

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ HASTALARINDA
MALONDİALDEHİT, E-VİTAMİNİ DÜZEYİ, ANTİOKSİDAN
ENZİMLERİ VE MİYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTE
ÖLÇÜMLERİ

Hüseyin AYDIN
DOKTORA TEZİ

SİVAS
2008

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ HASTALARINDA
E-VİTAMİNİ DÜZEYİ, ANTİOKSİDAN ENZİMLERİ VE
MİYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTE
ÖLÇÜMLERİ

Hüseyin AYDIN

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof.Dr. Sevtap BAKIR

SİVAS

2008

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Senatosunun 05.04.1993 tarih ve 93/115 sayılı kararı ile kabul edilen tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır. Bu tez çalışması, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

(Proje No. T-344)

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜR'LÜĞÜNE

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı'nda "DOKTORA TEZİ" olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN : Prof.Dr. Sevtap BAKIR

ÜYE : Doç.Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

ÜYE : Doç.Dr. Eser KILIÇ

ÜYE : Yrd.Doç.Dr. Kenan ÇELİK

ÜYE : Yrd.Doç.Dr. Yavuz SİLİĞ

Yukarıda ki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../ 2008

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Tez alıŐması boyunca değerli bilgi ve tecrübeleriyle çalıŐmalarımın her aŐamasında bana yol gÖsteren danıŐman hocam sayın Prof. Dr. Sevtap BAKIR'a, yoğun çalıŐmalarım süresince bilgi ve emeğini esirgemeyen sayın Doç. Dr. Fazıl YENİDÜNYA ve Yrd. Doç. Dr. Kenan ÇELİK'e , Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine ve tüm çalıŐanlarına, çalışma grubunun oluŐturulması sırasında katkılarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Aynur ENGİN'e ve Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR'a en içten teŐekkürlerimi sunarım.

Bu alıŐma süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen eŐim Gamze AYDIN'a, ocuklarım Onurcan, Atacan ve Atakan'a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) viral hemorajik ateşli bir hastalıktır. Yaygın olarak hayvanlarda bulunur fakat sporadik vakalar veya salgınlar halinde insanlarda da görülmektedir. KKKA, Bunyaviridae ailesine bağlı Nairovirus soyundan virüslerin meydana getirdiği, şiddetli bir seyir gösteren ve ölüm oranı oldukça yüksek olan bir hastalıktır. İnsanlara virüs, genellikle enfekte keneler (özellikle Hyalomma cinsi) tarafından ısırılma yoluyla bulaşır. Enfekte hayvan ve insanlara ait kan, vücut sıvıları ve sekresyonları ile temas sonucunda da bulaşabilir. Klinik belirtileri spesifik değildir ve tipik belirtiler; yüksek ateş, baş ağrısı, eklem ağrısı, kas ağrısı, kusma, karın ağrısı ve kansız ishaldir.

Bu çalışmada, oksidatif strese bağlı olarak, oksidatif hasarın bir sonucu olan lipid peroksidasyonu olup olmadığına, antioksidan enzimlerinin (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz) aktivitelerine, E-vitamini düzeylerine ve antimikrobiyal etkiye sahip miyeloperoksidaz enzim aktivitesine bakılmıştır.

KKKA tanısı konulmuş 47 hasta, her hangi bir sistemik hastalığı olmayan ve hasta grubundaki bireylerle yaş, cinsiyet açısından bezerlik gösteren 41 kontrol grubu seçildi. Tüm bireylerin lökosit MPO aktivitesi, eritrosit SOD, CAT, GSHPx, GR aktiviteleri ve MDA düzeyi, plazma MPO aktivitesi, vitamin E ve MDA düzeyleri tespit edildi. KKKA hastalarında SOD enziminin aktivitesinin arttığı ($p<0,05$), öte yandan CAT, GSH-Px ve GR enzim aktivitelerinin değişmediği görüldü ($p>0,05$). E vitamini düzeyinin ise kontrol örneklerinden daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Plazma ve lökosit MPO aktivitesi ile MDA düzeyi kontrol grubuna göre bir artış olduğu saptandı ($p<0,05$).

