinin azaltılması için, tedaviye verilen yanıtın takibi ve güvenliği açısından ve çalışmalarda yer alan hasta sayısının azlığından dolayı önemli ve gereklidir. Tedavi sürecinde hastalığın gelişimini biyobelirteçler tam olarak yansıtabilmelidir. Belirli bir hastalık durumunda, kolaylıkla ulaşılabilir dokularda ve vücut sıvısında bulunabilen ve hastalığın şiddetini ve gelişimini yansıtabilen biyolojik moleküller



taşıyıcı (surrogate) biyobelirteçler olarak adlandırılır. Nadir karşılaşılan hastalıklarda, klinik çalışmalara katılan hasta sayısı çok az olduğundan dolayı, kullanılan ilaçların yüksek fiyatları biyoteknoloji şirketleri için için riskli yatırımlardır ve klinik denemelerin tedavideki faydalarını ispatlamak için oldukça güçlü sonuçlara gereksinim vardır. Bu nedenle klinik denemelerle ilaçların terapötik etkinliklerinin belirlenmesinde biyobelirteçler önemli rol oynar [83].

Klinik olarak yararlı bir biyobelirteç şu özellikleri göstermelidir:

- Belirli bir hastalığa spesifik (tanısal belirteç),
- Prognostik,
- Çok sayıda örnekte ölçümü uygun maliyette ve tekrarlanabilir,
- Kimyasal ve metabolik olarak kararlı,
- Örneğin kolay elde edilebilmeli,
- Hastalık risk belirleyici,
- Hastalık gidişi ile korele,
- Tedavi etkinliğinin monitorizasyonu.

Biyobelirteçler, ulaşılabilir klinik materyallerden kolaylıkla ölçülebilmelidir. Doku biyopsisi gerektiren bir belirteç invaziv girişim olduğu için ideal olmayıp, ulaşılabilir klinik materyallerden kolaylıkla ölçülebilen biyobelirteçler ideal biyobelirteçlerdir. Bununla birlikte bir biyobelirtecin konsantrasyonu veya aktivite düzeyi, genel popülasyondaki aralığı çok geniş olmamalıdır. Biyobelirteç sadece ilgili hastalıklarda özgül olarak artış gösterirken, başka hiçbir durum ile aynı etkiyi göstermemelidir ki; hastalığın teşhis edilebilmesini kolaylaştırmış olmalıdır. Tedavi görmeyen hastalarda ve kontrol bireylerdeki biyobelirteçlerin ölçümleri örtüşmemeli, tedavi alanlarda ise biyobelirteçlerin düzeyi klinik-patolojik parametrelere göre hızla değişmelidir. Son olarak bu taşıyıcı biyobelirteçlerin konsantrasyonları veya aktiviteleri ucuz, güvenilir, hızlı ve tekrarlanabilir bir şekilde ölçülebilmelidir [83].

### **2.3.2. Oksidatif, Nitrozatif ve Glikozatif Stres Biyobelirteçleri**

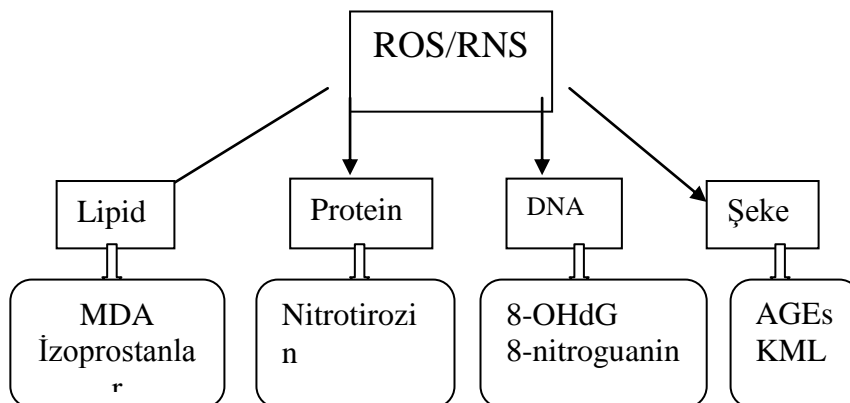
Oksidatif ve nitrozatif stresin giderek artan sayıda hastalığın başlangıcı ve ilerlemesi ile ilgili olduğu birçok çalışma ile tespit edilmiştir. Ancak, farklı patolojilerin tedavisi ya da önlenmesi için antioksidanların takviyelerinde yapılan büyük çaplı çalışmalarla, çok sayıda meta-analiz ve klinik denemeler tarafından belgelenen çelişkili ve çoğunlukla olumsuz sonuçlar elde edilmiştir [6]. Hastalık ve oksidatif, stres arasındaki açık ve net ilişki, bugüne kadar çoğu patolojik durumlar için kanıtlanmış olduğundan durum şu noktalara odaklanmaktadır:

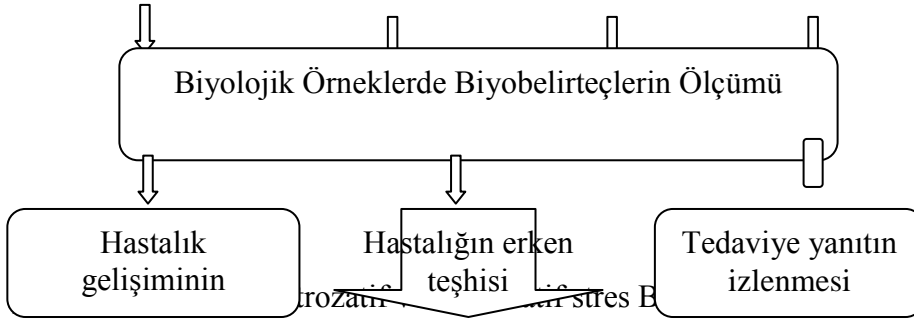
Analizler için biyobelirteçlerin ve biyolojik sistemlerin seçimi, oksidatif stresi değerlendirmek için analitik ve preanalitik yöntemlerde görünmeyen tehlikeler ve bilimsel yetersizlik [6].

Oksidatif ve nitrozatif hasarın ideal biyobelirteçlerini geliştirmek için esas amaç, hastalıkların önlenmesi için daha iyi araçlar bulmaktır. Son 2 yılda oksidatif ve nitrozatif stres biyobelirteçlerinin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar ile bunların hastalık önlemede yararlı olabildiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarla biyobelirteçlerin; spesifikliğı, depolamak için stabilitesi, tekrarlanabilirliği gibi özellikler değerlendirilmiştir. Ayrıca, hastalık ile nedensel ilişki ve antioksidan müdahale sonucundaki cevaba dayalı hayvan ve insan çalışmalarında oksidatif ve nitrozatif hasarın kullanılabilir biyobelirteçleri olduğunun doğrulanması için, sağlıklı bireylerde oksidatif ve nitrozatif hasarın bazal seviyeleri de incelenmiştir. Bununla birlikte iyi tasarlanmış, kontrol grubu kullanılarak yapılan çalışmalarla oksidatif ve nitrozatif hasarda antioksidanların uzun vadeli etkilerini belirlemek ve çalışmalar arasında bulguların tutarlılığını değerlendirmek gereklidir [5].

Oksidatif stres biyobelirteçleri, belirli bir hastalık için diagnostik olmaksızın birçok hastalık için ortak bir mekanizmanın belirteci olma özelliğindedir. Hastalık şiddetinin belirlenmesine, belirli tedavilerden (özellikle antioksidan tedavi) yarar görebilecek hastaların belirlenmesinde etkili olabilir. Özellikle DNA hasarının lipid peroksidasyonunun serum ve idrar metabolitlerinin ölçümü belirli bir süredeki kümülatif in vivo oksidatif stres değerlendirilmesinde yararlıdır. Bununla birlikte 3-nitrotirozin sepsiste CRP'den daha hızlı yanıt vermesi nedeniyle anti enflamatuvar ilaç tedavisine yanıtın izleminde oldukça etkilidir. Çoklu oksidatif stres parametreleri ile veritabanı (panel) oluşturulabilir. Ancak parametrelerin validasyonunun yapılması gereklidir. Oksidatif stres parametrelerinin düşük konsantrasyonlarda bulunmaları nedeniyle duyarlı yöntemlerin gerekliliğı bu çalışmalarda büyük önem taşımaktadır [84].

Son zamanlarda, oksidatif, nitrozatif stres biyobelirteçleri için deney yöntemleri ve ölçüm doğruluğunda büyük bir gelişme olmuştur. Epidemiyolojik çalışmalara biyobelirteçlerin dahil olması, hastalıkların ilerlemesi ve patogenezinde ROS ve RNS'nin rolünü anlamak için umut verici bir ortam sağlamıştır [5] (Bkz. Şekil 2.5).





### 2.3.2.1. Protein Oksidasyon Nitrasyon Biyobelirteçleri

#### 2.3.2.1.1. Protein Karbonil Grupları

Oksidatif/nitrosatif stresin protein biyobelirteçleri olarak (2- pirolidin ve 3- nitrotirozin gibi), proteinlerin karbonil grupları; aminoasit kalıntılarının direk oksidasyonu ile üretilirler. Bunlar özellikle lizin, arjinin, treonin ve prolin tarafından oluşturulur yada lipidler ve şekerlerin oksidasyon ürünleri ile ikinci bir reaksiyonla oluşturulurlar. ROS/RNS ile bağlantılı hastalıklarda 3-nitrotirozin düzeylerindeki yükseklik literatürde önemli bir kanıt olarak yer almaktadır [5].

Artan serbest radikallerin etkileri sonucu oluşan protein karbonil türevleri (PCO) protein oksidasyonunun en yaygın kullanılan belirteci olup, hastalıklar sonucunda oluşan oksidatif stres değerlendirilmede kullanılır [70, 71].

Proteinlerin oksidatif modifikasyonları proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında önemli değişikliklere neden olur. Pek çok çalışma ile biyolojik sistemlerde protein karbonillerinin erken oluşumlarının, ROS'nin hücrede öncelikli hücre hedefleri olduğu ve protein karbonillerinin artan düzeylerinin hastalıkla ilişkili işlev bozukluğunun bir belirteci olabileceği ileri sürülmüştür. Nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, hiperkolesterolemi ve juvenil kronik artritde protein karbonillerinin düzeylerinde artma, bu hastalıkların erken tanısı için protein karbonillerinin potansiyel biyobelirteç olarak görev alabildiğini göstermektedir. Protein karbonilleri yaygın olarak kullanılan, kimyasal olarak kararlı oksidatif stres biyobelirteçleridir. Protein karbonilleri diğer oksidasyon ürünleri ile karşılaştırıldığında kanda daha uzun süre kalır ve deney örneği -80 °C'de saklandığında en az 10 yıl boyunca kararlıdır [5].

Oksidatif ve Nitrozatif stres proteinler üzerinde geri dönüşümlü yada geri dönüşümsüz değişikliklere neden olabilir. Geri dönüşümlü değişiklikler, genellikle Cys kalıntılarında olur. Geri dönüşümsüz değişiklikler (di-Tyr oluşumu, protein-protein çapraz bağlanması, Lys ve Arg karbonilasyonu) genellikle kalıcı fonksiyon kaybı ile ilişkili olan ve ya hasar görmüş

proteinlerin bozunması ya da yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıklarda gözlemlendiği gibi stoplazmik inklüzyonlarda onların artan birikimine yol açabilir [85].

### **2.3.2.1.2. Tirozinin Nitrasyonu**

Tirozinin oksidatif hasarının *in vivo* mekanizmalarının altında yatan stratejik anlayış, farklı reaksiyon yolları tarafından üretilen protein oksidasyonu sonucu karalı olan son ürünleri tespit etmektir. Özellikle, hipobromus asit serbest radikal yollarının etkisiyle, HOCl asit eosinofil peroksidaz katalizli reaksiyon yollarının etkisiyle, miyeloperoksidaz katalizli reaksiyon yolları ve RNS katalizli (NO<sub>2</sub>-Tyr, di-Tyr, 3,4-dihidroksialanin ve guanin) oksidasyonla üretilen spesifik tirozin türevleri için karakterize edilmiştir.

Peroksinitrit genellikle tirozin nitrasyonunun temel aracı olarak görülür ve onun konsantrasyonu modifikasyonlarda bir belirleyici faktör olabilir. Ancak diğer basit tirozin nitrasyon yolları da, miyeloperoksidaz ve peroksidaz aktivitesine duyarlı metalloproteinler vasküler bölümlerde tirozin nitrasyonunu katalizleyebilen inflamatuvar oksidatif reaksiyonlar sırasında da etkili olabilir. Çünkü peroksidaz bağımlı tirozin nitrasyonunu destekleyen yüzeyler miyeloperoksidaz bağımlı nitrasyon için bol miktarda kullanılabilir şekildedir. Birden çok vasküler inflamatuvar olaylarda doku NO<sub>2</sub>-Tyr oluşumu için olası birçok mekanizma vardır. Tirozin nitrasyonu genelde proteinlerdeki belirli Tyr kalıntılarının lokal ortamından dolayı seçicidir.

Tirozin kalıntılarının modifikasyonları protein fonksiyonlarını değiştirebilir; çünkü aromatik halka üzerine hacimli grupların katılması fenolik grubun PKa'sını düşürür, elektron transfer reaksiyonlarında ve protein yapısının onarım fonksiyonlarında Tyr'nin kapasitesini etkileyen hem sterik hem de elektronik düzensizlikler oluşturur. Buna dayanarak, tirozin nitrasyonunun ya kazanç yada fonksiyon kayıplarına neden olduğu rapor edilmiştir; bu durum enzimatik yada enzimatik olmayan mekanizmalar ile azaltılabilir yada ortadan kaldırılabilir. Esas olarak NO<sub>2</sub>-Tyr kazancına rağmen, eş zamanlı olarak di-TYR oluşumunu uyarabilir ve aslında bozulmuş protein asıl sebebi olabilen, hatta daha fazla RNS'e duyarlı protein hedeflerinin oksidatif modifikasyonlarını uyarabilir. Bu nedenle, tirozin nitrasyonu benzer olabilir; ancak enzim/protein disfonksiyonuna neden olmayabilir.

Tirozin nitrasyonu için farklı yolların varlığı inflamasyon ve hücre sinyalizasyonunda bu süreçlerin potansiyel önemini vurgular. Böylece bu translayon sonrası protein modifikasyonu, sıklıkla inflamatuvar durumlar sırasında değişmiş protein fonksiyonuna bağlı oksidatif ve nitrozatif hasarın bir belirtecidir. NO<sub>2</sub>-Tyr oluşumunun geri dönüşümü de, tirozin nitrasyonunun sadece RNS oluşumunun değil aynı zamanda olası değişmiş protein fonksiyonlarının da bir belirteci olduğunu gösterir. Bu bağlamda, inflamatuvar olaylarda NO<sub>2</sub>-

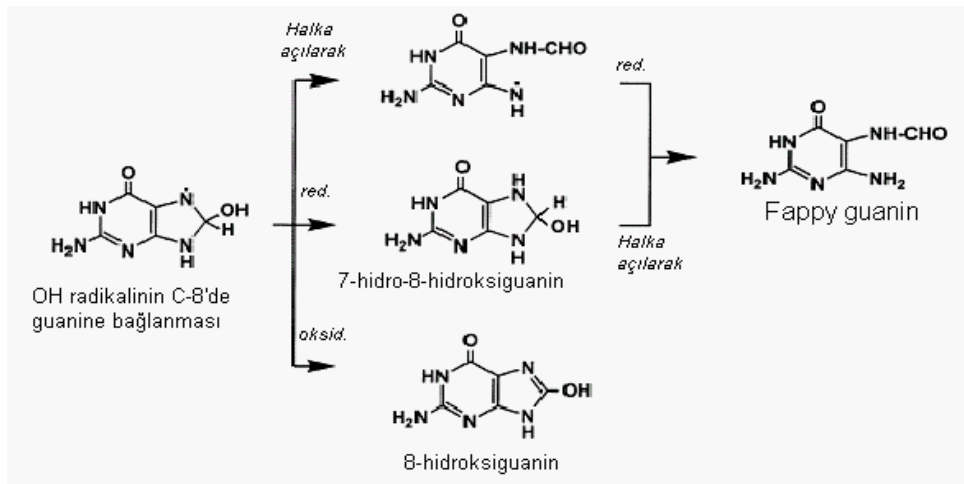
Tyr ürünleri oluşumu, hücre sinyalizasyonu sırasında tirozin fosforilasyonunun derecesine göre aynı derecede öneme sahip olduğu dikkat çekicidir.

Protein tirozin nitrasyonu normal koşullar altında birçok dokuda tespit edilmiştir. Bazal protein nitrasyonu, kalp damar sisteminde tüm önemli hücre tiplerinde bulunmuştur. Bazal protein nitrasyonu (NO<sub>2</sub>-Tyr), sağlıklı kişilerin plazma proteinlerinde (LDL ve albümin) tespit edilmiştir. Bu veriler düşük seviyelerdeki tirozin nitrasyonunun bir sinyal yolunun fizyolojik bir düzenleyicisi olabilirliği hipotezi ile de tutarlıdır [85].

### 2.3.2.2. DNA Oksidasyon Nitrasyon Biyobelirteçleri

#### 2.3.2.2.1. 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin (Bkz. Şekil 2.6)

Oksidatif modifiye DNA lezyonlarının yüksek seviyeleri yaşamın ilerleyen döneminde kanser gelişme riskinden sorumlu kabul edilir. Hücrelerde oksidatif DNA hasarını en iyi temsil eden bir ürün olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), oksidatif olarak modifiye olmuş DNA bazı guaninin bir ürünüdür [5,73]. Guanin molekülünün 8. Pozisyona OH radikallerinin etkimesi ile değişikliğe uğrayan DNA'daki oksidatif hasar sonucu 8-OHdG meydana gelir. Bununla birlikte guanin bazlarına Cu<sup>+2</sup> iyonlarının yüksek afinite ile bağlanması sonucunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile etkileşime girerek DNA hasarını artırır. DNA hasarının düzeyinin belirlenmesinde, 8-OHdG formunda oksidatif değişikliğe uğramış DNA kullanılır [73].



Şekil 2.6. 8-Hidroksi guanin oluşum mekanizması

DNA üzerine oksidatif hasarın bir göstergesi olarak yükselmiş 8-OH-dG düzeylerinin, potansiyel mutajenik özelliğe sahip olup doku, plazma ve idrarda biyokimyasal belirteç olarak kullanılmaktadır [5, 76, 86]. 8-OHdG parkinson hastalarının idrarında, kalp yetmezliği bulunan hastaların miyokardiyum ve serumda yüksek seviyelerde bulunmuştur [5]. Reaktif radikallerin DNA'da yol açtığı hasar sonucu oluşan ürünler birçok yöntem kullanılarak tespit edilir [5, 87].

### **2.3.2.2.2. 8-Nitroguanin**

Çeşitli patofizyolojik durumlarda üretilen nitrojen ( $\text{NO}_2$ ) ve peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) gibi RNS tarafından guanin nitratlanabilir ve serbest formda yada DNA/RNA yapısındaki nükleosidlere ve nükleotidlere bağlıdır. 8-nitroguanin, RNS tarafından oluşturulan nitrozatif hasarın tipik bir DNA nükleobaz ürünüdür.

Pek çok çalışma ile normal dokularda 8- nitroguaninin tespit edilemediği gösterildi; ama çoğunlukla inflamasyon dokularda epitelium hücreleri veya inflamatuvar hücrelerin çekirdeğinde tespit edildi. 8-nitroguanin inflamasyon dokularda RNS tarafından uyarılmış oksidatif DNA hasarı için potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilceği bu çalışmalarda belirtmiştir. RNS aşırı üretiminin olduğu çeşitli inflamatuvar koşullar altında karsinojen dokularda 8- nitroguaninin son bulguları, inflamasyona bağlı hastalık yaşayan bireylerde kanser gelişimi için bir risk faktörü olabileceği anlamına gelmektedir. HPLC (ECD), HPLC (UV), GCMS ve immünohistokimyasal birçok yöntem 8-nitroguanin ölçümü için geliştirilmiştir. Son yıllarda Sawa ve ark.'ları tarafından HPLC (ECD) ile yapılan bir anti 8-nitroguanin antikoru ile immünafinite kolonları kullanılarak insan idrarında 8-nitroguanin ölçmek için hassas bir yöntem geliştirmişler ve bu çalışmada sigara kullanan bireylerde 8-nitroguanin düzeylerinin yükselmiş olduğunu tespit etmişlerdir [5].

### **2.3.2.3. Lipid Oksidasyon Nitrasyon Biyobelirteçleri**

#### **2.3.2.3.1. Malondialdehid (MDA)**

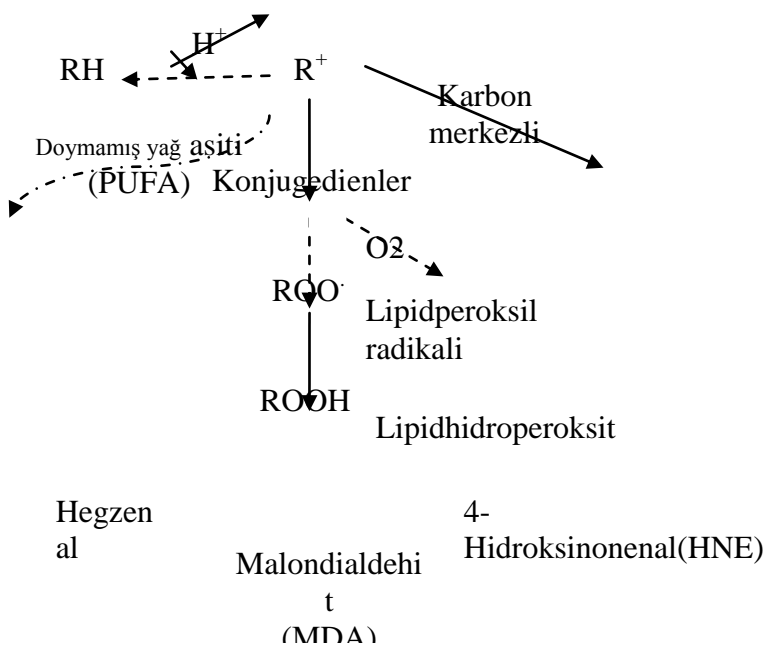
Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır (Bkz. Şekil 2.7). Lipid peroksidasyonu enzimatik ve nonenzimatik olarak iki şekildedir. Nonenzimatik lipid peroksidasyonunda; poliansature metilen karbonundan herhangi bir radikalın hidrojen atomunu uzaklaştırması ile gerçekleşir. Enzimatik lipid peroksidasyonu ise, hidroperoksidler ve endoperoksidlerin siklooksigenaz ve lipooksigenaz reaksiyonları sonucu oluşumları ile gerçekleşir [87].

Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan, çok zararlı bir zincir reaksiyonudur ki; bu reaksiyon ile membran lipid yapısı değişir ve dolaylı olarak da reaktif aldehydler üretilir. Bunun sonucunda hücre bileşenlerinin yapı ve fonksiyonları zarar görür. Otokatalitik olarak zincirleme olarak devam eden bu reaksiyon, eğer durdurulmazsa hücre membran akışkanlığında bozulma, membran potansiyelinde azalma, membranların iyon geçirgenliğinde artmaya neden olarak, membranların parçalanarak organellerden lizozomal enzimlerin açığa çıkmasına neden olur. Bu durumda otoliz meydana gelir [88, 89].

Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu için fosfolipaz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) gerekir. Hücre membranlarında bol miktarda poliansatüre yağ asitleri (PUFA) bulunur, bunlar özellikle beyinde serbest radikal ataklarına yatkındır. Membran hasarının nasıl onarıldığı tam açık değildir, fakat olası bir mekanizma şudur: PLA<sub>2</sub> peroksitlenmiş yağ asitlerini membrandan hidrolize eder. Böylece peroksitlerin serbest radikallere yıkımını önler ve hasarlı membran fosfolipidlerini temizler [90].

Klinik çalışmalarda, in vivo lipid peroksidasyonunu belirlemek için yapılan oksidasyon ürünlerinin ölçümleri; doku, plazma ve idrarda yapılmaktadır. Bu ölçümler lipid peroksitlerin karasız yapılarından dolayı kısa zincirli alkanlar, aldehidler gibi ürünler ile yapılır. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan, TBARS (Tiyobarbitürik asit-reaktif maddeler) olarak adlandırılan lipid hidroperoksidleri ve aldehidler MDA eşdeğerleri olarak spektrofotometrik ve florometrik metodlarla ölçülebilirler [65, 91, 92].

Oksidatif stres lipid biyomarkırı olarak MDA, hücre membranlarında ya da low-density lipoprotein (LDL)'lerde lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir. MDA düzeyleri genellikle tiyobarbitürik asit deneyi ile spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu deney lipid peroksidasyon araştırmalarında en sık kullanılan yöntemdir; ancak bazı bilim adamları onun klinik yararı konusunda kuşkuludur; çünkü MDA dışındaki bazı aldehitler lipid peroksidasyonunda üretilebilirler ve MDA gibi absorbans aralığı da aynıdır [5, 90].

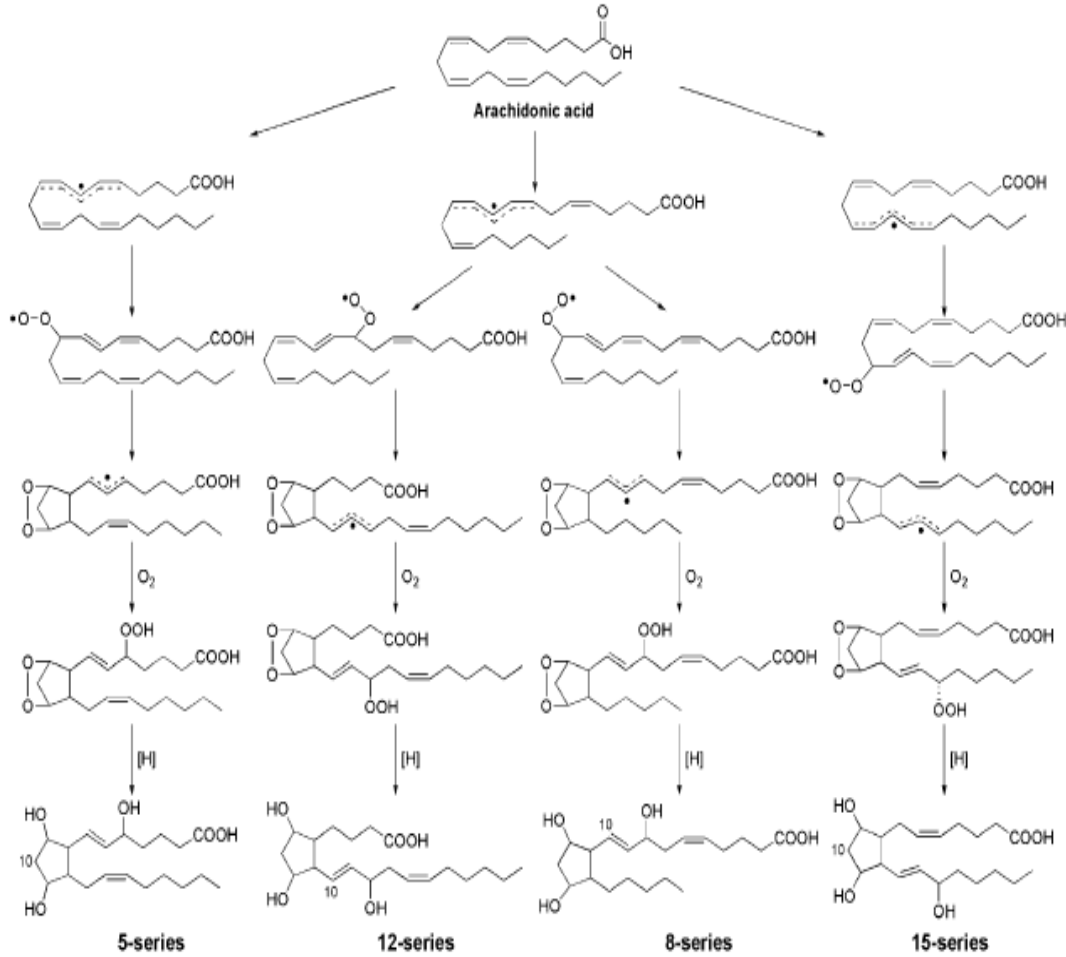


Şekil 2.7. Reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan lipid peroksidasyon ürünleri [65, 87].

TBARS deneyinde bu kromojenlerde girişim yapabilir. Bu nedenle HPLC tabanlı MDA deneyi ile diğer aldehitlerden MDA ayrabilir. HPLC tabanlı MDA ölçümü lipid peroksidasyonu ölçümünde çok sayıda biyolojik örneğin analizi için yararlı bir yöntem olarak tavsiye edilir [5, 90].

### 2.3.2.3.2. F2-İzoprostanlar

İzoprostanlar (izoPs) lipid peroksidasyonunun ve enzimatik olmayan bir serbest radikal katalizli reaksiyon ile esterleşmiş poliansature yağ asitlerinden (PUFA) sentezlenmiş prostaglandin benzeri yeni bir bileşik grubudur [5, 92-94] (bkz. Şekil 2.8). Prostaglandinlerden farklı olarak, siklooksigenaz enzimlerinin etkisiyle, F2-izoPs araşidonik asitin serbest radikal aracılı peroksidasyonunun bir sonucu olarak nonenzimatik yollarla oluşturulur [95].



Şekil 2.8. F2-izoPs'ların oluşum mekanizmaları

Bir bisallilik hidrojen atomu çıkarıldıktan ve bir peroksil radikali oluşturmak için araşidonik asite bir oksijen molekülün ilavesinden sonra peroksil radikali 5-ekzo siklizasyona uğrar ve bir oksijen molekülü PGG2 benzeri bileşikler oluşturmak için bileşiğin omurgasına



ilave olur. Bu kararsız bisikloendoperoksit arabileşigi F2-izpPs'a sonra indirgenir. Dört F2-izoPs rejoyoizomerlerin üretimi de bu oluşum mekanizmasına dayanır. Bu bileşikler hidroksil bağlı karbon atomu üzerinde 5,12,8 yada 15-serisi rejoyoizomerleri olarak ifade edilirler. İzoPs F-tipi prostan halkalar içeren PGF2 $\alpha$ 'ya izomeriktir ve bundan dolayı F2-izoPs olarak anılırlar.

İzoPs'ler ve siklooksigenaz türevi PG'ler arasındaki en önemli yapısal farklılık, PG'ler özellikle trans yan zincirlere sahipken, izoPslar prostan halkaya cis yönünde yan zincirler içermeleridir [97]. Bir diğer fark ise PG'ler yalnızca serbest araşidonik asitten üretilirken, izoPs'lar fosfolipitlere esterleşmiş olduğu yerde oluşturulur ve daha sonra bir fosfolipaz tarafından serbest bırakılırlar [96-98]. Dokulara hem esterleşmiş hem de serbest asit formunda dağıtırlar. Vücudun her yerinde bulunan çeşitli hidrolitik enzimler doku bölümlerinde bu moleküllerin esterleşmiş şekliinden serbest izoPs'ların oluşumu için esas olarak sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu hızlı deesterifikasyon aşaması, muhtemelen dokularda serbest izoprostanların salınımı ve periferik dolaşımında onların daha fazla kullanılabilirliği için; hız kısıtlayıcı adımlardan biri olarak kabul edilebilir. Bu reaksiyon, periferik dolaşım içerisinde etkili salınımı dokularda serbest izoPs'ların varlığı için önemli esterleşmiş izoPs'ların enzimatik bozunumunun ilk adımıdır. Bu adım enzimatik üretilen PG'lerinki olaylardan farklıdır [97].

F2-izoPS'ların ölçümü in vivo lipit peroksidasyonu ve oksidatif stres durumunun biyobelirteçleri içerisinde yer alır. D2 ve E2-izoPs'lar gibi izoprostan yolunun diğer ürünleri daha az kararlı oldukları için biyobelirteç olarak kullanıma uygun değildirler. Oysaki F2-izoPS'lar, lipit peroksidasyonunun ana ürünü olmalarına rağmen, onların kararlı halleri, son dönemdeki yöntemlerle düzeylerinin ölçümü için kolaylık sağlamıştır [98].

İzoprostanlar yalnız oksidatif stresin biyobelirteçleri değil, hemde oksidan hasarın patofizyolojik araçları olarak görev aldıklarını düşündüren sayısız biyolojik etkileri vardır [98]. Biyolojik olarak aktif F2-izoPs'lar sürekli olarak oluşur ve çeşitli dokularda, vücut sıvılarında tespit edilebilir miktarlarda bulunurlar ve hatta normal bazal koşullarda bile tespit edilebilirler; ki bu in vivo lipit peroksidasyonu yada oksidatif stresin herhangi bir derecesinin ardından F2-izoPs'ların düzeylerindeki değişimleri değerlendirmek için olanak sağlar. Bu bileşiklerin, normal fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesindeki etkileri henüz tam anlamıyla açığa kavuşmamıştır. Bununla birlikte bu bileşikler, hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda güçlü biyolojik aktiviteleri ve lipit peroksidasyonunun güvenilir bir biyobelirteci olarak kullanılabilirliği bilim adamlarının büyük ilgisini çekmektedir [97].

F2-izoPs'ların ölçümü, oksidatif stresin diğer biyobelirteçlerine göre bir çok avantaja sahiptir. F2-izoPs'lar;

1. Kimyasal olarak kararlıdır,
2. Peroksidasyonun spesifik ürünleridir,
3. İn vivo olarak oluşur,
4. Normal dokuda ve biyolojik sıvılarda tespit edilebilecek miktarlarda bulunur, böylece normal aralığın tanınmasına olanak sağlarlar,
5. Hayvan modellerindeki oksidan yaralanmalarda düzeylerinde belirgin bir artış görülür,
6. Diyetteki lipid içeriği tarafından düzeyleri etkilenmez,
7. Antioksidanlardaki doz bulma çalışmalarında hassas bir biyokimyasal temel sağlayabilir [97, 98].

F2-izoPs'lar biyolojik örneklerde MS (Kütle Spektrofotometresi) teknikleri (GCMS, GC-MS/MS, LCMAS/MS) ile doğru bir şekilde ölçülebilmektedir. İmmünoanalizler (ELISA, RIA) düşük maliyet ve kullanım kolaylığından dolayı F2-izoPS'ların ölçümü için sıklıkla kullanılan tekniklerdir. F2-izoPS'lar izole numunelerde kararlıdır ve numuneler izoPs ürünlerinin artifactual oluşumunu önlemek için -70 °C'de depolanması gerekir. MDA'nın aksine F2-izoPs düzeyleri diyetdeki lipid içeriğinden etkilenmez [5].

#### **2.3.2.4. Şekerlerin Oksidatif Modifikasyonu: Gelişmiş Glikasyon Son Ürünleri (AGE)**

##### **2.3.2.4.1. Glikozilasyon ve Glikasyon**

Zarsal ve hücre dışı proteinlerin bir kısmı sentezlendikten sonra, yapıları ve fonksiyonları için önemli olan modifikasyonlara uğrar. Bu proteinlerin yapısına değişik oligosakkarid üniteleri takılarak modifikasyonlar gerçekleştirilir. Protein glikozilasyonu olarak bilinen bu tür modifikasyonlar proteinlerin sentezinden sonra gerçekleşir. Proteinlerin karbonhidratlarla yapmış olduğu bu reaksiyonlar oldukça özgül ve enzimatik olarak katalizlenen reaksiyonlardır.