KKKA hastalarında MPO, SOD aktiviteleri ve MDA düzeyinin anlamlı derecede yüksek bulunması, KKKA hastalarında serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonundaki artışın bir yansıması olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, KKKA hastalarında viral yük ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi kesin olarak belirlemek için daha büyük örneklerden oluşan hasta grupları ile araştırmaların yapılması gerekmektedir.

ABSTRACT

Crimean–Congo hemorrhagic fever (CCHF) is a viral disease. It is generally found in animals but it can also be seen in humans sporadically or epidemically. CCHF, caused by the members of *Nairovirus* genus belonging to Bunyaviridae family, shows a severe prognosis and has a very high mortality rate (30-50%). Humans are generally infected by infected ticks, especially by the members of *Hyalomma* genus virus, through biting. Infection can also occur by coming in contact with infected animal and human blood, body fluids or secretions.

Our aim was to determine the activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione reductase, catalase), vit-E levels, myeloperoxidase enzyme activities (that has an antimicrobial activity) and lipid peroxidation as a result of oxidative stress. We have constituted two groups. In the first group were 47 patients with Crimean Congo hemorrhagic fever (CCHF). In the control group were 41 patients and resembled to the first group in point of the age and sex parameters. In all patients the levels for leucocyte MPO, erythrocyte SOD, CAT, GSHPx, GR, MDA, plasma MPO and Vitamine-E were determined. In CCHF patients the SOD level was significantly higher ($p < 0.05$), whereas CAT, GSH-Px and GR levels did not show any significant difference between two groups ($p > 0.05$). Vitamine-E levels were lower than those control of groups ($p < 0.05$). Plasma and leucocyte MPO activities in CCHF patients were higher than those control groups ($p < 0.05$).

The elevation in MPO, SOD and MDA levels indicates the elevation in free oxygen radicals, lipid peroxidation and neutrophil infiltration. Nevertheless we need more studies with larger number of patients to show the relationship between oxidative stress and virus levels in CCHF.

Keywords: Crimean–Congo hemorrhagic fever, antioxidant, myeloperoxidase

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR	VIII
TABLolar VE ŞEKİLLER	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA):	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. KKKA Hastalığına Neden Olan Virüsün Özellikleri	3
2.1.3. KKKA Virüsünün Vektörü Olan Kenelerin Yaşam Döngüsü	5
2.1.4. KKKA Hastalığına İklimin Etkisi	6
2.1.5. KKKA Hastalığının Bulaşma Yolları	7
2.1.6. KKKA Hastalığının Klinik Belirtileri	8
2.1.7. KKKA Hastalığında Laboratuvar Bulguları	8
2.1.8. KKKA Hastalığının Coğrafik Dağılımı	9
2.2. Serbest Radikaller	10
2.2.1. Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları	10
2.2.2. Moleküler Oksijenin Özellikleri	11
2.2.3. Reaktif Oksijen Türleri	12
2.2.3.1. Süperoksit ($O_2^{\bullet -}$)	13
2.2.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	14
2.2.3.3. Hidroksil Radikali ($\bullet OH$)	15
2.2.3.4. Singlet Oksijen (O_2^{\bullet})	16
2.2.3.5. Nitrik Oksit (NO)	16
2.2.4. Serbest Radikallerin Kaynakları	16
2.2.4.1. Biyolojik Kaynaklar	16
2.2.4.2. Hücre içi Kaynaklar:	17
2.2.5. Serbest Radikallerin Etkisi	17