İndirgeyici şekerler ile şekerlerin metabolik türevleri, herhangi bir enzim tarafından katalizlenmeden de, proteinler ile tepkimeye girebilirler. İndirgeyici şekerlerin proteinlerle kendiliğinden gerçekleşen bu modifikasyonu protein glikasyonu olarak adlandırılır [99, 100].

##### **2.3.2.4.2. Proteinlerin Glikasyonu**

Glukoz gibi indirgeyici bir şekerin karbonil grubu ile proteinlerdeki lizin aminoasidinin yan zinciri olan ε-pozisyonundaki amino grubu arasında olan kondensasyon tepkimesi, glikasyon tepkimesinin ilk basamağıdır (Bkz. Şekil.2.9 ve 2.10). Bu tepkime ile önce ara ürün ketimin

yapıdaki “Schiff bazı” oluşur. Bu ara ürünün kararlı hale gelmesi için; ya su katılmasıyla tepkime tersine döner ya da daha kararlı bir ara ürün olan 1-amino-1-deoksi-2-ketoz (ketoamin veya fruktozamin) formuna tersinmez spontan olarak çevrilir. Bu kararlı ketoamin formunun oluşumu “Amadori düzenlenmesi” olarak adlandırılır [99-101].

Vücut sıvılarında en çok bulunan karbonhidrat glukozdur ve bu nedenle glikasyondan sorumlu başlıca moleküldür. Hemiasetal veya hemiketal yapıdaki şekerler amadori tepkimesine girmediklerinden, lineer yapıda serbest karbonil grubuna sahip olanları daha etkili glikasyon ajanlarıdır. Şekerlerin fosforile olması da reaktiviteyi arttırmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, konsantrasyonları düşük olsa bile özellikle hücre içi koşullarda glukoz metabolitleri en az glukoz kadar etkili glikasyon ajanlarıdır [99,101].

İlk kez 1812 yılında Louis Camille Maillard tarafından “Gelişmiş glikasyon son ürünleri (AGE)” tanımlanmıştır. AGE’ler ilk kez gıda kimyasında kullanılmasından sonra, 1968 yılında HBA1c’nin diyabetik hastalarda keşfi ile AGE’ler araştırılmaya başlanmıştır [100, 101, 104].

Protein glikasyonu, şekerin karbonil grubu ile proteinin serbest amino grubunun Schiff bazı oluşturmasıyla başlamaktadır. Schiff bazı oluşumu saatler içerisinde gerçekleşmektedir ve sonrasında günler içerisinde Amadori ürünlerine dönüşmektedir. Amadori ürünleri ise daha sonra dikarbonil bileşiklerine ve sonrasında da haftalar içerisinde AGE’lere dönüşmektedir [100, 103-108].

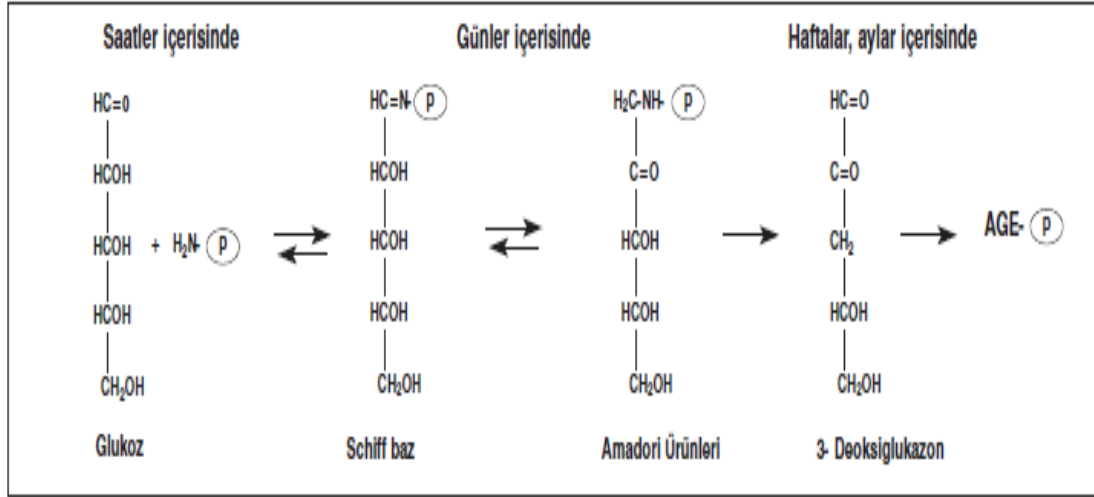
AGE oluşumunda diğer bir mekanizma ise diyabette artmış olan oksidatif strese bağlı olarak şeker veya lipidlerin oksidasyonu sonucunda ara ürün olarak reaktivitesi yüksek 3-deoksiglukozon, glioksal ve metilglioksal gibi düşük molekül ağırlıklı dikarbonil bileşiklerinin oluşumudur. Genel olarak glikoliz ara ürünlerinden, glikasyona uğramış proteinlerin degradasyonundan ve lipidlerin peroksidasyonundan dikarbonil bileşikler oluşabilmektedir. Bu yollara ilave olarak metilglioksal, keton cisimlerinin metabolizması ve treonin katabolizması yollarıyla da az miktarda oluşabilmektedir. Dikarbonil bileşikler yüksek kimyasal aktiviteye sahiptir ve çok küçük konsantrasyonlar da bile direkt olarak proteinlerin terminal aminoasit rezidüsüyle reaksiyona girerek AGE oluşumuna yol açabilmektedir [99, 100, 103, 108].

AGE oluşumunda önemli diğer bir mekanizma ise poliollu yolağıdır. Diyabete bağlı olarak ortaya çıkan yüksek miktarda glukozun bir kısmı önce sorbitole, sonrasında ise bir AGE ara ürünü olan 3-deoksiglukozon’a dönüşüp AGE oluşumuna katılmaktadır (Bkz. Şekil 2.7). Ancak bu reaksiyonlar da NADPH ve glutatyon tüketimine yol açtığından dolayı dolaylı olarak oksidatif stresin artmasına da yol açmaktadır [105]. AGE oluşumunda bu şekilde

birçok mekanizmanın rol oynaması AGE'lerin heterojen bir yapıya sahip olmasına yol açmaktadır [103, 105, 108].

Heterojen yapıya sahip olan bu AGE'ler kimyasal yapılarına göre 3'e ayrılırlar:

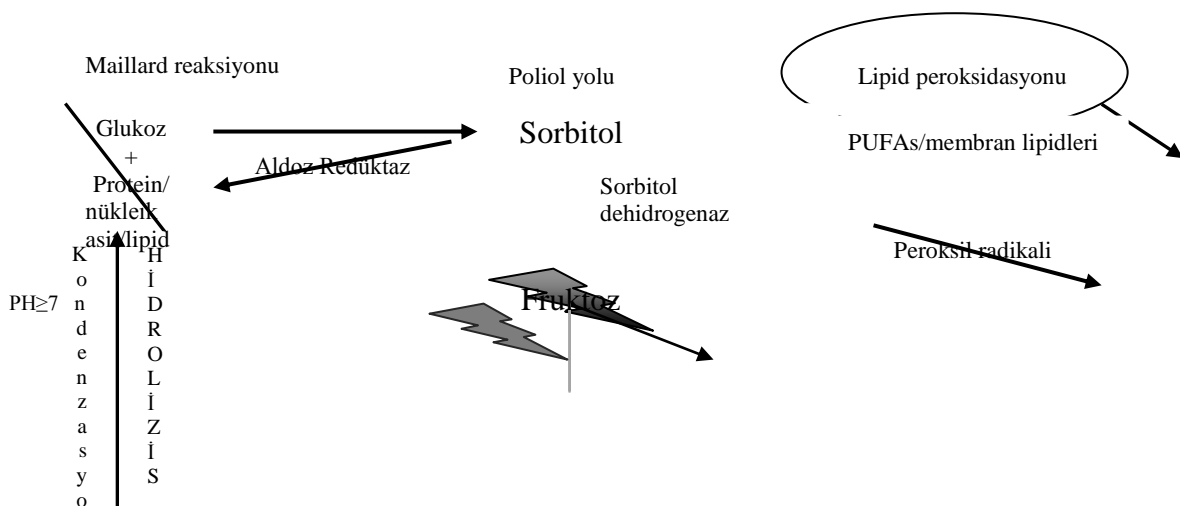
1. Floresans çapraz bağlı AGE'ler; pentosidine ve kroslin
2. Non-floresans çapraz bağlı AGE'ler; glucosepane ve MOLD
3. Çapraz bağ yapmayan AGE'ler; N-Karboksimetil lizin (CML) ve Pyrraline

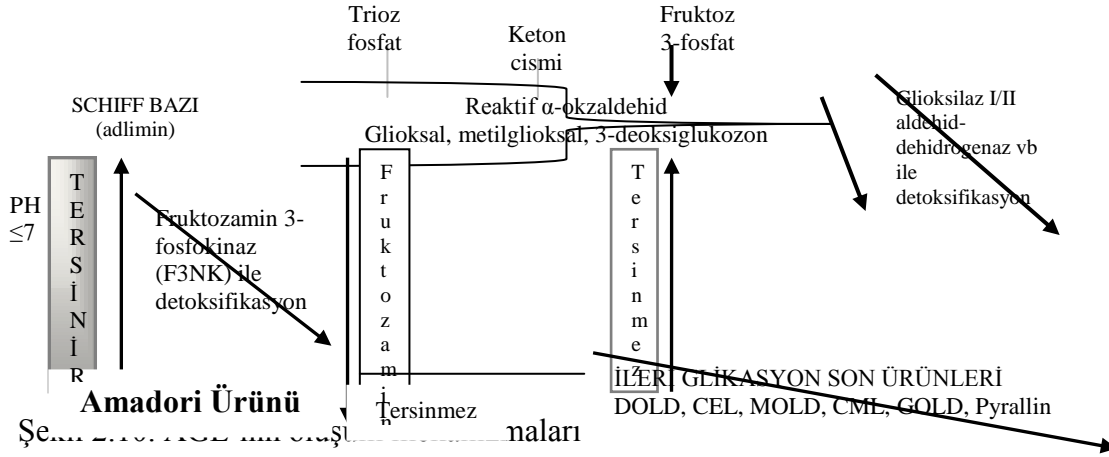


Şekil 2.9. Proteinlerin glikasyonu ve AGE oluşumu

CML organizmada oluşan major AGE'lerden biridir ve üzerinde en fazla çalışılmıştır. Yaşlanma ve patolojik durum belirteci olarak ölçümlenen CML ve pentosidin serum düzeylerinin çocukluluktan yaşlılığa kadar 5 kat arttığı bildirilmiştir. Ancak bu belirteçlerin düzeyleri her dokuda eşit oranda artmaz; örneğin pentosidinin en çok renal kollojende biriktiği, deride daha az düzeylerde biriktiği saptanmıştır [102, 105].

Amadori ürününün oksidatif yıkımı ile oluşan karboniller ve dikarboniller reaktif ara ürün olduklarından, proteinlerdeki diğer lizin ve arjinin aminoasitlerinin yan grupları ve N-terminal amino grubu ile tepkimeye girerek proteinler arasında çapraz bağlanmalara neden olur. Çapraz bağlanma ile oluşan protein agregatları proteazların etkilerine dirençli olduklarından özellikle bağ dokusunda kalıcıdır [100, 103, 108].





### 2.3.2.4.3. Lipidlerin Glikasyonu

Glikasyon tepkimesi karbonil grubu ile amino grubu arasında gerçekleşen bir tepkime olduğundan, teorik olarak sadece fosfotiletanolamin (PE) ile fosfotilserin glikasyona uğrayabilir; ancak sadece fosfotidiletanolaminin glikasyona uğrayabildiği gösterilmiştir. Hücre zarlarında ve lipoproteinlerin yapısında polar gruplar her zaman sulu ortam yönünde düzenlendiklerinden, fosfotiletanolamin glukoz ile tepkimeye girmek için uygun konumdadır. Glikasyon tepkimesiyle oluşan fosfotidiletanolamin amadori ürünleri karalı değildir ve kendiliğinden oksitlenerek, yıkılarak reaktif oksijen türlerinin oluşuna neden olur. Reaktif oksijen türleri de zarlarda lipidlerin peroksidasyonuna neden olarak aterogenez, diyabet gibi patolojik süreçlerde görülen zarlardaki değişimlere katkıda bulunur [100, 104, 109].

LDL'nin artmış glikasyonu LDL'nin reseptörü tarafından tanınmasını engeller ve serum klirensini de azaltır. Glikasyona uğramış LDL makrofaj çöpçü reseptörleri tarafından alınır ve köpük hücresi oluşumuna neden olur. LDL'nin aksine HDL'nin glikasyonu onun metabolizmasını arttırır. Bunun yanı sıra damar yapısında AGE bağlanmış kollojen, LDL'yi bağlayarak plak oluşumunu hızlandırır [103].

### 2.3.2.4.4. Nükleik Asitlerin Glikasyonu

Glikasyon tepkimesi için, nükleik asitler ve nükleotidlerin yapısında bulunan, birer serbest amino grubu içeren adenin, guanin ve sitozin bazıları glikasyon tepkimesine elverişlidir. Nükleobazların glikasyonu, proteinlerin glikasyonu ile karşılaştırıldığında nükleobazların glikasyonu ve glikasyon ürünlerinin birikimi daha düşük düzeydedir. Bunun nedeni glikasyona uğrayan serbest nükleotidlerin vücuttan kolaylıkla atılmalarıdır. Glikasyona özellikle DNA'daki guanin bazıları yatkındır, ancak guanin glikasyon ürünündeki kararlı olmayan N-glikozidik bağ nedeniyle hidrolize uğrayarak DNA üzerinde apürinik bölgeler oluşturur. Oluşan apürinik DNA bölgeleri DNA onarım mekanizmalarıyla onarılmak, DNA üzerinde glikasyon ürünlerinin birikimi engellenmiş olur [100, 105, 110, 111].

#### 2.3.2.4.5. AGEs'lerin Doku ve Hücre Düzeyinde Etkileri

İlk kez 1992 yılında karboksimetillizin içeren proteinleri bağlayan, zarsal reseptörler olarak tanımlanan glikasyona uğramış proteinlerin hücre zarındaki reseptörleridir. Bu reseptörler aracılığıyla ileri glikasyon ürünleri, etkilerinin önemli bir kısmını gösterir.

AGE reseptörleri (RAGE), amiloid- $\beta$ , inflammatuar sitokinler, amfoterin ve diğer fibriller proteinler gibi çok sayıdaki biyolojik ligand tarafından aktive edilen, immün globülin üst ailesine ait çok ligandlı bir reseptör grubudur. Bu reseptörlerin zarsal ve çözünür formları bulunur. Çözünür RAGE'leri hücre dışında ve dolaşımda bulunan reseptörlerdir, ya sentezlendikten sonra hücreden dışarıya salınırlar yada zarsal reseptörlerin trans membran ve sitoplazmik C-terminal bölgesi koparılmış formudur. RAGE'ler serbest formdaki glikasyon son ürünlerini değil, sadece ileri glikasyon ürünleri içeren proteinleri bağlar. Aslında karboksimetillizin AGE reseptörlerine bağlanmaz ve aktive etmez; ancak karboksimetillizin içeren proteinler RAGE'leri tarafından özgül olarak tanınır.

Çözünür RAGE'ler glikasyona uğramış olan proteinlerin, biyolojik ligandların hücre dışında ve dolaşımda bulunanlarını bağlar ve bunların zarsal RAGE 'lere bağlanmasını engeller. Bu şekilde zarsal RAGE'lerin ligandlar tarafından aktivasyonuna engellediği ve bundan dolayı koruyucu fonksiyonlarının dışında başka etkilerinin olmadığı kabul edilir [100, 103, 112, 113].

RAGE'ler damar ve dokularda çok az ekspresse edilirken, başlıca mononükleer fagositler, endotel hücresi, düz kas hücresi ve astrositlerde bulunur [103].

Reaktif kimyasal bileşikler olan ve protein glikasyonu ve lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan karboniller, tepkimeye girdikleri proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere neden olurken; bu direkt etkileri, AGE reseptörlerinden bağımsız olarak gerçekleşir. Bununla birlikte, yapıları değişmiş bu proteinler aynı zamanda RAGE'lerin ligandlarıdır. Bu ligandlar tarafından aktive olan RAGE'lerin etkileri ile hücre ve dokularda oksidatif ve nitrozatif stres artar [100, 103, 105, 108]. Proteinlerin glikasyonunun doğrudan ya da AGE reseptörleri aracılığıyla neden olduğu belirlenen hücre ve dokulardaki başlıca etkileri şu şekilde sıralanabilir:

1. Lipid peroksidasyonunda artış: Oksijen radikalleri oluşumundaki artmaya, protein glikasyon ürünlerinin oksidatif yıkımı ve RAGE'lerin aktivasyonu ile artan oksidatif stres neden olur. Glikasyon sonucu son derece önemli bir antioksidan enzim olan SOD inhibe edilir. Nitrik oksit düzeyi bu oksidan koşullarda azalır, endotelin-1 sentezi artar. Tüm bu etkiler ile lipid peroksidasyonu ve vazokonstrüksiyondaki artış hücre ve doku düzeyinde gerçekleşir [100, 103, 105].

2. Hücresel aktivitelerin indüksiyonu: proteinlerin glikasyonu ve RAGE'lerin gliko proteinler ile aktivasyonu VCAM-1, IL-1, TNF- $\alpha$  ve IGF-1A gibi sitokinlerin sentezini ve salgılanımını artırır. Mitogenez, mononükleer hücrelerin kemotaksisi, T-hücrelerinin aktivasyonu ve  $\gamma$ -interferon oluşumu, inflamatuvar sitokinlerin artışına bağlı olarak artar. Hücrelerin bu şekilde gereksiz uyarılmaları, şekli değişen dokuları ve kalınlaşmış bazal membranı oluşturur [100, 103, 105, 114].

3. Proteinlerde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler: Protein glikasyonu sonucunda, proteinlerde net yük ve konformasyon değişikliği olur. Bununla birlikte aynı veya farklı proteinler arasında oluşan kovalent çapraz bağlanmalar sonucu oluşan agregatları, proteazlara karşı direnç kazanarak yıkılamazlar. Aynı zamanda hücrelerin adhezyon ve yayılım özellikleri de etkilenir. Bu etki hücre zarı ve dışındaki matriks proteinlerinin glikasyonu ile hücre-matriks etkileşiminin değişmesinden kaynaklanır.

4. Tromboz ve fibrinoliz üzerindeki etkileri: Protein glikasyonu doku ile ilgili trombomodülün sentezini azaltırken, tromboz faktörlerini ve platelet agregasyonunu artırır [100, 103, 105].

AGE'lerin bu etkilerinin yanı sıra insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi sitokinlerin salınımını artırır. Monosit ve makrofajların migrasyonunu arttıran bu sitokinlerin salınımı, aynı zamanda düz kas hücre proliferasyonunu da arttırarak plak oluşumunu hızlandırır. AGE'lerin T lenfosit üzerindeki RAGE reseptörüne bağlanarak  $\gamma$ -interferon yapımını uyarır doku hasarına neden olur [103].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- ELISA okuyucusu (GF-M3000; Çin Halk Cumhuriyeti)
- ELISA mikro plak yıkayıcısı (GF-W3000; Çin)
- Sabit başlıklı masa üstü santrifüj (Hettich Rotina 380R; Almanya)
- Mikro santrifüj (Eppendorf 5415C; Almanya)
- Manyetik Karıştırıcı (Nüve MK 218; Türkiye)
- PH metre (ADWA; Romanya)
- Hassas terazi (Sartorius; Almanya)
- Derin dondurucu (Ariston; İtalya)
- Buzdolabı (Arçelik ; Türkiye)
- Vorteks (WiseMix; Kore)
- Otomatik pipetler (Gilson; ABD)

- Çeşitli ebatlarda erlen, beher, balon joje, cam pipet ve mezürler (Teknik cam, Türkiye)
- Otomatik pipet uçları (Mavi, sarı, beyaz, Gilson; ABD)
- Ependorf tüpler (1 ml, 5 mL)
- Parafilm (BEMIS; ABD)
- Gözlük (Serian, Armamax; Birleşik Krallık )
- Eldiven (Beyaz ve Mavi ; Micro Touch Nitra Tex Nitril)
- Masa üstü ısıtıcı (Cole Parmer)
- Tek kullanımlık laboratuvar önlüğü (non woven)
- Tek kullanımlık laboratuvar tulumu (non woven)
- Galoş
- Steril jelli biyokimya tüpleri
- Santrifüj Tüpleri (cam 15 ml)

### **3.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler**

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck; Almanya)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck; Almanya)
- NaCl (MERCK; Almanya)
- EDTA (MERCK; Almanya)
- TBA (MERCK; Almanya)
- TCA (MERCK; Almanya)
- MDA (MERCK; Almanya)
- NaOH (MERCK; Almanya)
- HCl (MERCK; Almanya)
- 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG) ELISA Assay Kit
- 3-Nitrotirozin (3-NT) ELISA Assay Kit
- 8-Nitroguanin (8-NG) ELISA Assay Kit
- Nitrik Oksit (NO) ELISA Assay Kiti
- Karboksimetillizin (CML) ELISA Assay Kit
- 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub> (8-iso-PGF<sub>2α</sub>) ELISA Assay Kit
- TAS (Total Antioxidant Status; Rel Assay Diagnostics TAK) Deney Kiti
- TOS (Total Oxidant Status; Rel Assay Diagnostics TOK) Deney Kiti



### 3.3. Hasta ve Kontrol Grubu

#### 3.3.1. Hastalar

Bu çalışmada hasta grubu, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Enfeksiyon hastalıkları kliniğinde KKKA ön tanısı alan, daha sonra Ankara Hıfzıssıhha Enstitüsü viroloji laboratuvarında PCR ve ELISA yöntemleri kullanılarak kesin tanı konan 23'ü kadın, 37'si erkek olmak üzere 60 birey ile oluşturuldu. Hastalar, yaş ve cinsiyetleri bakımından herhangi bir ayrıma tabi tutulmaksızın, rast gele belirlendi. KKKA tanısı konan bu hastalar daha sonra, Bakır ve ark. tarafından geliştirilen SGS (Şiddet derecelendirme Skoru) skorlamasına göre kendi içersinde hafif, orta ve ağır olmak üzere üç alt gruplara ayrıldı [115]. Bu skorlama literatüre ve klinik öneme sahip olduğu kabul edilen, mortalite ile ilişkili olduğu belirlenen birkaç değişken kullanılarak oluşturulmuştur.

Hasta grupları;

1. Düşük derecede yada hiç risk taşımayan grup ( $H \leq 4$ )
2. Orta derecede risk taşıyan grup ( $5 \leq O \leq 8$ )
3. Yüksek derecede risk taşıyan grup ( $A \geq 9$ ) şeklinde oluşturuldu.

Cinsiyet	Hafif	Orta	Ağır
Kadın	9	10	4
Erkek	16	15	6

Çizelge 3.1 SGS sistemine göre oluşturulan hasta gruplarında cinsiyet dağılımı

#### 3.3.2. Kontroller

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine başvuran ve herhangi bir sistemik rahatsızlığı bulunmayan, 13'ü kadın olmak üzere toplam 35 birey kontrol grubuna alındı.

### 3.4 Kan Örneklerinin Toplanması

Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen bireyler bilgilendirilip, aydınlatılmış onam formu okutularak imzalatıldıktan sonra, her birinden 10 mL kan örneği steril jelli biyokimya tüplerine alındı. Bu kan örnekleri 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar porsiyonlanarak 8-OHdG, 3-NT, 8-NG, NO, CML, 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, TAS, TOS ve MDA düzeylerinin belirlenmesi amacıyla analiz gününe kadar -40 °C'de muhafaza edildi.

### 3.5. Malondialdehit Tayini (MDA)

Metodun temel prensibi; lipid peroksidasyonu sonucunda açığa çıkan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucunda 532 nm dalga boyunda maksimum absorbanı veren renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır [116] (Bkz. Şekil 3.1).

a. Malondialdehit çözeltilerinin hazırlanması

- ✓ Fosfat tamponu (PH=7.4)
- ✓ 0.1 M EDTA
- ✓ % 30'luk TCA
- ✓ 6.072 M MDA stok çözeltilerinden farklı derişimlerde hazırlanmış standartlar
- ✓ 0.05 M NaCl içinde hazırlanmış % 1'lik TBA

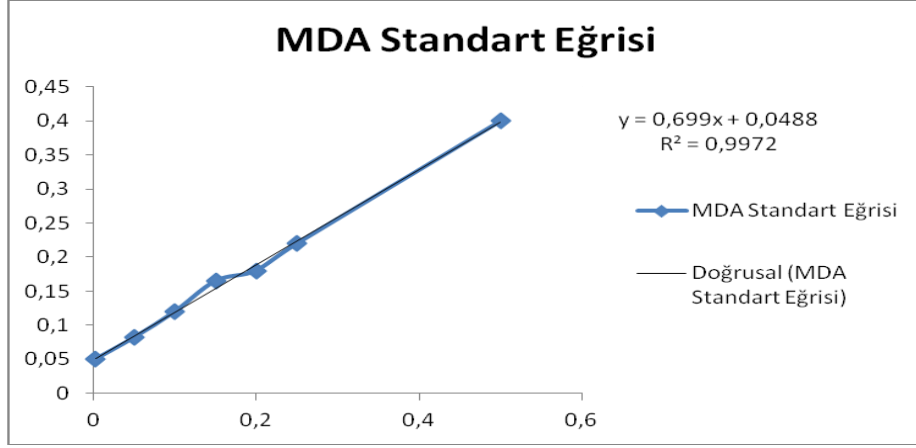
b. Malondialdehit düzeyinin ölçülmesi

	<b>Kör</b>	<b>Standart</b>	<b>Numune</b>
<b>Standart</b>	.....	<b>0.6 ml</b>	.....
<b>Serum</b>	.....	.....	<b>0.6 ml</b>
<b>Distile Su</b>	<b>0.6 ml</b>	.....	.....
<b>Fosfat Tamponu</b>	<b>2.4 ml</b>	<b>2.4 ml</b>	<b>2.4 ml</b>
<b>% 30'luk TCA</b>	<b>1.5 ml</b>	<b>1.5 ml</b>	<b>1.5 ml</b>

Yukarıdaki tabloda belirtildiği Şekilde kör, standart ve örnek tüpleri hazırlandı. 2 saat buz banyosunda bekletildikten sonra 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. 3 ml süpernatant alınıp üzerine 0,225 ml 0,1 M EDTA ve 0,75 ml %1'lik TBA eklendi. 15 dakika su banyosunda kaynatıldı ve tüpler oda sıcaklığına geldiğinde 532 nm dalga boyunda örnekler ve standartlar köre karşı okundu.

a. Hesaplama

MDA ve TBA tepkimesi sonucu oluşturulan standart eğri kullanılarak yapıldı.



Şekil 3.1. MDA standart eğrisi

### 3.6. Total Oksidan Kapasite (TOS) Ölçümü

Total oksidan kapasite, numunenin içerdiği oksidan moleküllerin ferröz iyonu ferik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik bir yöntem kullanılarak ölçüldü [117]. Ferik iyon asidik ortamda kromojen madde ile etkileşerek renkli bir bileşik oluşturur. Spektrofotometrede ölçülen rengin yoğunluğu (koyuluğu) numunedeki oksidan moleküllerin toplam miktarını verir. Kitin kalibrasyonu hidrojen peroksit ile yapıldı. Sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Equivalent/L olarak bulundu.

### 3.7. Total Antioksidan Kapasite (TAS) Ölçümü

Total antioksidan kapasite, numunenin içerdiği antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli 2-2'-Azino-bis [3-ethylbenzathiazoline-6-sülfonic acid] diamonium salt (ABTS) radikal çözeltisini, renksiz ABTS formuna çevirir. 660 nm absorbansındaki değişim total antioksidan miktarıyla ilgilidir. Kitin kalibrasyonu E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılarak yapıldı. Sonuçlar mmol/Trolox Equivalent/L olarak verildi [118].

### 3.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Oksidatif stres indeksi, total oksidan kapasitenin total antioksidan kapasiteye bölünmesiyle bulundu.

$$\text{OSİ} = (\text{TOS}/\text{TAS}) \times 100$$

### 3.9. Nitrik Oksit Düzeyi Ölçümü

- ✓ Deneye başlamadan önce tüm numune ve reaktiflerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- ✓ ELISA işlemi için; standart sulandırıcı tampon kullanılarak 320, 160, 80, 40, 20  $\mu\text{mol/L}$  human nitrik oksit standartları hazırlandı.
- ✓ Standart kuyucuklarına her standarttan 50  $\mu\text{l}$  ilave edildi. Numune kuyucuklarına her numuneden 40  $\mu\text{l}$  edildi. Blank kuyucukları ise boş bırakıldı ve belirtilen miktarlarda (Bkz. çizelge 3.2) reaktif ve konjugatlar kuyucuklara eklendi.

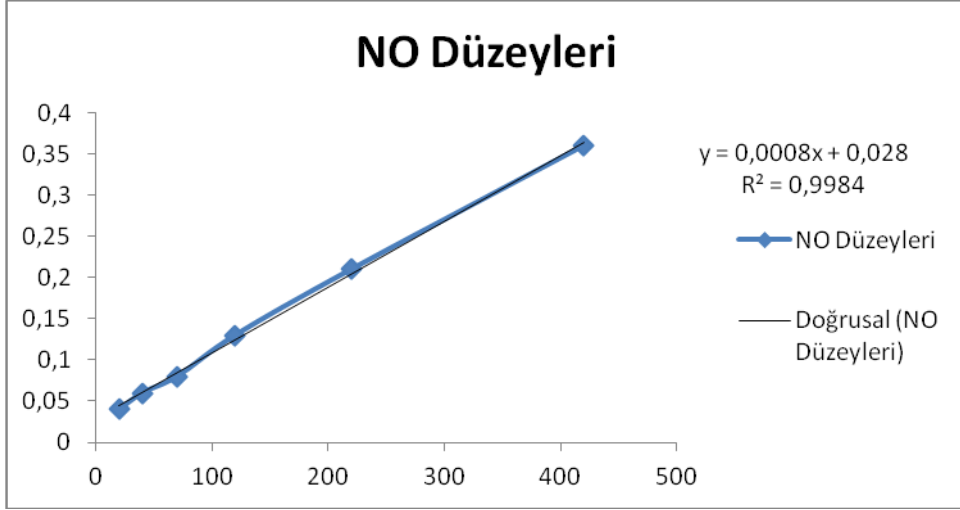
	Anti NO antikorları (Biotin ile işaretli)	Streptavidin (HRP işaretli)
Blank	.....	50 µl
Standart	.....	50 µl
Numune	10 µl	50 µl

Çizelge 3.2. NO ELISA çalışma protokolü

- ✓ Bu aşamalardan sonra ELISA plağı 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde 60 dakika bekletildi.
- ✓ Daha sonra plak 3 defa 400 µL seyreltilmiş yıkama tamponu ile manuel olarak yıkandı ve kurutuldu.
- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µL kromojen A reaktifi ve 50 µL kromojen B reaktifi ilave edildi ve yaklaşık 10 dakika tekrar 37 °C'de inkübe edildi.
- ✓ Bu sürenin sonunda renklenen plak kuyucuklarının her birine 50 µL Stop Solution ilave edildi.
- ✓ Maviden sarıya dönem plak 5 dakika içerisinde 450 nm'de ELISA okuyucusunda okutuldu.

### 3.9.1. "NO" Düzeylerinin Hesaplanması

- ✓ Standart ve numunelere ait okunan absorbans değerlerinden "blank" absorbans değeri çıkarıldı.
- ✓ Standartlara ait absorbans değerleri derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek grafiğin eğimine ait denklem ve R<sup>2</sup> değeri bulundu (Bkz. Şekil 3.2).
- ✓ Standart eğri denkleminde ve numunelere ait absorbans değerlerinden yararlanılarak, numune derişimleri tek tek hesaplandı.



Şekil 3.2. NO Standart Eğrisi

### 3.10. “3-NT” Düzeyi Ölçümü

- ✓ Deneye başlamadan önce tüm numune ve reaktiflerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- ✓ ELISA işlemi için; standart sulandırıcı tampon kullanılarak 1200, 600, 300, 150, 75 nmol/L human 3-NT standartları hazırlandı.
- ✓ Standart kuyucuklarına her standarttan 50 µl ilave edildi. Numune kuyucuklarına her numuneden 40 µl edildi. Blank kuyucukları ise boş bırakıldı ve belirtilen miktarlarda (Bkz. Çizelge 3.3) reaktif ve konjugatlar kuyucuklara eklendi.

	Anti 3-NT antikorları (Biotin ile işaretli)	Streptavidin (HRP işaretli)
Blank	.....	50 µl
Standart	.....	50 µl
Numune	10 µl	50 µl

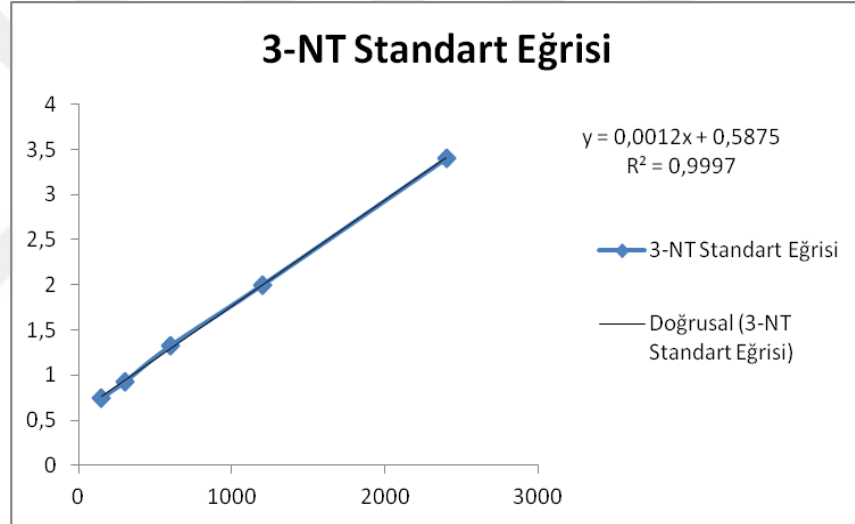
Çizelge 3.3. 3-NT ELISA çalışma protokolü

- ✓ Bu aşamalardan sonra ELISA plağı 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde 60 dakika bekletildi.
- ✓ Daha sonra plak 3 defa 400 µL seyreltilmiş yıkama tamponu ile manuel olarak yıkandı ve kurutuldu.
- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µL kromojen A reaktifi ve 50 µL kromojen B reaktifi ilave edildi ve yaklaşık 10 dakika tekrar 37 °C'de inkübe edildi.

- ✓ Bu sürenin sonunda renklenen plak kuyucuklarının her birine 50 µL Stop Solution ilave edildi.
- ✓ Maviden sarıya dönem plak 5 dakika içerisinde 450 nm’de ELISA okuyucusunda okutuldu.