2.2.5.1.Lipit Peroksidasyonu	18
2.2.5.2.Proteinlere Etkisi	20
2.2.5.3.Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkisi	21
2.2.5.4.Karbohidratlara Etkisi	21
2.3.Antioksidan Savunma Sistemleri	21
2.3.1.Antioksidan Enzimler	23
2.3.1.1.Süperoksit Dismutaz (SOD)	23
2.3.1.2.Katalaz (CAT)	23
2.3.1.3.Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)	23
2.3.1.4.Glutatyon Redüktaz (GR)	24
2.3.2. Diğer Antioksidanlar	24
2.3.2.1 E-Vitamini	24
2.4. Miyeloperoksidaz (MPO)	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereçler	27
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Hasta ve Kontrol Grubu	27
3.2.2. Numunelerin Hazırlanması	27
a. EDTA'lı plazma ve eritrosit suspansiyonu	28
b. Heparinli Plazma ve lökositin elde edilmesi	28
3.2.3. Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayini	28
3.2.4. Katalaz Tayini	30
3.2.5. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Tayini	33
3.2.6. Glutatyon Redüktaz Aktivite Tayini	34
3.2.7. E-Vitamini Tayini	36
3.8. Lipit Peroksidasyon Tayini	37
3.2.9. Miyeloperoksidaz Aktivite Tayini	39
3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	42
4. BULGULAR	43
4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Cinsiyet ve Yaş Dağılımı	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	51
6. KAYNAKLAR	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	: Edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromu
aPTT	: Aktif parsiyal tromboplastin zamanı
ALT	: Alanin transaminaz
AST	: Aspartat transaminaz
ATP	: Adenozin trifosfat
CAT	: Katalaz
DHF	: Dengue hemorajik ateş
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	:Enzim-bağlı immünosorbent ölçümü
ER	: Endoplazmik retikulum
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FeCl ₃	: Demir üç klorür
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSHPx	: Glutasyon peroksidaz
HCl	: Hidroklorik asit
HCV	: Hepatit C virüsü
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HOCl	: Hipoklorik asit
IFA	: İndirekt flüoresans antikor
Ig G	: İmmunglobulin G
Ig M	: İmmunglobulin M
KKKA	: Kırım-Kongo Kanamalı Ateş
MDA	: Malondialdehit
MDA _{erit.}	: Eritrosit malondialdehit
MDA _{plaz.}	: Plazma malondialdehit
MPO	: Miyeloperoksidaz
MPO _{erit.}	: Eritrosit miyeloperoksidaz

MPO_{lök.} : Lökosit miyeloperoksidaz
NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO : Nitrik oksit
O₂[•] : Süperoksit
•OH : Hidroksil
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
PUFA : Çoklu doymamış yağ asitleri
RAS : Recurrent Aphthous Stomatitis
RCF : Relatif santrifüj kuvveti
RNA : Ribonükleik asit
RO[•] : Alkoksil
ROOH : Hidroperoksit
ROT : Reaktif oksijen türleri
RT-PCR : Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SNAP : S-nitrozo-N-asetil penisillamin
SOD : Süperoksit dismutaz
TBA : Tiyobarbitürük asit
TCA : Trikloroasetik asit
TPTZ : 2,4,6-tripidil-s-triazin

TABLolar VE ŞEKİLLER

TABLolar

Tablo 1. Kontrol ve hasta gruplarının yaş ve cinsiyet demografik bilgileri	43
Tablo 2. Çalışma Gruplarının Yaş Dağılımı	43
Tablo 3. Hasta ve Kontrol Grubu lülen Parametrelerin Değerlendirilmesi	44
Tablo 4. Kontrol Hasta Grubunda yaş gruplarına göre lülen Parametrelerin karşılaştırılması	45
Tablo 5. Hasta Grubunda yaş gruplarına göre lülen Parametrelerin karşılaştırılması	46
Tablo 6. Kontrol Grubunda lülen Parametreler yönünden erkek ve kadınların karşılaştırılması	47
Tablo 7. Hasta Grubunda lülen Parametreler yönünden erkek ve kadınların karşılaştırılması	48
Tablo 8. Hasta ve Kontrol Grubundaki erkeklerin lülen Parametrelerin değerlendirilmesi	49
Tablo 9. Hasta ve Kontrol Grubundaki Kadınların lülen Parametrelerin değerlendirilmesi	50
Tablo 10. Orta Anadolu illerinde zamana bağlı olarak artma eğilimi gösteren KKKA vaka ve ölüm sayıları	51