### 3.10.1. “3-NT” Düzeylerinin Hesaplanması

- ✓ Standart ve numunelere ait okunan absorbans değerlerinden “blank” absorbans değeri çıkarıldı.
- ✓ Standartlara ait absorbans değerleri derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek grafiğin eğimine ait denklem ve  $R^2$  değeri bulundu (Bkz. Şekil 3.3).
- ✓ Standart eğri denkleminde ve numunelere ait absorbans değerlerinden yararlanılarak, numune derişimleri tek tek hesaplandı.



Şekil 3.3. 3- NT Standart Eğrisi

### 3.11. 8-OHdG Düzeyi Ölçümü

- ✓ Deneye başlamadan önce tüm numune ve reaktiflerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- ✓ ELISA işlemi için; standart sulandırıcı tampon kullanılarak 64, 32, 16, 8, 4 ng/ml human 8-OHdG standartları hazırlandı.
- ✓ Standart kuyucuklarına her standarttan 50 µl ilave edildi. Numune kuyucuklarına her numuneden 40 µl edildi. Blank kuyucukları ise boş bırakıldı ve belirtilen miktarlarda (Bkz. Çizelge 3.4) reaktif ve konjugatlar kuyucuklara eklendi.

Anti 8-OHdG	Streptavidin
antikorları	(HRP işaretli)

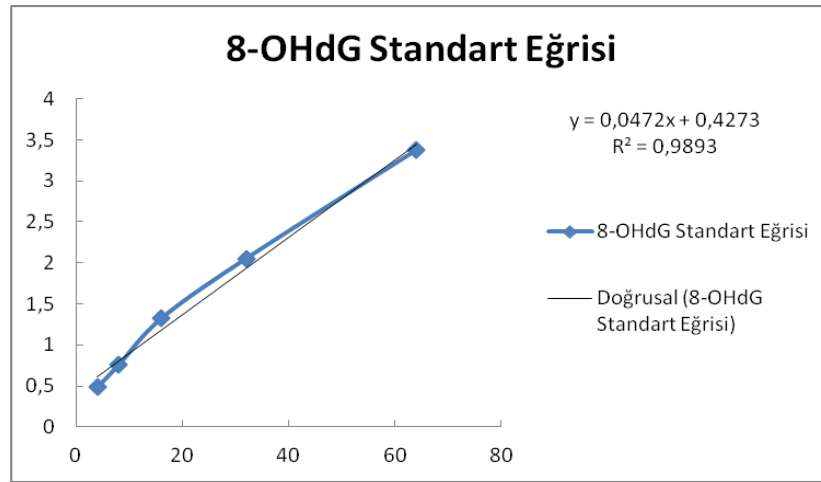
(Biotin ile işaretli)		
Blank	.....	50 µl
Standart	.....	50 µl
Numune	10 µl	50 µl

Çizelge 3.4. 8-OHdG ELISA çalışma protokolü

- ✓ Bu aşamalardan sonra ELISA plağı 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde 60 dakika bekletildi.
- ✓ Daha sonra plak 3 defa 400 µL seyreltilmiş yıkama tamponu ile manuel olarak yıkandı ve kurutuldu.
- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µL kromojen A reaktifi ve 50 µL kromojen B reaktifi ilave edildi ve yaklaşık 10 dakika tekrar 37 °C'de inkübe edildi.
- ✓ Bu sürenin sonunda renklenen plak kuyucuklarının her birine 50 µL Stop Solution ilave edildi.
- ✓ Maviden sarıya dönem plak 5 dakika içerisinde 450 nm'de ELISA okuyucusunda okutuldu.

### 3.11.1. "8-OHdG" Düzeylerinin Hesaplanması

- ✓ Standart ve numunelere ait okunan absorbans değerlerinden "blank" absorbans değeri çıkarıldı.
- ✓ Standartlara ait absorbans değerleri derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek grafiğin eğimine ait denklem ve R<sup>2</sup> değeri bulundu (Bkz. Şekil 3.4).
- ✓ Standart eğri denkleminde ve numunelere ait absorbans değerlerinden yararlanılarak, numune derişimleri tek tek hesaplandı.



Şekil 3.4. 8-OHdG Standart Eğrisi

### 3.12. "8-izo-PGF<sub>2</sub>α" Düzeyi Ölçümü

- ✓ Deneye başlamadan önce tüm numune ve reaktiflerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- ✓ ELISA işlemi için; standart sulandırıcı tampon kullanılarak 120, 60, 30, 15, 7,5 pg/ml human 8-izo-PGF<sub>2</sub>α standartları hazırlandı.
- ✓ Standart kuyucuklarına her standarttan 50 µl ilave edildi. Numune kuyucuklarına her numuneden 40 µl edildi. Blank kuyucukları ise boş bırakıldı ve belirtilen miktarlarda (Bkz. Çizelge 3.5.) reaktif ve konjugatlar kuyucuklara eklendi.

	Anti 8-izo-PGF <sub>2</sub> α antikorları (Biotin ile işaretli)	Streptavidin (HRP işaretli)
Blank	.....	50 µl
Standart	.....	50 µl
Numune	10 µl	50 µl

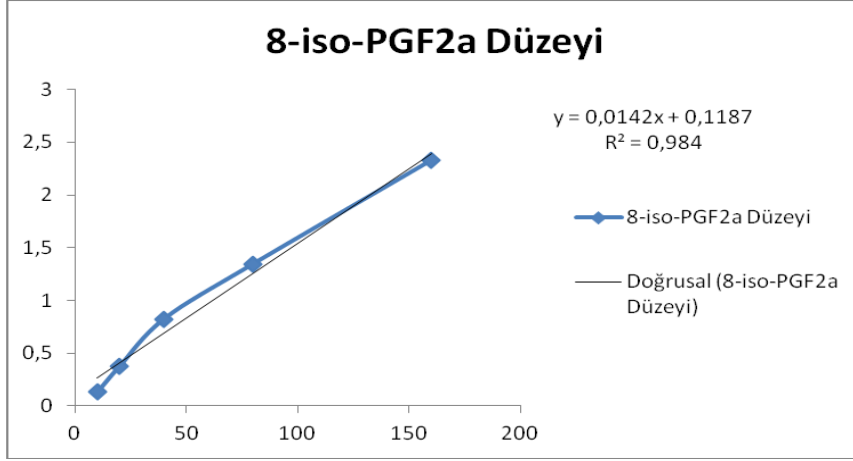
Çizelge 3.5. 8-izo-PGF<sub>2</sub>α ELISA çalışma protokolü

- ✓ Bu aşamalardan sonra ELISA plağı 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde 60 dakika bekletildi.
- ✓ Daha sonra plak 3 defa 400 µL seyreltilmiş yıkama tamponu ile manuel olarak yıkandı ve kurutuldu.
- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µL kromojen A reaktifi ve 50 µL kromojen B reaktifi ilave edildi ve yaklaşık 10 dakika tekrar 37 °C'de inkübe edildi.
- ✓ Bu sürenin sonunda renklenen plak kuyucuklarının her birine 50 µL Stop Solution ilave edildi.
- ✓ Maviden sarıya dönem plak 5 dakika içerisinde 450 nm'de ELISA okuyucusunda okutuldu.

### 3.12.1. "8-izo-PGF<sub>2</sub>α" Düzeylerinin Hesaplanması

- ✓ Standart ve numunelere ait okunan absorbans değerlerinden "blank" absorbans değeri çıkarıldı.
- ✓ Standartlara ait absorbans değerleri derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek grafiğin eğimine ait denklem ve R<sup>2</sup> değeri bulundu (Bkz. Şekil 3.5).
- ✓ Standart eğri denkleminde ve numunelere ait absorbans değerlerinden yararlanılarak, numune derişimleri tek tek hesaplandı.





Şekil 3.5. 8-izo-PGF<sub>2</sub>α Standart Eğrisi

### 3.13. KML Düzeyi Ölçümü

- ✓ Deneye başlamadan önce tüm numune ve reaktiflerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- ✓ ELISA işlemi için; standart sulandırıcı tampon kullanılarak 160, 80, 40, 20, 10 ng/ml human KML standartları hazırlandı.
- ✓ Standart kuyucuklarına her standarttan 50 µl ilave edildi. Numune kuyucuklarına her numunedan 40 µl edildi. Blank kuyucukları ise boş bırakıldı ve belirtilen miktarlarda (Bkz. Çizelge 3.6) reaktif ve konjugatlar kuyucuklara eklendi.

	Anti KML antikorları (Biotin ile işaretli)	Streptavidin (HRP işaretli)
Blank	.....	50 µl
Standart	.....	50 µl
Numune	10 µl	50 µl

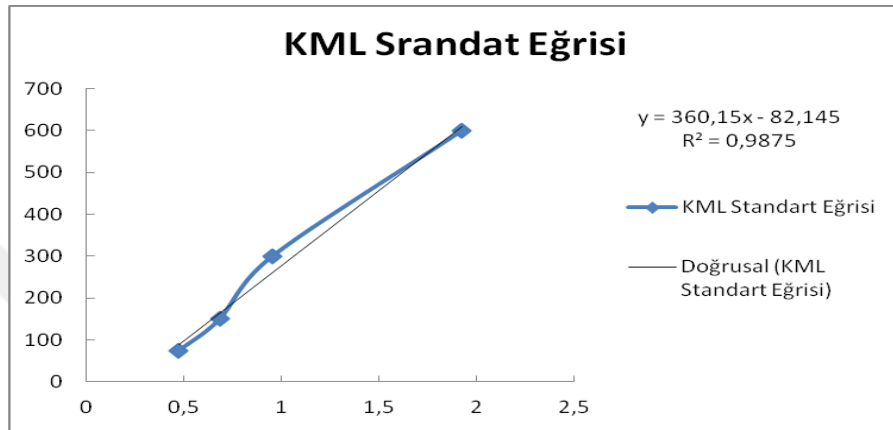
Çizelge 3.6.  
ELISA

KML çalışma protokolü

- ✓ Bu aşamalardan sonra ELISA plağı 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde 60 dakika bekletildi.
- ✓ Daha sonra plak 3 defa 400 µL seyreltilmiş yıkama tamponu ile manuel olarak yıkandı ve kurutuldu.
- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µL kromojen A reaktifi ve 50 µL kromojen B reaktifi ilave edildi ve yaklaşık 10 dakika tekrar 37 °C'de inkübe edildi.
- ✓ Bu sürenin sonunda renklenen plak kuyucuklarının her birine 50 µL Stop Solution ilave edildi.
- ✓ Maviden sarıya dönem plak 5 dakika içerisinde 450 nm'de ELISA okuyucusunda okutuldu.

### 3.13.1. “KML” Düzeylerinin Hesaplanması

- ✓ Standart ve numunelere ait okunan absorbans değerlerinden “blank” absorbans değeri çıkarıldı.
- ✓ Standartlara ait absorbans değerleri derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek grafiğin eğimine ait denklem ve  $R^2$  değeri bulundu (Bkz. Şekil 3.6).
- ✓ Standart eğri denkleminde ve numunelere ait absorbans değerlerinden yararlanılarak, numune derişimleri tek tek hesaplandı.



Şekil 3.6. KML Standart Eğrisi

### 3.14. 8-NG Düzeyi Ölçümü

- ✓ Deneye başlamadan önce tüm numune ve reaktiflerin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı.
- ✓ ELISA işlemi için; standart sulandırıcı tampon kullanılarak 400, 200, 100, 50, 25 ng/ml human 8-NG standartları hazırlandı.
- ✓ Standart kuyucuklarına her standarttan 50 µl ilave edildi. Numune kuyucuklarına her numuneden 40 µl edildi. Blank kuyucukları ise boş bırakıldı ve belirtilen miktarlarda (Bkz. Çizelge 3.7) reaktif ve konjugatlar kuyucuklara eklendi.

	Anti 8-NG antikorları (Biotin ile işaretli)	Streptavidin (HRP işaretli)
Blank	.....	50 µl
Standart	.....	50 µl
Numune	10 µl	50 µl

Çizelge 3.7. 8-NG ELISA çalışma protokolü

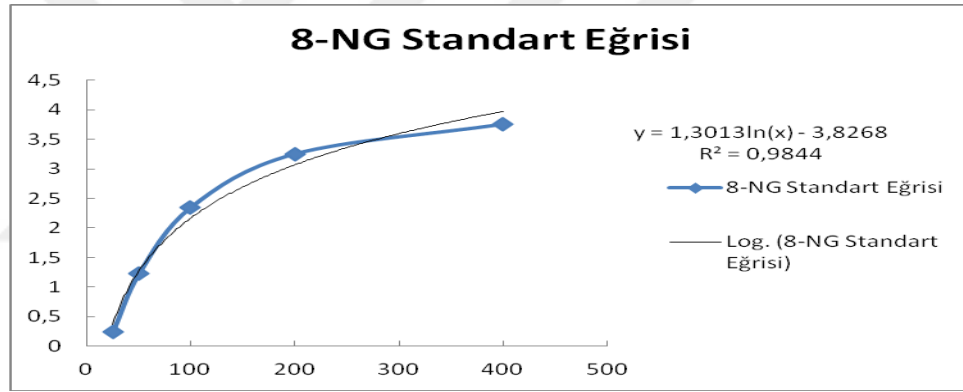
- ✓ Bu aşamalardan sonra ELISA plağı 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde 60 dakika bekletildi.
- ✓ Daha sonra plak 3 defa 400 µL seyreltilmiş yıkama tamponu ile manuel olarak yıkandı ve kurutuldu.

- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µL kromojen A reaktifi ve 50 µL kromojen B reaktifi ilave edildi ve yaklaşık 10 dakika tekrar 37 °C’de inkübe edildi.
- ✓ Bu sürenin sonunda renklenen plak kuyucuklarının her birine 50 µL Stop Solution ilave edildi.
- ✓ Maviden sarıya dönem plak 5 dakika içerisinde 450 nm’de ELISA okuyucusunda okutuldu.

### 3.14.1. 8-NG Düzeylerinin Hesaplanması

Standart ve numunelere ait okunan absorbans değerlerinden “blank” absorbans değeri çıkarıldı. Standartlara ait absorbans değerleri derişimlerine karşı grafiğe geçirilerek grafiğin eğimine ait denklem ve  $R^2$  değeri bulundu.

- ✓ Standart eğri denkleminde ve numunelere ait absorbans değerlerinden yararlanılarak, numune derişimleri tek tek hesaplandı.



Şekil 3.7. 8-NG Standart Eğrisi

### 3. 15. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızdan elde edilen veriler SPSS (Ver: 22.0) programına yüklenerek değerlendirilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde parametrik test varsayımları yerine getirildiği için (Kolmogorov-Simirnov) Varyans ANOVA analizi, İki Ortalamanın Arasındaki Farkın Önemlilik Testi (T Taesti) ve Pearson korelasyon Analiz Testi kullanılmıştır ve yanılma düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

### 3.16. Araştırmanın Etik Yönü

Araştırmanın her aşaması etik ilkelere uygun olarak yürütülmüştür. Uygulamaya geçmeden önce etik kuruldan (10.03.2015 tarihli, 2015-03/04 sayılı) (EK.1) ve çalışmanın yapılacağı kurumdan izin alınmıştır. Çalışmaya katılanlardan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır

#### 4. BULGULAR

Bu çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji servisinde KKKA tanısı konularak izlenen, 23'ü kadın, 37'si erkek olmak üzere toplam 60 hasta alındı. Herhangi bir sistemik rahatsızlığı bulunmayan, 13'ü kadın olmak üzere toplam 35 birey de kontrol grubunu oluşturdu. Hastalar, yaş ve cinsiyetleri bakımından herhangi bir ayrıma tabi tutulmaksızın, rast gele belirlendi. KKKA tanısı konan bu hastalar daha sonra, Bakır ve ark. [115] tarafından geliştirilen SGS (Şiddet derecelendirme Skoru) skorlamasına göre kendi içerisinde üç alt gruba ayrıldı. Bu skorlamaya göre hasta grubunu oluşturan bireyler 25 hafif, 25 orta ve 10 ağır derecede olmak üzere 3 alt gruba ayrıldı.

KKKA hastaları ve kontrollerin yaş özellikleri çizelge 4.1'de verildi.

	Toplam	Yaş		t	P
		Ortalama ± Ss			
Hasta	60	45,73 ± 14,02		0,933	-0,084
Kontrol	35	45,97 ± 11,95			

Çizelge 4.1 Çalışma gruplarının yaş ortalamaları

Hasta ve kontrol grupları arasında yaş ortalamaları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi.

	Toplam	Cinsiyet				X <sup>2</sup>
		Kadın		Erkek		
		N	%	N	%	
Hasta	60	23	38,3	37	61,7	0,908
Kontrol	35	13	37,1	22	62,9	

Çizelge 4.2 Çalışma grupları cinsiyet özellikleri

KKKA hastaları ve kontrollerin cinsiyet özellikleri çizelge 4.2'de verildi. Her iki grupta da cinsiyet yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. KKKA hastası ve sağlıklı kontrol grubunda 8-isoPGF<sub>2</sub> $\alpha$ , 8-NG, 3-NT, 8-OHdG, CML, MDA, NO, TOS ve TAS düzeylerine bakıldı. TOS ve TAS düzeyleri ile elde edilen OSİ değerleri de hasta ve kontrol grupları arasında incelendi.