ŞEKİLLER

Şekil 1: Bunyaviridae virionunun Şematik kesiti	4
Şekil 2: <i>Hyalomma m.marginatum</i> 'un yaşam döngüsü	6
Şekil 3: Kırım Kongo Hemorajik hastalığının görüldüğü coğrafya	10
Şekil 4: Delta O ₂ , Sigma O ₂	12
Şekil 5: Oksijenin dört tek-elektron basamağı tarafından indirgenmesi	13
Şekil 6: Serbest radikal aracılı hücre hasarı	18

Şekil 7: Lipit peroksidasyonu	20
Şekil 8: Serbest radikal savunmanın şematik olarak gösterilmesi.	22
Şekil 9: Aktive edilmiş nötrofillerin yaptığı fagositik solunum patlaması esnasında reaktif oksijen türlerinin oluşması.	26
Şekil 10: a: Lökositler parçalanmadan önce b: Lökositler parçalandıktan sonra	28
Şekil 11. SOD aktivite standart grafiği	30
Şekil 12. CAT aktivite standart grafiği	32
Şekil 13. MDA standart grafiği	38
Şekil 14. MPO aktivite standart grafiği	40

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aerobik organizmalar yaşamlarını sürdürebilmek için oksijene mutlak gereksinim duyarlar. Oksijen hücrede bir dizi reaksiyon sonucunda suya dönüşür ve bu esnada hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlar. Fakat bu süreçte oksijenin %2-3 kadarı suya dönüşmeyip oksijen kaynaklı radikaller oluşur. Oksijen bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali, iki elektron alarak indirgenmesi ile hidrojen peroksit oluşur. Üçüncü elektronun eklenmesi ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali, dördüncü elektronun eklenmesi ile su oluşur. oksijenden türeyen ROT; süperoksit (O_2^{\bullet}), hidroksil ($^{\bullet}OH$), Alkoksil (RO^{\bullet}), nitrik oksit (NO^{\bullet}), hidroperoksit ($ROOH$), peroxyinitrite ($ONOO^-$) gibi oldukça toksik bileşiklerdir (1, 2). Aşırı miktarda üretilen Reaktif Oksijen Türleri (ROT) organizma için oldukça toksiktir. Bu toksik etkilerden biride lipit peroksitlerinin oluşmasına bağlı olarak hücre membranının bozulmasıdır. Reaktif oksijen bileşikleri ve serbest radikaller vücutta birçok fizyolojik veya patolojik süreçte rol almaktadırlar; enflamatuvar kaskatta, diyabet, kanser ve romatizmal hastalıkların patofizyolojisinde önemli rol oynar (1, 3, 4, 5,).

Oksijen radikallerinin kaynakları; elektron transport zinciri, bakır ve demir gibi geçiş metallerinin aracılık ettiği bazı kimyasal reaksiyonlar, yağ asitlerinin peroksizomal oksidasyonu, inflamasyonda fagositlerin aktivasyonu, bazı ilaçlar, sigara ve radyasyon (X ışınları ve ultraviyole), çeşitli enzimler (NADPH oksidaz, ksantin oksidaz ve 15-lipooksijenaz vb) dir (6, 7, 8, 9).

Serbest radikal üretiminin artması ya da antioksidan savunma sistemi yetersiz kalması; hücrelerin lipit, protein, DNA ve karbohidrat gibi biyomoleküllerine etki eder. Süperoksit radikali ve hidroksil radikali stoplazma, mitokondri, hücre çekirdeği ve endoplazmik retikulum membranlarında lipit peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipit peroksidasyonunun oluşmasına bağlı olarak, membran permeabilitesi artar ve hücre hasarına neden olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir.