Belirteçler	Hasta	Kontrol	t	p
	Ort ± Ss	Ort ± Ss		

<b>OSİ</b>	4,99 ± 2,39	2,55 ± 1,09	5,70	0,000
<b>8-isoPGF<sub>2α</sub></b> (pg/ml)	73,86 ± 30,78	31,81 ± 16,08	7,49	0,000
<b>8-OHdG</b> (ng/ml)	32,19 ± 10,48	11,40 ± 5,88	10,77	0,000
<b>MDA</b> (mM)	0,34 ± 0,17	0,07 ± 0,04	8,91	0,000
<b>NO</b> (μmol/L)	21,72 ± 7,51	15,43 ± 4,80	4,45	0,000
<b>8-NG</b> (ng/ml)	71,49 ± 13,47	27,47 ± 9,53	16,99	0,000
<b>3-NT</b> (nmol/L)	265,51 ± 84,87	165,09 ± 52,48	7,12	0,000
<b>KML</b> (ng/ml)	106,72 ± 67,12	39,70 ± 15,16	5,81	0,000

Çizelge 4.3. Çalışma gruplarının biyobelirteç ortalama ve karşılaştırılmaları

Hasta ve kontrol grupları arasında OSİ (Oksidatif Stres İndeksi), oksidatif stres biyobelirteç (8-isoPGF<sub>2α</sub>, 8-OHdG, MDA), nitrozatif stres biyobelirteç (8-NG, 3-NT, NO) ve glikozatif stres biyobelirteç (CML) düzeyleri ortalamaları yönünden fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Bkz. Çizelge 4.3) (p=0,00).

<b>Alt Gruplar</b>	<b>Hafif</b>	<b>Orta</b>	<b>Ağır</b>	<b>Kontrol</b>
	<b>(n=25)</b>	<b>(n=25)</b>	<b>(n=10)</b>	<b>(n=35)</b>
<b>Belirteçler</b>	<b>Ort ± ss</b>	<b>Ort ± ss</b>	<b>Ort ± ss</b>	<b>Ort ± ss</b>
<b>TOS</b> (μmolH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eq/L)	30,53 ± 8,05	55,44 ± 12,90	60,51 ± 11,06	29,66±13,24
<b>TAS</b> (mmol/TroloxEq/L)	1,13 ± 0,19	0,87 ± 0,17	0,94 ± 0,09	1,16 ± 0,12
<b>OSİ</b>	2,77 ± 0,86	6,64 ± 2,03	6,45 ± 1,01	2,55 ± 1,09
<b>NO</b> (μmol/L)	21,94 ± 3,50	25,78 ± 7,26	11,01 ± 4,79	15,43 ± 4,80
<b>8-izoPGF<sub>2α</sub></b> (pg/ml)	88,12 ± 39,09	64,76 ± 17,77	60,94 ± 18,80	31,81± 16,08
<b>8-NG</b> (ng/ml)	61,81 ± 11,12	75,88 ± 10,41	84,70 ± 7,96	27,47 ± 9,53
<b>KML</b> (ng/ml)	81,32 ± 56,13	114,59 ± 69,44	150,53 ± 64,68	39,70 ± 15,16
<b>8-OHdG</b> (ng/ml)	29,93 ± 9,82	30,29 ± 9,77	42,58 ± 8,01	11,40 ± 5,88
<b>MDA</b> (mM)	0,32 ± 0,14	0,29 ± 0,15	0,53 ± 0,19	0,07 ± 0,04
<b>3-NT</b> (nmol/L)	216,10±67,51	287,43±84,82	334,25±50,14	165,10±52,48

Çizelge 4.4 hasta grubu alt grupları ve kontrol grubuna göre biyobelirteç düzeyleri

Çalışmamızda hasta grubu hafif (H), orta (O) ve ağır (A) olmak üzere 3 alt gruba ayrıldı. Bu alt gruplar oksidatif, nitrozatif ve glikozatif stres biyobelirteçleri düzeyi belirlendi (Bkz. Çizelge 4.4).

Hasta grubunun biyobelirteç düzeyleri ile yapılan korelasyon analizi ile biyobelirteç düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildi (Bkz. Çizelge 4.5).

Belirteçler		OSİ	NO	8- izoPGF 2 $\alpha$	8-OHdG	MDA	8-NG	3-NT	KML
OSİ	r	1	0,135	-0,33**	0,085	-0,023	0,683**	0,338**	0,364**
	p		0,306	0,01	0,516	0,861	< 0,001	0,008	0,004
NO	r	0,135	1	0,031	-0,359**	-0,403**	-0,108	-0,167	-0,217
	p	0,306		0,817	0,005	0,001	0,412	0,202	0,096
8-izoPGF2 $\alpha$	r	-0,33**	0,031	1	-0,17	-0,124	-0,259*	-0,314*	-0,21
	p	0,010	0,817		-0,170	-0,124	-0,259*	-0,314*	-0,210
8-OHdG	r	0,085	-0,359**	-0,170	1	0,171	0,236	0,170	0,240
	p	0,516	0,005	0,195		0,192	0,070	0,193	0,065
MDA	r	-0,023	-0,403**	-0,124	0,171	1	0,234	0,210	0,350**
	p	0,861	0,001	0,345	0,192		0,073	0,170	0,006
8-NG	r	0,683**	-0,108	-0,259*	0,236	0,234	1	-0,385**	0,454**
	p	<0,001	0,412	-0,046	0,070	0,073		0,002	<0,001
3-NT	r	0,338**	-0,167	-0,314*	0,170	0,210	0,385**	1	0,173
	P	0,008	0,202	0,015	0,193	0,107	0,002		0,186
KML	r	0,364**	-0,217	-0,210	0,240	0,350**	0,454**	0,173	1
	p	0,004	0,096	0,107	0,065	0,006	<0,001	0,186	

Çizelge 4.5 Hasta Grubundaki Biyobelirteçlerin Korelasyon Analizleri

Çizelge 4.5’de çalışma parametrelerinin birbirleriyle korelasyonu yer almaktadır. Çıkan sonuçlara göre OSİ ile 8-NG, 3-NT ve KML arasında pozitif doğrusal bir ilişki 8-izoPGF2 $\alpha$  ile negatif doğrusal bir ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu. NO ile 8-OHdG ve MDA arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif doğrusal ilişki bulundu. 8-izoPGF2 $\alpha$  ile OSİ ve 3-NT arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif doğrusal ilişki bulundu. MDA ile KML arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif doğrusal ilişki ve NO arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif doğrusal ilişki bulundu. 8-NG ile OSİ, 8-OHdG ve KML arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif doğrusal ilişki; 8-izoPGF2 $\alpha$  ve 3-NT arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif doğrusal ilişki bulundu.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda yapılan çalışmalarda oksidatif, nitrozatif ve glikozatif stresi oluşturan reaktif türlerin, pek çok hastalığın mekanizmasında önemli bir rol oynadıkları gösterilmiştir. Aynı zamanda enfeksiyonların reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumunu arttıran etkili ve potansiyel bir faktör olduğu da belirtilmiştir [119]. Bu çalışmalardan yola çıkarak KKKA hastalarında Oksidatif, Nitrozatif ve Glikozatif Stres biyobelirteç düzeylerinin saptanması ve hastalığın patogeneze ve prognozu yönünden incelenmiştir.

Fagositik lökositler; çözünebilir ya da partiküler mikroorganizmalar, bakteriyel orjinli bileşikler gibi uyarılarla uyarıldığında lizozomal bileşenleri dışarıya vermeye başlarlar. Metabolit oluşumu ile birlikte mitokondri dışındaki oksijen tüketiminde bir artış gösterirler. Fagosit edilmiş patojenler, oksijen tüketimiyle oluşmuş moleküllerin toksik etkisi ile öldürülürler. Bu oksidan moleküller süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve oksidasyon ürünleridir. Solunum patlaması olarak bilinen bu olayın amacı, mikroorganizmaların yok edilmesini sağlayacak oksidan ajanlar sağlamaktır [113]. Virüsler fagositoza uğrayarak serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. KKKA hastalığını oluşturan “*Hyalomma marginatum*” kaynaklı virüs aynı şekilde serbest radikalleri oluşturur.

ROS/RNS kendileri çok reaktif ve çok kısa yarılanma ömrüne sahip olduğundan dolayı, doku ya da vücut sıvılarında bunların doğrudan saptanması genellikle pratik değildir. Bu nedenle oksitlenerek ya da nitrozatiflenerek değişmiş biyolojik örneklerdeki DNA, proteinler, lipitler ve şekerlerde, ROS ve RNS'nin söz konusu olduğu hastalıklarda biyobelirteçleri tespit etmek gerekmektedir. Bu biyobelirteçler hastalık gelişimini önleyici amaçlı “ara uç noktaları ya da erken sonuç belirteçleri” olarak kullanılabilirler [6]. Bizde çalışmamızda bu nedenle ROS ve RNS belirteci olan parametrelerden bazılarını kullandık.

Herpes virüsü tip 1 (BHV-1) ile enfekte hayvanlarda yapılan bir çalışmada, oksidatif ve antioksidatif denge incelenmiştir. Bu çalışmada, enfekte hayvanlarda kontrollere göre TAS düzeyi daha düşük bulunmuştur; ancak TOS ve OSİ düzeylerinde iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Virüsler, ya serbest radikallerin oluşumunu arttıran ya da konak hücreler içinde oksidatif savunmada yer alan enzimlerin sentezini inhibe ederek oksidatif dengeyi değiştirebilirler [120]. Bu çalışmaya bakarak virüslerin oksidatif dengeyi değiştirmiş olduğunu gözlemledik.

Oksidatif stresin artması özellikle karaciğer hücresinde ölüme neden olmakta ve bu durum karşımıza; yükselmiş enzimler, gelişmiş fibroz ve tedavi edilemeyen kronik hepatit C olgularında siroz ile çıkmaktadır. Kronik viral hepatit olgularında yapılan birçok çalışma ile ROS'nin artmasıyla oluşan lipid peroksidasyonun hücre hasarına yol açtığı gösterilmiştir. Kronik viral hepatitli 73 hastada yapılan bir çalışmada TAS düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunurken; TOS ve lipidhidroperoksid (LOOH) değerleri düşük bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanılarak, yukarıdaki parametrelerin kronik hepatitlerin izleminde belirteç olarak kullanılabilirdiği belirtilmiştir [121]. Bizde çalışmamızda diğer biyobelirteçlerle birlikte TAS ve TOS'un KKKA hastalığının izleminde belirteç olarak kullanılabilirliğini araştırdık.

KKKA hastalarında oluşan yüksek ateş, hastalığın prognozunu tetikleyen artmış oksidatif stresin muhtemel sonucudur. Ayrıca oksidatif stresin neden olduğu doku hasarı kaçınılmaz sonudur. Virüs ile uyarılmış oksidatif stres, proinflamatuvar sitokinlerin salınımına aracılık eder. Sonuçta; konağın inflamatuvar cevabı, hastalık patofizyolojisine katılabilir. KKKA hastalarında kontrol grubuna göre TOS düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunurken; dengue ateşi hastalarında ise, oksidatif stresin kontrollere göre arttığı belirlenmiştir [122, 123]. Viral enfeksiyon hastalarında oluşan inflamatuvar cevap nedeniyle, TOS ve lipid peroksidasyonunun yükseldiği, TAS düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir [124, 125, 126].

Çalışmamızda TAS ve TOS değerleri hasta ve kontrol grubunda değerlendirildiğinde, TAS değerleri sırası ile  $0,98 \pm 0,20$  ve  $1,15 \pm 0,11$  mmol/TroloxEq/L, TOS değerleri ise sırasıyla  $45,90 \pm 16,95$  ve  $29,66 \pm 13,23$   $\mu\text{molH}_2\text{O}_2\text{Eq/L}$  olarak bulunmuştur. Sonuçlar kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel olarak her iki parametrede anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ( $p < 0,001$ ). Bu parametrelerle elde ettiğimiz OSI değerleri ise sırasıyla  $4,99 \pm 2,39$  ve  $2,55 \pm 1,09$  şeklindedir. İki grup arasındaki OSI değerleri kıyaslandığında hasta grubundaki artış kontrole grubuna göre 2 katı olup, fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı çıkmıştır ( $p < 0,001$ ). Yukarıdaki çalışmalara bakıldığında KKKA hastalığı bir virüs hastalığı olduğu ve virüslerin serbest radikalleri oluşturup oksidatif savunmada enzimlerin sentezini inhibe ettiği ve böylece oksidatif dengeyi değiştirdiği görülmüştür. Hücrelerde serbest radikal üretimi, bazı yabancı toksik maddeler tarafından büyük oranda arttırılır. Bu yabancı maddelerden biri olan virüslerin, fagositoz gibi immünolojik mekanizmalarla yok edilmesi gerekir. Fagositoza bağlı olarak pek çok reaktif oksijen metaboliti oluşur ve virüsler bu metabolitlerle yok edilir. Sonuçta ortamda serbest radikaller fagositoza bağlı olarak artar. Nitekim bizde ROS'lerinin artışına bağlı olarak TOS düzeylerini yüksek; TAS düzeylerini ise düşük bulduk. Çünkü oksidan sistemin artışını kompanse etmek için antioksidanlar oldukça fazla kullanılarak TAS düzeyi azalmıştır. Bulgularımız da bu hipotezi destekler niteliktedir.



Oksidatif stres lipid biyobelirteci olarak MDA, hücrede lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir. F2- izoprostanlar, özellikle 8-isoPGF<sub>2α</sub> spesifik, güvenilir ve in vivo lipid peroksidasyonunun non invazive biyobelirteci olarak ileri sürülmüştür. İzoprostanlar patolojik şartlarda oksidatif bozulmaya uğrar. Oluşan ürünler doku ve plazmada eser düzeylerde görülür. Bu düzeyler oksidatif stresin artması durumunda yükselir. Plazma doku ve idrarda 8-isoPGF<sub>2α</sub> artmış düzeylerinin kalp damar hastalıkları, alerjik astım, karaciğer sirozu gibi birçok hastalıkta oksidatif hasarın rol oynadığı ileri sürülmüştür [5].

Ayrıca Aydın ve ark.'larının KKKA hastalarında yapmış oldukları çalışmada MDA düzeylerini yüksek bulmuşlardır [127]. Hileman ve ark.'larının HIV enfekte yetişkinlerde plasebo kontrollü randomize çalışmada ise, oksidatif stres belirteçleri olarak ölçülen okside LDL ve F2-izoprostan/kreatinin düzeylerinin HIV enfekte hastalarda artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte antiretroviral tedavinin başlamasını takip eden 24 hafta sonunda, azalmış monosit aktivasyonu ile ilişkili olarak okside LDL düzeyinde hasta grubunda azalma kaydetmişlerdir. Okside LDL köpük hücrelerinin gelişiminde önemli bir rol oynayan LDL'nin proinflamatuvar şeklidir [128].

Akut karaciğer hasarı ve hepatik inflamasyonda hücre ölümünü tetikleyen ROS'lar nötrofiller ve Kupffer hücreleri tarafından üretilir. Bununla birlikte KKKA hastalığında en çok etkilenen organ karaciğerdir. HBV enfeksiyonu olan olgularda hepatosit hasarının nedeni olarak lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres belirteci olan MDA'nın arttığı gösterilmiştir [129, 130, 131].

Çalışmamızda diğer bir parametre olarak, oksidatif stres lipid biyobelirteci MDA ve 8-isoPGF<sub>2α</sub> düzeylerini saptadık. MDA düzeyleri hasta grubunda  $0,34 \pm 0,17$  kontrol grubunda ise  $0,07 \pm 0,04$  mM olarak bulunmuştur. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ( $p < 0,001$ ). Çalışma bulgularımız yukarıda bahsedilen diğer çalışmalarla uyumlu olarak, oksidatif stresin artışı göstermektedir. Lipid peroksidasyonunun bir diğer göstergesi olan 8-isoPGF<sub>2α</sub> düzeyleri hasta ve kontrol grubuna göre sırasıyla  $73,86 \pm 30,78$  ve  $31,81 \pm 16,08$  pg/ml olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). KKKA hastalığında yapılmış 8-izoPGF<sub>2α</sub> ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bilindiği üzere serbest radikallerin oluşumu lipid peroksidasyonu başlatır. Artan lipid peroksidasyonunun son ürünü de MDA'dır. Lipid peroksidasyonu ile MDA artar. Çalışmamızda serbest radikallerin artışı TOS düzeylerinin yükselmesi ile gösterdik. Bulgularımızda da KKKA hastalarında MDA'nın arttığını gördük. Bu bulgu yukarıdaki çalışmalarla ve hipotezle oldukça uyumludur.

KKKA hastalığının patogeneğinde endotel hasarı önemli rol oynar [1]. Viral faktörler endotelyumu indirekt olarak hedefler. Sonuçta, endotel aktivasyonu ve disfonksiyonu oluşur [21]. Endotel birçok uyarana yanıt olarak, vazokonstrüktör ve vazodilatör özellikte maddeleri sentezleyip salgılar. Endotelde NO üretimindeki bozulma; endotelin, anjiyotensin gibi, gevşeme ve kasılma faktörlerinde dengesizliği gösterir [113]. KKKA hastalığında endotelial hasar muhtemelen indirekt ve inflamatuvar hücre aktivasyonu ile oluşur.

Kronik viral hepatitlerin patogeneğinde, NO'nun rolü tam olarak anlaşılammıştır; ancak bunların aşırı üretiminin, inflamatuvar durumlarda patolojik değişikliklerden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Bir viral enfeksiyon nedeni ile gelişmiş hepatit B ve C vakalarında iNOS aktivitesinin artmış olduğu bildirilmiştir [131]. Başka bir çalışmada ise nitrik oksit ve peroksinitrit düzeyleri pandemik H1N1 ve mevsimsel grip A enfekte hasta gruplarında kontrollere göre yüksek olduğu bulunmuştur [132]. NO hemen hemen tüm hepatik hücrelerde üretilir. Karaciğerde diğer doku ve organlarda olduğu gibi, NO hücresel yada moleküler düzeyde birçok etkiye sahiptir [130]. Özellikle inflamasyon gibi patolojik durumda, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artarak NOS aktive olmakta, makrofajlar ve nötrofillerden NO salınımı gerçekleşmektedir.

Reaktif oksijen türleri ve oksidatif stres iyi araştırılmış olmasına rağmen; ancak son zamanlarda organizmanın hayatta kalması için kritik olan “nitrozatif stresin düzenlenmesi” önem kazanmıştır. Nitrik Oksit (NO), 8-Nitroguanin (8-NG) ve 3-Nitrotirozin (3NT) nitrozatif stres biyobelirteçleridir. Bizde çalışmamızda KKKA hasta ve kontrol grubunda nitrozatif stresin bir belirteci olarak NO düzeylerini saptadık.. Buna göre NO değerleri hasta grubunda  $21,72 \pm 7,51$  kontrol grubunda ise  $15,43 \pm 4,8$   $\mu\text{mol/L}$  olarak bulundu. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ( $p < 0,001$ ). KKKA hastalığında NO düzeyleri ilk kez bizim çalışmamızda saptamıştır. Bu nedenle literatürde benzer bir çalışma bulunmamaktadır. Viral enfeksiyon hastalıkları ile yapılan birçok çalışmada, bizim bulgularımızla uyumlu olarak, NO düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek bulunduğu belirtilmiştir [133, 134, 135]. KKKA gibi şiddetli patolojik durumlarda süperoksit ( $\text{O}_2^-$ ) salınımı da NO salınımıyla eş zamanlı olarak meydana gelir. NO ile  $\text{O}_2^-$  radikali reaksiyona girerek oldukça hasar verici bir oksijen radikali olan peroksinitriti ( $\text{ONOO}^-$ ) oluşturmaktadır [113].

İndüklenebilir NOS aktivasyonu sonucunda oluşan nitrik oksit, virüs benzeri patojenlerle uyarılabilen dokularda sitokin ve endotoksinlerle birlikte yüksek miktarlarda üretilir. KKKA hastalarındaki virütik öğeler, sitokinler ve ileri oksidasyon ürünleri, endotelial hücreleri aktive ederek oksidatif stresi artırmış olabilirler. Bu hastalarda önemli miktarda

inflamasyonun oluştuğu bilinmektedir. Nitrik Oksit, inflamasyonun birçok aşamasında rol oynamaktadır. Farklı ajanların uyarısı ile monositler, mast hücreleri, makrofajlar ve nötrofiller, NO sentezleme yeteneğine sahiptirler [113, 114]. KKKA hastalarında farklı ajanlar virüs ve onun ürünleri olabilir. Bu rnler ayrıca iNOS'ı indükleyerek NO üretimini arttırabilirler. Nitrozatif stres prekürsörü olan NO'in, KKKA hastalarında tüm bu mekanizmaların etkisi ile artmış olduğunu çalışmamızda gördük.

Oksidatif ve nitrosatif stresin protein biyobelirteci 2- pirolidin ve 3- nitrotirozin'dir. Bunlar proteinlerden aminoasit kalıntılarının direk oksidasyonu ile üretilir. Bunlar özellikle lizin, arjinin, treonin ve prolin tarafından oluşturulur. Ayrıca lipitlerin ve şekerlerin oksidasyon ürünleri ile ikinci bir reaksiyonla meydana gelirler. ROS ve RNS ile bağlantılı hastalıklarda 3-nitrotirozin dzeyelerindeki yükseklik, bazı çalışmalarda gösterilmiştir [5]. NO ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalinin oluşturduğu ONOO<sup>-</sup>, birçok fizyopatolojik etki gösterir. Yarılanma mr çok kısa olan bu molekül, nitronyum iyonuna dönüşerek tirozin ile 3-NT oluşturur. 3-NT'in oluşumu ile tirozinin fosfatlanması engellenerek hücre sinyalizasyonu bozulur [135]. Bundan dolayı önemli hücresel aktiviteler, özellikle hücre sağ kalım ve ölüm mekanizmaları da etkilenebilir.

KKKA hastalarında çalışmamıza benzer bir çalışma yapılmamıştır. Ancak, benzer klinik özelliklere sahip, ciddi viral enfeksiyon hastalığı olan HIV'de yapılmış bir çalışmada, nitrozatif stresin protein hasarı biyobelirteci olarak 3-NT dzeyelerine bakılmış ve kontrole göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur [133]. Çalışmamızda bizde 3-NT dzeyelerini, hasta grubunda 265,51 ± 84,87 nmol/L; kontrol grubunda ise 165,09 ± 52,48 nmol/L olarak bulduk. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır (p < 0,001). Yukarıda bahsettiğimiz çalışma ile bizim çalışmamızdaki bulgular birbirini desteklemektedir. Çalışmamızda hasta grubunda artmış olan 3-NT seviyeleri, çalışmış olduğumuz diğer parametrelerle ilişkili olarak yükselmiş olabilir. Çünkü NO artışı, tirozin nitrasyonunun temel aracı molekülü olan peroksinitrit oluşumunu uyarır. İNFLAMATUVAR olaylar, proteinlerdeki tirozin kalıntılarının nitrasyonu için uygun ortamı sağlayabilir. Bu nedenle 3-NT'in; inflamasyonun yoğun olarak yer aldığı KKKA hastalarında, değişmiş protein fonksiyonuna bağlı olarak gelişen, oksidatif ve nitrozatif hasarın bir belirteci olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca 3-NT protein agregasyonuna neden olduğundan dolayı KKKA hastalarının patogenezinde önemli rol oynayabilir. Bundan dolayı KKKA hastalarında 3-NT'ini çalışmayı amaçladık ve sonuçta arttığını gözlemledik.

ONOO<sup>-</sup>; hem mitokondride elektron transport zincirinde yer alan enzimleri inhibe ederek enerji azalmasına, hem de DNA kırıklarına neden olur. Bu etkiler sonucunda PARS

olarak bilinen DNA onarım enzimini aktive etmiş olur. PARS hücre içi  $\text{NAD}^+$ 'yi substrat olarak kullanarak glikoliz ve elektron transportunun yavaşlamasını, dolayısıyla ATP oluşumunun azalmasını ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenazın (GAPDH), ADP ribozilasyonunu uyarır. Bu olaylar zinciri ile enerji açığı meydana gelerek, hücrenin disfonksiyonunu ve ölümünü tetikler [137]. Bu nedenle KKA hastalarında nitrozatif stresin DNA biyobelirteci olarak 8-NG düzeylerini çalıştık.

8-NG düzeyleri, hasta grubunda  $71,49 \pm 13,47$  ng/ml iken; kontrol grubunda  $27,47 \pm 9,53$  ng/ml olarak bulunmuştur. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ( $p < 0,001$ ). Literatürde, bizim çalışmamız ile karşılaştırabileceğimiz herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak hasta grubumuzda bulduğumuz yüksek seviyedeki NO'nin özellikle bazal seviyenin üstünde ve artmış süperoksit radikali ile hızlıca peroksinitrite dönüştüğünü söyleyebiliriz. Bu RNS'leri inflamasyon dokularında 8-NG'nin oluşumunu uyarılmış olabilir. Bizce hasta grubumuzda 8-NG düzeylerindeki yükseklik normal dokularında tespit edilemeyen bu belirtecin yoğun nitrozatif stres ile DNA hasarını göstermektedir.

Çalışmamızda DNA nitrozatif hasarını, 8-NG düzeylerinin artışı belirleyerek göstermiştik. DNA oksidatif hasarını gösteren en iyi ürün ise, oksidatif olarak değişmiş guanin bazının bir ürünü olan 8-OHdG'dir. 8-OHdG'nin yükselmiş serum ve idrar seviyeleri kalp yetmezliği, miyokard ve Parkinson hastalarında tespit edilmiştir. Ayrıca 8-OHdG seviyeleri diyetten bağımsızdır [5]. HCV ve HBV enfeksiyonu olan olgularla yapılan bir çalışmada, 8-OHdG düzeylerinin kontrol grubun göre arttığı bildirilmiştir [138]. KKA hastalığında yapılmış böyle bir çalışma bulunmamaktadır. 8-OHdG düzeylerini, hasta grubunda  $32,19 \pm 10,48$  ng/ml; kontrol grubunda ise  $11,40 \pm 5,88$  ng/ml olarak bulduk. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). Yukarıda bahsettiğimiz çalışma ile elde ettiğimiz sonuçlar uyumludur. 8-OHdG düzeylerinin, TOS'lerin artışıyla birlikte, DNA'nın oksidatif hasarının yüksekliğini söyleyebiliriz. Enfeksiyon gibi patolojik durumlarda, hücrelerin aşırı uyarılmaları sonucu  $\text{Ca}^{+2}$  derişimi artıp, yüksek afinite ile DNA'daki guanin bazlarına bağlanarak, oksidatif stresin DNA üzerindeki hasarı uyarılmış olabilir.

Glikozatif stres belirteci olarak karboksimetillizin düzeylerini çalışmamızda inceledik. Gelişmiş glikasyon son ürünleri AGE'ler, indirgen şekerler tarafından proteinlerin nonenzimatik glikasyon ürünleridir. Bu AGE'ler yaş, diyabet, böbrek yetmezliği ve Alzheimer hastalığı olanların plazma ve dokularında biriktiği bildirilmiştir. Bunların glisemik kontrol takibinde, diyabete bağlı klinik komplikasyonların riskini tahmin etme ve nöropati, nefropati, retinopati ile diyabetik hastaların tedavi etkisinin takibinde, potansiyel yararlı

biyobelirteçleri olduğu kabul edilir. Karboksimetillizin (CML) ve pentosidin, AGE'lerin belirlenen biyobelirteçleridir ve oksidasyon eşliğinde glikasyon (glikozatif stres) ürünleridir [5].

Araştırmamızda; glikozatif stres parametresi olarak karboksimetillizin düzeylerini çalıştık. KKKA hastalarında: kapiller endotelin hedef olduğu endotelial hasar meydana gelmektedir [3]. AGE'lerin reseptörleriyle etkileşiminden dolayı, hücrel sinyal yolları aktive olup sitokinlerin salınımını indükler. AGE reseptörü olan RAGE'ler, özellikle fagositlerde bulunurlar [139]. Sitokin salınması AGE'lerin arttığını göstermektedir. Bu şekilde hücrelerin aşırı uyarılmaları sonucu dokularda bozulma ve membran hasarı oluşur [108, 139, 140]. KKKA hasta ve kontrol grubunda sırayla;  $106,72 \pm 67,12$  ng/ml ve  $39,70 \pm 15,16$  ng/ml değerlerini elde ettik. İki grup arasındaki farkı istatistiksel olarak anlamlı bulduk ( $p < 0,001$ ). Çalışmamızda KKKA hastalarında karboksimetillizin düzeyleri kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,001$ ). Bu artış, bize hastalardaki doku ve membran hasarını açıklamaktadır.

Çalışmamız da KKKA hastalarında, TOS, 8isoPGF2 $\alpha$ , 8-Nitroguanin, 8-OHdeoksiguanozin, Karboksimetillizin, Nitrik Oksit, 3-Nitrotirozin, ve MDA düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yükseldiği belirlendi ve TAS düzeylerinin ise bunun aksine hasta grubunda düştüğü görüldü.

Çalışmamızda parametrelerin birbirleriyle korelasyonunu kıyaslandığında;

OSİ ile 8-NG, 3-NT ve KML arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif doğrusal bir ilişki bize bozulan antioksidan sistemin diğer tüm oksidatif, Nitrozatif, Glikozatif, belirteçlerinde artmasında önemli bir etken olduğunu göstermektedir. Buna karşılık 8-izoPGF2 $\alpha$  ile istatistiksel olarak anlamlı negatif doğrusal bir ilişki olduğu görüldü.

NO ile 8-OHdG ve MDA arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif doğrusal ilişki saptandı. 8-izoPGF2 $\alpha$  ile OSİ ve 3-NT arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif doğrusal ilişki bulundu. MDA ile KML arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif doğrusal ilişki ve NO ile ise; istatistiksel olarak anlamlı negatif doğrusal ilişki saptandı. 8-NG ile OSİ, 8-OHdG ve KML arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif doğrusal ilişki; 8-izoPGF2 $\alpha$  ve 3-NT arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif doğrusal ilişki bulundu. Bu parametreler ile literatürde kıyaslama çalışması olmadığından tartışılmamıştır.

Sonuç olarak çalışmamız da KKKA hastalarında, TOS, 8isoPGF2 $\alpha$ , 8-Nitroguanin, 8-OHdeoksiguanozin, Karboksimetillizin, Nitrik Oksit, 3-Nitrotirozin, ve MDA düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yükseldiği ve TAS düzeylerinin ise bunun aksine düştüğü belirlendi. Oksidatif, Nitrozatif, Glikozatif stres azaltılamaz ise, oluşan ürünlerin

miktarı gitgide artacak ve savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacaktır. Savunma sisteminin yetersiz kalması, organizmada çeşitli bozukluklara neden olacak ve tüm metabolizma etkilenecektir. Hastalığın prognozu ve tedavisi açısından bu bozuklukların giderilmesi gerekmektedir. Dolayısıyla hastaların tedavilerine antioksidan eklemek gerekebilir. Bu takviye antioksidan savunma sistemlerini güçlendirebilir ve oksidatif hasardan oluşabilecek bozuklukları engelleyerek hastalığın tedavi sürecinde etkili olabilir. Bunun olumlu yada olumsuz yönlerinin ortaya konabilmesi için çok daha ayrıntılı ve uzun süreli klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.



## 6. KAYNAKLAR

1. Gökahmetoğlu, S., Hemorajik Ateş Etkeni Viruslar, *Turkish J of Infection*,2006, 20(2): 137-144.
2. Ergonul O., Crimean-Congo Haemorrhagic Fever, *Lancet Infect Dis.*,2006, 6: 203-14.
3. Özkurt Z. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi, *Yoğun Bakım Dergisi* 2007;7(1): 85-90  
Ergonul O., Treatment of Crimean-Congo Haemorrhagic Fever, *Antiviral Research*, 2008, 78: 125-131.
4. Bakir M.,Elaldı N., Kırım Kongo Hemorajik Ateşi, *ANKEM Derg.*, 2006: 20 (Ek2): 227-231.
5. Keiki Ogino, Da-Hong Wang, Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress: An Approach to Disease Prevention. *Okyama. Acta Med* 2007; 61: 181-9.
6. Daniela, G, Dalle-Donne, I., Tsikas, D., Rossi R. (2009)Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*; 46(5-6): 241-281.
7. Daniela, G., Aldo, M., Colombo, R., Dalle-Donne, I., Rossi, R. (2003). Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood. *Clinica Chimica Acta*; 330: 85-98.
8. Phillips. L., Toledo, A.H., Lopez-Neblina, F., Anaya-Prado, R., Toledo-Pereyra, L.H. (2009). Nitric Oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg*: 22: 46-55.
9. Aygün, G., (2002). Sepsis ve Septik Şok, *Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi*; 31: 131-140.
10. Whitehouse, C.A. (2004). Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Anriviral Res*; 64: 145-160.
11. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. (2005). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. ANKARA.
12. Uyar, Y., Çarhan,A. (2009). Kırım Kongo Kanamalı Ateşi'nin ülkemizdeki epidemiyolojisi. *Türk Hijyen Der. Biyol. Dergisi*; 66 (2)
- 13.
14. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Bilimsel Değerlendirme Raporu. (2010). *Türk Tabipler Birliği Yayınları*. ANKARA
15. Seçmeer, G., Çelik, İ.H. (2010). Kırım Kongo kanamalı ateşi. *J Pediatr Inf*; 4: 152-9.
16. Kartı, S.S. (2009). Kırım Kongo kanamalı ateşi. *Ulusal Hematoloji Kongresi*; 109-11.

17. Fisher-Hoch, S. (1995). Crimean Congo-haemorrhagic fever treated with oral ribavirin. *Lancet*; 346: 472-5.
18. Huggins, J. (1989). Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin a broad-spectrum antiviral drug. *Rev Infect Dis*; 11:750-61.
19. Mordani, M... The efficacy of oral ribavirin in the treatment of Crimean Congo hemorrhagic fever in Iran. *Clin Infect Dis*; 36 (12): 1613-8.
20. Bodur, H. (2007). Kırım Kongo kanamalı ateşi. *Türkiyede sık karşılaşılan hastalıklar sempozyum dizisi*; 5: 267-77.
21. Akın, L. (2008). Kırım Kongo kanamalı ateşi. *Hacettepe Üniversitesi Tıp Dergisi*; 39: 134-43.
22. Sies, H. (1997). Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*; 82: 291–95.
23. Yorbık, Ö. (1999). Otistik bozukluğu olan çocuklarda antioksidan enzimler ve bunlarla ilgili eser elementlerin araştırılması. Uzmanlık Tezi, GATA, Ankara.
24. Handelman, G.,J. (2000). Evaluation of oxidant stress in dialysis patients. *Blood Purif*; 18(4): 343–9.
25. McCord, J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The Am J Med*; 108: 652-659.
26. Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L. (1994). Cellular injury and cellular death. In: Schoen FJ (ed). *Pathological basis of disease*. Landon. *WB Saunders*; 5: 1-34.
27. Halliwell, B. (1996). Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidants intake in humans. *Free Radical Res*; 25: 57-74.
28. Diplock, A.T., Chaleux, J.L., Crozier-VVilli, G., Kok, F.S., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Wina-Ribes. J. (1998). Functional food sciences and defenses against reactive oxygen species. *Br J Nutr.*; 80:77-112.
29. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1998). Free radicals in biology and medicine. *Free Rad Res*; 28: 672-8.
30. Kavas, G. (1989). Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri Fizyoloji*; 9: 1-8.
31. White, M.J., Heckler, F.R. (1990). Oxygen free radicals and wound healing. *Clinics in Plastic Surgery*; 17 (3): 473-84.
32. Angel, M.F., Romasatry, S.S, Swartz, W.M., Basford, R.E., Putrelli, J.E. (1987). Free radicals: Basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology and relevance to plastic surgery. *Plastic Reconstructive Surgery*; 79: 990-7.