Serbest radikallerin yarılanma ömrü kısa olduğu için vücuttaki konsantrasyonlarını tespit etmek oldukça zordur. Bu sebepten dolayı lipit

peroksidasyonunun biyomarkırı olan malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi enzimler ve antioksidan vitaminlerden α -tokoferol (E vitamin) gibi antioksidan maddelerin belirlenmesi yolu ile dolaylı bilgi edinilmektedir.

Bu çalışmada; Sivas ve çevre illerde yaygın olan KKKA vakalarında, viral enfeksiyonun oksidan/antioksidan dengesini nasıl etkilediğini göstermek için; oksidatif strese bağılı olarak meydana gelen MDA düzeyine, antioksidan enzim (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz) aktivitesine ve antioksidan vitaminlerden E-vitamini düzeyine, antimikrobiyal etkiye sahip miyeloperoksidaz enzim aktivitesine bakılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ (KKKA):

Kırım Kongo Hemorajik Ateş (KKHA), Bunyaviridae ailesinden Nairovirüs'un neden olduğu, ateş, ekimoz, kanama, trombositopeni ve karaciğer fonksiyon bozukluğu gibi bulguları bulunan, şiddetli bir seyir gösteren ve ölüm oranı oldukça yüksek olan, genellikle keneler tarafından bulaştırılan ateşli, kanamalı bir hastalıktır. Hastalık hayvanlarda, insanlara nazaran daha yaygın olarak görülmekle beraber asemptomatik seyretmekte olup, zoonoz karakterli bir hastalıktır, sporadik vakalar veya salgınlar şeklinde insanlarda da görülebilmektedir (10,11).

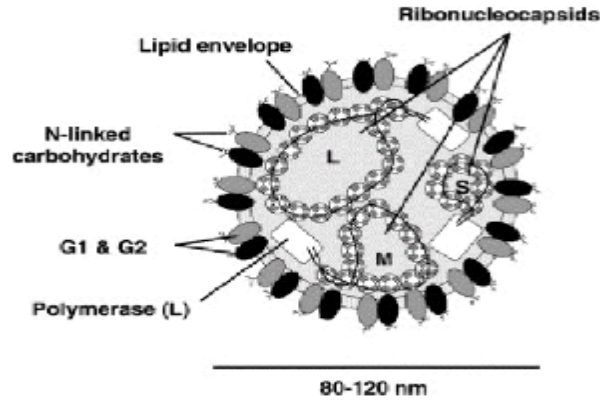
2.1.1. TARİHÇE

12. yüzyılda Orta Asya'da Tacikistan bölgesinde ki Karatavuk paraziti olan küçük sert kene ya da bitlerde bulunan virüsün; idrarda, dışkıda, dişetlerinde, balgam, kusmuk ve karın boşluğunda kanamaya neden olunan hastalığa Viral Hemoraji denmiştir. Modern dönemde ise, KKKA ilk kez 1944-45 yıllarında, Kırım'da Nazi işgalinden yeni kurtulan köylülere yardım eden 200 Sovyet askerinde görülmüş. Hastalık 1960'lı yılların ortalarına kadar iki ayrı virüs tarafından oluşturulan iki ayrı hastalık olarak düşünülmekteydi ve Kırım kanamalı ateşi ve Kongo kanamalı ateş adlarıyla anılmaktaydı. 1967 yılında yeni doğan farelerden izole edilen Kırım kanamalı ateş virüsü ile 1956 yılında Belçika Kongo'sunda (Zaire) görülen Kongo virüsünün antijenik olarak aynı olduğu görülmüş. Bu hastalık 1969 yılından itibaren KKKA ismi ile anılmaya başlanmıştır (12, 13).

2.1.2. KKKA HASTALIĞINA NEDEN OLAN VİRÜSÜN ÖZELLİKLERİ

Virüs yaklaşık 100 nm çapında ve sferik görünümündedir. Glikoprotein çıkıntıları içeren bir lipit zarfın altında viral genomun ve buna bağlı proteinlerin (nükleoproteinler ve polimeraz) saklandığı kapsit adı verilen çekirdek bulunur (Ancyclopedia of virology). Bunyaviridae ailesinin diğer üyeleri gibi KKKA virüsü üç yapısal proteine sahiptir. Bunlardan ikisi zar glikoproteinleridir ve Gn ve Gc olarak adlandırılır. Diğeri ise nükleokapsit proteindir ve N olarak *şekil 1*'de gösterilmiştir. KKKA hastalığına etkeni *Bunyaviridae* ailesine mensup olan

Nairovirü'tür. *Nairovirüs* zarflı ve RNA virüsüdür. *Nairovirüs*'un şematik kesiti aşağıda şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1: Bunyaviridae virüsünün şematik kesiti; Üç adet RNA genom segmenti (L, M ve S) ribonükleokapsit yapısı oluşturmak amacıyla nükleokapsit proteini ile birlikte paketlenmişlerdir. Nükleokapsit ve RNA ya bağlı RNA polimeraz da Gn ve Gc olarak bilinen glikoproteinler içeren bir lipit zarf içinde paketlenmişlerdir. Bu viral glikoproteinlerin duyarlı hücrelerdeki reseptör bölgelerini tanımaktan sorumlu olduğuna inanılmaktadır (14).

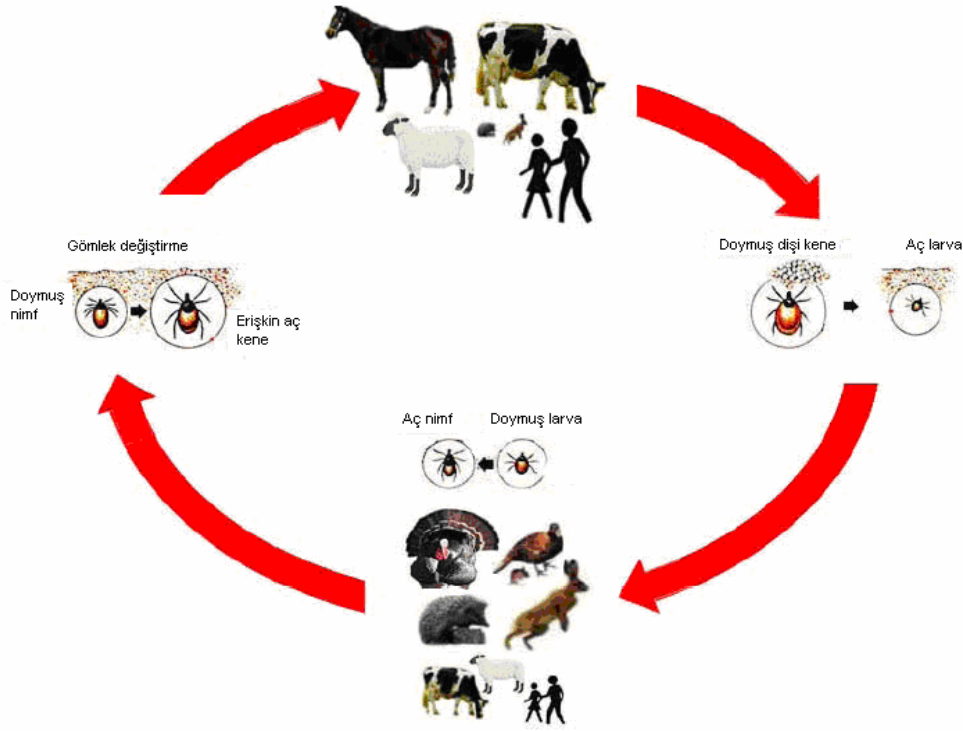
KKKA'nın filogenetik analiz çalışmaları ile değişik coğrafi bölgelerde görülen sekiz genotipi tanımlanmış, Türkiye'den izole edilen suşun Kosova ve Güneybatı Rusya tipi ile benzer filogenetik yapıda olduğu gösterilmiştir (15).