33. Menache, P., Piwnica, A. (1989). Free radicals and myocardial protection: A surgical viewpoint. *Ann Thorac Surgery*; 47: 939-45.
34. Uysal, M. (1998). Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeneyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*; 11: 336-41.
35. Meister, A. (1994). Glutathione Ascorbate and cell cycle regulation. *FEBBS letters*; 1-4.
36. Moore, K., Roberts, L.J. (1998). Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res*; 28: 659-71.
37. Greenwald, R.A. (1991). Oxygen radicals, inflammation and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*; 20: 219-40.
38. Brent, J.A., Rumack, H.H. (1993). Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury I. Free Radical Chemistry. *J. Clinical Toxicology*; 49(4): 481-93.
39. Grace, P.A. (1994). Ischemia-reperfusion injury. *The British Journal of Surgery*; 81 (5): 637-47.
40. Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*; 201: 875-79.
41. Akkuş, İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza yayınları*; 1-132.
42. IARC. (1999). Hydrogen peroxide. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human/ World Health Organization. *International Agency for Research on Cancer (IARC)*; 71 (2): 671-89.
43. Wetberg, A.B., Weitzman, S.A., Clarck, E.P. (1985). Effects on antioxidants on antioxidant induce: sister chromatid Exchange formation. *J Clin Invest*; 75(3): 35 -7.
44. Slater TF. (1984). Free radical mechanism in tissue injury. *J Biochem*; 222: 1-15.
45. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2002;33(2):10-118
46. Wright, J.S., Shadnia, H., Chepelev, L.L. (2009). Stability of carbon-centered radicals: Effect of functional groups on the energetics of addition of molecular oxygen. *J of Computational Chemistry*; 30 (7): 1016-26.
47. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide. Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *J Pharmacol Review*; 43(29): 109-37.
48. Knowles, R.G., Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthase in mammals. *J Biochem*; 298 (12): 249-58.

49. Marletta MA. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*; 268 (7): 123-5.
50. Uğurcu, V. (2013). Diyaliz hastalarında arjinin ve arjinin ürünlerinin düzeyleri. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
51. Aktan, Ö.A., Yalçın, S.A. (1998). Ischemia-reperfusion injury, reactive oxygen metabolites and the surgeon. *Turkish J of Medical Sciences*; 28: 1-5.
52. Moncado, S., Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*; 329: 2002-11.
53. Özkan, M., Dweik, R. (2001). Nitric oxide and airway reactivity. *Clin Pulm Med*; 8: 199-206.
54. Kılınç, A., Kılınç, K. (2003). Nitrik oksitin fonksiyonları ve toksik etkileri. *Palme yayınevi*, 1-56, Ankara.
55. Herce-Pagliai, C., Kotecha, S. Shuker, D.E. (1998). Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: e review. *Nitric Oxide*; 2: 324-36.
56. Wink, D.A., Mitchell, J.B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: ,nsights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology Med*; 25: 434-56.
57. Halliwell, B., Zhao, K., Whiteman, M. (1999). Nitric oxide and peroxyntirite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res*; 31: 651-69.
58. Garcia, X., Stein, F. (2006). Nitric oxide. *Semin Pediatr Infect Dis*; 17: 55-7.
59. Halliwell, B. (1984). Oxygen is poisonous: The nature and medical importance of oxygen radicals. *J Med Lab Sci*; 41(3): 157-62.
60. Sies, H., De Groot, H. (1992). Role of Reactive Oxygen Species in Toxicity. *J Toxicology*; 64: 547-51.
61. Halliwell, B. (1991). Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *J The American Journal of Medicine*; 91 (3C): 14-22.
62. Mead, J. (1984). Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. Free radical in molecular biology. *J Aging and Disease*; 65(24): 53-66.
63. Reubset, F.A.G., Veerkamp, J.H., Tirjels, J.M.F., Monnens, L.A. (1992). Total and peroxisomal oxidation of various saturated and unsaturated fatty acids in rat liver, heart. *J M Quadri Ceps Lipids* ; 24(7): 11-6.

64. Koca, N., Karadeniz, F. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksidan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*; 32-7.
65. Catala, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol*; 38: 1482-95.
66. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trend Biochem Sci*; 15: 129-35.
67. Kanbak, G. (1994). P-Aminofenol toksisitesinde serbest radikaller ve antioksidan defans mekanizmalarının rolü. Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
68. Prokal, L., Yan, L.J., Vera-Serrano, J.L. (2007). Mass spectrometry-based survey of age-associated protein carbonylation in rat brain mitochondria. *J Mass Spectrom*; 42: 1583-9.
69. Rao, R.S., Moller, I.M. (2011). Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. *Proteomics*; 11: 4166-73.
70. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D. et al. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*; 329:23-38.
71. Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N. et al. (1990). 186: 464-78.
72. Breen, A.P., Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biol Med*; 18: 1033-77.
73. Helbock, H.J., Beckman, K.B., Ames, B.N. (1999). 8-Hydroxy-deoxyguanosine and 8-Hydroxy-guanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymology*; 300:156-66.
74. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroğlu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *Faseb J*; 17: 1195-214.
75. Hu, J.J., Dubin, N., Kurland, D., Ma, B.L., Roush, G.C. (1995). The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. *Mutat Res*; 336: 193-201.
76. Hardie, L.J., Briggs, J.A., Davidson, L.A. et al. (2000). The effects of hOGG1 and glutathione peroxidase 1 genotype and 3p chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer. *Carcinogenesis*; 21: 167-172.

77. Thornaley, P.J., Vasak, M. (1985). Possible role of metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress: kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Acta*; 827: 35-44.
78. Kayış, T. (2010). Diazinon'un subletal konsantrasyonlarının *Pimpla turionellae* L.'nin eşey oranı ve bazı biyokimyasal parametreleri üzerine etkileri. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
79. Kargın, F., Fidancı, U.R. serbest oksijen radikalleri ve oksidatif hasar. *Türk Veteriner Hekimliği Dergisi*;26.
80. World Health Organization (WHO). (2001). Biomarkers in risk assesment: Validitiy and validation.
81. Parisa, S., Emre, S. (2010). Biyobelirteçler ve lizozomal depo hastalıkları. *Hacettepe Tıp dergisi*; 41: 142-6.
82. Aerts, J.M., Hollak, C.E., Van Breemen, M., Maas, M., Groener, J.E.M., Boot, R.G. (2005). Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr*; 94 (447): 43-6.
83. Cox, T.M. (2005).Biomarkers in lysosomal storage diseases: a riview. *Acta Paediatr*; 94 (447); 39-42.
84. İşlekel H. (2015). Oksidatif stresin tandem kütle spektrofotometrede değerlendirilmesi. XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi; 40: 50.
85. Dalle- Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R. Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry*; 24: 55-99.
86. Oğuzhan, Ö., Hüseyin, E., Çakırca, G., Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein, DNA yapıları üzerine etkileri. *J of Clinical and Experimental Investigations*; 6(3): 331-6.
87. Konukoğlu, D. (1997). Free radicals and their roles. *Aile Hekimliği Dergisi*; 1(4): 197-200.
88. Tabakoğlu, E., Durgut, R. (2013). Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Dergisi*; 3(1): 69-75.

89. Catala, A. (2006). An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol*; 38: 1482-95.
90. Delibaş, N., Özçankaya, R. (1995). Serbest radikaller. *SDÜ Tıp Dergisi*; 2(3): 11-7.
91. Eken, A. Rat kan ve doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri. *J of Clin and Analytical Medicine*; 1: 69-73.
92. Sezer, K., Keskin, M. (2014). Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezindeki rolü. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*; 28 (1): 49-56.
93. Zhang, Q., Ames, J.M., Smith, R.D., Jhon, W., et al. (2009). A prospective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J Proteome Res*; 8: 754-69.
94. Nursten, H.E. (2005). The Maillard reaction. *Chemistry, biochemistry and implications*. Royal Society of Chemistr; Cambridge.
95. Gemayel, R., Fortpied, J., Rzem, R., Vertommen, D., et al. (2007). Many fructosamine 3-kinase homologues in bacteria are ribulosamine/erythrulosamine 3-kinases potentially involved in Protein deglycation. *FEBS J*; 274: 4360-74.
96. Milne, L.G., Musiek, E.S., Morrow, J.D. (2005). F2-isoprostanes as markers of oxidative stres in vivo: An overview. *Biomarkers*; 10 (1):10-23.
97. Basu, S. (2004). Isoprostanes: Novel Bioactive Products of lipids. *Free Radical Research*; 38 (2): 105-22.
98. Monstuschi, P., Barnes, P.J., Roberts, L.J. (2004). Isoprostanes; markers and mediators of oxidative stres. *The Faseb J*; 18: 1791-800.
99. Ding, Q., Keller, J.N. (2005). Evaluation of RAGE Isoforms, ligands and signaling in the brain. *Biochim Biophys Acta*; 1746: 18-27.
100. Lertsiri, S., Shiraishi, M., Miyazawa, T. (1998). Identification of deoxy- Dfructosyl phosphatidylethanolamine as a non-enzymatic glycation product of phosphatidylethanolamine and its occurrence in human blood plasma and red blood cells. *Biosci Biotechnol Biol Biochem*; 62; 893-901.

101. Creagh-Brown, B.C., Quinlan, G.J., Evans, T.W., Burke-Gaffney, A. (2010). The RAGE axis in systemic inflammation, acute lung injury and myocardial dysfunction: an important therapeutic target? *Intensive Care Med*; 36: 1644-56.
102. Singh, R., Barden, A., Mori, T., Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*; 44: 129-46.
103. Schaftingen, E.V., Collard, F., Wiame, E., Veiga-da-Cunha, M. (2010). Enzymatic repair of amadori products. *Amino Acids*; Doi: 10.1007/s00726-010-0780-3.
104. Miyazawa, T., Nakagawa, K., Shimasaki, S., Nagai, R. (2010). Lipid glycation and protein glycation in diabetes and atherosclerosis. *Amino acids*; DOI: 10.1007/s00726-010-0772-3.
105. Wiame, E., Lamosa, P., Santos, H., Van Schaftingen, E. (2005). Identification of glucoselysine-6-phosphate de glucose, an enzyme involved in the metabolism of the fructation product glucoselysine. *Biochem J*; 392: 263-9.
106. Udayan, D.U., Cohenford, M.A., Guha, M., Dain, J.A. (2006). In vitro nonenzymatic glycation of DNA nucleobases: an evolution of advanced glycation end products under alkaline PH. *Anal Bioanal Chem*; 386: 1633-40.
107. Seidel, W., Pischetsrieder, M. (1998). DNA-glycation leads to depurination by the loss of N2-carboxymethylguanine in vitro. *Cell Mol Biol*; 44: 1165-70.
108. Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Santos, A.N., et al. (2014). Role of advanced glycation end-products in cellular signaling. *Redox Biology*; 2: 411-29.
109. Schwedler, B., Metzger, T., Schinzel, R., Wanner, C. (2002). Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients. *Kidney International*; 62: 301-10
110. Yaylalı, Y.T., Küçükaslan, M. (2011). Endotel disfonksiyonu. *Pamukkale Med J*; 4(3): 152-7.
111. Lance, S., Terade, M. (2002). Oxidative stres and endothelial activation. *Crit Care Med*; 30: 186-91.
112. Şener, G., Yeğen, Ç.B. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Derg.*
113. Baskın, H. (1999). İnflamasyonda nitrik oksit yanıtı. *ANKEM Derg*; 13:374-379.

114. Sengoelge, G., Födinger, M., Skoupy, S., et al. (1998). Endothelial cell adhesion molecule and PMNL response to inflammatory stimuli and AGE-modified fibronectin. *Kidney International*; 54: 1637-51.
115. Bakır, M., Engin, A., Gozel, M.G., Elaldı, N., Kılıçkap, S., Çınar, Z. (2012). A new perspective to determine the severity of cases with Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Vector Borne Disease*; 49: 105-10.
116. Jain, S.K. (1998). Evidence for membran lipid peroxidation during THA in vivo aging of human erythrocytes. *Bioph Acta*; 937: 205-10.
117. Erel, O. (2005). A new automated colometric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*; 38: 1103-11.
118. Erel, O. (2004) A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*; 37: 112-9.
119. Çıragil, P. (2015). Viral hepatitlerde oksidatif stresin rolü. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg*; 7 (3): 93-99.
120. Durgut, R., Ataseven, V.S., Sağkan-Öztürk, A., Öztürk, O.H. (2013). Evaluation of total oxidative stress and total antioxidant status in cows with natural bovine herpesvirus-1 infection. *J Animal Sci*; 91: 3408-12.
121. Sırmatel, F., Duygu, F., Çelik, H., Selek, Ş., Sırmatel, Ö., Gürsoy, B., Eriş, F.N. (2009). Evaluation of total oxidative level and total antioxidant capacity in cases with chronic viral hepatitis. *Klinik Dergisi*; 22 (3): 92-6.
122. Güner, R., Tasyaran, M.A., Keske, S., Hasanoğlu, I., Yapar, D., Kaya Kalem, A. (2011). Strong relationship between total thiol status and thrombocytopenia in patients with Crimean-Congo Haemorrhagic fever. *Turkish J Biochem*; 36 (1): 182.
123. Gil, L., Martinez, G., Tapanes, R., Castro, O., Gonzalez, D., Bernardo, L. (2015). Oxidative stress in adult dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*; 71 (5): 652-7.
124. Acar, A., Görenek, L., Aydın, A., Eyigün, C.P., Eken, A., Sayal, A., Pahsa, A. (2009). Hepatit B virüs enfeksiyonlu hastalarda oksidatif stres ve antioksidan kapasitenin araştırılması ve interferon- $\alpha$ -lamivudin kombinasyon tedavisinin oksidatif stres üzerine etkisi. *Mikrobiyal Bul*; 43: 411-23.

125. Halliwell, B., Aruoma, O.I. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its Mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*; 281 (1-2): 1141-4.
126. Demir, S., Kaleli, İ., Aslan, D., Yurtseven, Ö. (2002). Hepatit C infeksiyonunda lipid peroksidasyonu. *Viral Hepatit Derg*; 8 (3): 538-9.
127. Aydın, H., Yıldız, G., Engin, A., Yılmaz, A., Çelik, K., Bakır, S. (2010). Malondialdehide, Vitamin E, and anti-oxidant enzyme activity levels in patients with crimean-congo hemorrhagic fever. *African J of Microbiology Res*; 4(22): 2402-09.
128. Hileman, C.O., Turner, R., Funderburg, N.T., Semba, R.D., McComsey, G.A. (2016). Changes in oxidized lipids drive the improvement in monocyte activation and vascular disease after statin therapy in HIV. *AIDS*; 30:60-73.
129. Rosser, B.G., Gores, G.J. (1995). Liver necrosis: cellular mechanism and clinical implications. *Special Reports and Reviews. Gastroenterol*; 108: 252-75.
130. Jain, S.K., Pemberton, P.W., Smith, A., McMahon, R.F., Borrows, P.C. Aboutwerat, A. (2002). Oxidative stress in chronic hepatitis C: not just a feature of late stage disease. *J Hepatol*; 36: 805-11.
131. Tache, D.E., Stanculescu, O.E., Banita, M.İ., Purcaru, S.O., Andrei, M.A., Comanescu, V., Pisoschi, C.G. (2014). Inducible nitric oxide synthase expression (iNOS) in chronic viral hepatitis and its correlation with liver fibrosis. *Rom J Morphol Embryol*; 55 (2); 539-43.
132. Marwan, S., Majid, M.M., Khazaal, S.S. (2011). Nitrosative stress status during seasonal and pdmH1N1 infection in Iraq. *J Infect Dev Ctries*; 5 (12): 863-7.
133. Li, W., Malpica-Llanos, T.M., Gundry, R., Cotter, R.J., Sacktor, N., McArthur, J., Nath, A. (2008). Nitrosative stress with HIV dementia causes decreased L-prostaglandin D synthase activity. *Neurology*; 70:1753-62.
134. Levy, A., Valero, L.C., Chuang, J.I., Lei, H.Y., Yeh, T.M., Lin, Y.S., Huang, Y.H., Liu, H.S. (2000). Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RRANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology*; 276 (1): 16-23.
135. Yen, T.T.C.H., Lin, Y.D., Shieh, C.C., Wu-Hsieh, B.A. (2008). Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol*; 82 (24): 12312-24.



136. Türközkan, N., Balabanlı, B., Karabıçak, U ve ark. (2000). Peroksinitrit aracılıklı harabiyetin plazma eritrosit ve dokularda 3-NT ölçümü ile gösterilmesi ve bazı antioksidanların etkisi. SBAG-AYAD-265 sayılı Tübitak Projesi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, ANKARA.
137. Tecder-Ünal, M., Tufan, H. (2003). Biyolojik sistemlerde peroksinitritin rolü. T Klin Kardiyoloji; 16:110-8.
138. Fujita, N., Sugimoto, R., Ma, N., Tanaka, H., Iwasa, M., Kobayashi, Y., Kawanishi, S., Watanabe, S., Kaito, M., Takei, Y. (2008). Comparison of hepatic oxidative DNA damage in patients with chronic hepatitis B and C. J Viral Hepatitis; 15: 498-507.
139. Parmaksız, İ.(2011). Diyabet komplikasyonlarında ileri glikasyon son ürünleri. Marmara Medical J; 1: 141-8.
140. Kılınç, K. (2011). Protein glikasyonu. Hacettepe Tıp Dergisi; 42: 95-104.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel bilgiler

Adı Soyadı Serpil ERŞAN  
Doğum Yeri ve Tarihi İstanbul-1973  
Medeni Hali Evli  
Yabancı Dil İngilizce  
İletişim Adresi Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, 58140-Sivas  
E-posta Adresi [sersan@cumhuriyet.edu.tr](mailto:sersan@cumhuriyet.edu.tr)

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise İzmit Derince Lisesi, 1990  
Lisans Cumhuriyet Üniversitesi, 1997  
Yüksek Lisans Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, 2004  
Uzman

Ünvan

### İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi, Uzman, 2000-  
Mühendislik Fakültesi  
Kimya Mühendisliği  
Bölümü