Bir RNA virüsü olan Nairovirüs, dezenfektanlara ve çevre şartlarına nispeten dayanıksızdır. Konakçı dışında yaşayamaz. Bu virüsler 56°C'de 30 dakikada inaktive olurlar, kanda 40°C'de 10 gün yaşayabilir, %1 hipoklorit ve %2 gluteraldehite duyarlıdır ve ultraviyole ışınları ile hızla inaktive olurlar (11, 16). Yapılan bir çalışmaya göre eksojen verilen nitrikoksit (NO) KKKA virüsünün replikasyonunu önleyici (anti-viral) etkisi olduğu ve NO-donor S-nitrozo-N-asetilpenisillamin (SNAP) ile tedavi edilenlerde vRNA'sı kontrol grubuna göre %50 azaldığı görülmüş (17).

2.1.3. KKKA VİRÜSÜNÜN VEKTÖRÜ OLAN KENELERİN YAŞAM DÖNGÜSÜ

KKKA virüsü bir Nairovirus olup 5 Bunyaviridae ailesinden biridir. 32 Nairovirüsün hepsi Ixodidae veya Argasidae keneleri tarafından taşınır. Fakat bunlardan sadece üç türü (Dugbe, koyun virüsü olan Nairobi ve KKKA virüsü) insanlarda hastalık yapar (18). Ixodidae ve Argasidae ailesine bağlı 31 kene türünün virüsün vektörü olabileceği bildirilmesine rağmen, bunların tümünün vektör potansiyeli gösterilememiştir. Kenenin tam anlamı ile vektör kabul edilebilmesi için, etkenin izolasyonu dışında, kenenin virüsü duyarlı hayvanlara aktarabilme ve viremik hayvanlardan alabilme yeteneğinin de olması gerekmektedir. Bu kriterler yukarıda bildirilen 29 türden sadece bazılarında gözlemlenmiştir. Günümüzde hastalığın başlıca vektörlerinin *Hyalomma marginatum marginatum*, *H.m.rufipes* ve *H.anatolicum anatolicum* olduğu kabul edilmektedir. Ancak, *Hyalomma* türlerinin olmadığı bazı ülkelerde etkenin *Ixodes ricinus*, *Dermacentor spp.*, *Rhipicephalus spp.* ve *Boophilus annulatus* gibi kenelerden izole edilmiş olması, diğer kenelerin de vektörlük potansiyelinin düşünülmesi gerektiğini göstermektedir (19).

H.a.anatolicum ve *H.m.marginatum* genellikle iki konakçı gelişimi gösterirler. *H.a.anatolicum*'un, gerek larva ve nimfleri, gerekse erişkinleri genellikle evcil ruminantları (özellikle sığırları) tercih etmesine karşı, *H.m.marginatumun*'un genç gelişme dönemleri (larva ve nimf) çoğunlukla küçük hayvanları (tavşan, kirpi, kanatlılar, fare, yabani memeliler) ve az olarak da büyük memeliler ve insanı tercih etmekte, erişkinleri ise ağırlıklı olarak evcil memeliler (sığır, at, koun, keçi, köpek) ve az olarak da küçük memeliler (tavşan, kirpi) ile insanı tercih etmektedir. Göç eden kuşlar bu kenenin bölgeler arasında yayılışından büyük ölçüde sorumludur (19).



Şekil 2: *Hyalomma m. marginatum*'un yaşam döngüsü (Konak hayvanların büyüklükleri kenenin tercih sırasına göre orantılanmıştır) (19).

2.1.4. KKKA HASTALIĞINA İKLİMİN ETKİSİ

Keneler Şubat ile Aralık ayları arasında hayvanlar üzerinde görülebilse de, erişkinler Mart-Ağustos, larva ve nimfler ise Haziran-Kasım dönemlerinde aktif olarak kan emerler. Kışı, genellikle doymuş nimf veya aç erişkin şeklinde, ahırlardaki duvar çatlaklarında, meralardaki (yarı-ormanlık alanlarda) kemirici yuvalarında, toprak içinde veya ağaç kovuklarında geçirirler (19). İklim değişikliği, kene popülasyonunun çoğalmasını kolaylaştıran ve buna bağlı olarak kene ile bulaşan hastalıkların görülmesini attıran etkenlerden biridir. Kuzey yarıkürede *Hyalomma marginatum marginatum* genellikle bahar aylarından Nisan ve Mayıs'ta sıcaklığın artmasıyla aktive olur ve Mayıs ve Eylül ayları arasında gelişmemiş hali aktif olarak bulunur. Ülkemizde Nisan ayında 5°C'yi geçen gün sayısının ve Nisan ayındaki ortalama sıcaklığın salgının görülmesinden önceki yıllarda giderek arttığı saptandı. Ancak, iklim değişikliğinin son 20 yıldır Avrupa'da kene ile bulaşan hastalıklardaki artışı açıklayamayacağı ileri sürülmüştür. İklim değişikliğinin

ötesinde KKKA salgınları, çeşitli evrelerdeki *Hyalomma* türü kenelerin yaşayabileceği uygun iklimsel koşullar temelinde bir dizi çevresel etmenlerin etkisinde gelişebilmektedir. Bu çevresel değişiklikler, savaş nedeniyle tarım alanlarının boşaltılması, boşaltılan bölgelere askeri personelin ya da yeni grupların yerleştirilmesi, doğal dokunun değişmesi, sel alanlarının tarım alanına dönüştürülmesi ve sel kontrolüdür (20).

Virüsün farklı kene türlerinden izole edilmesi epidemiyolojik açıdan oldukça önemlidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün haritasından da görüldüğü üzere *Hyalomma* cinsi keneler belli enlemin üzerinde iklimin uygun olmaması nedeniyle yaşayamamaktadır. Ancak özellikle *Rhipicephalus* cinsi kenelerle bulaşıyor olması enfeksiyonun sadece *Hyalomma* cinsi kenelerin yaşadığı alanlarla sınırlı kalmayacağını düşündürmektedir (15).

2.1.5. KKKA HASTALIĞININ BULAŞMA YOLLARI

KKKA virüsü, insanlara başlıca vektör olan *Hyalomma* cinsi keneler ile bulaşmaktadır. Virüs, daha önce aralarında *Hyalomma truncatum*, *Hyalomma marginatum rufipes*, *Hyalomma impeltatum*, *Hyalomma impressum*, *Amblyomma variegatum* ve *Boophilus decoloratus* türü de olan 30 civarında keneden izole edilmiştir. Etken virüs aynı şekilde sığır, koyun, keçi, yabani tavşan ve tilki gibi hayvanlardan da izole edilmiştir. İnsanlara virüs, genellikle enfekte keneler (özellikle *Hyalomma* cinsi) tarafından ısırılma yoluyla bulaşır. Enfekte hayvan ve insanlara ait kan, vücut sıvıları ve sekresyonları ile temas sonucunda da bulaşabilir. Solunum yoluyla da hastalığın bulaşabileceği Pakistan, Irak ve Birleşik Arap Emirlikleri'ndeki raporda bildirilmiştir. Vakaların çoğu özellikle tarım alanlarında, kesimevi çalışanlarında, çiftlik hayvanlarıyla uğraşanlarda ve veterinerlerde görülmüştür (14, 18, 19). Enfekte kene etkeni anneden yavrularına transovarian ve larvadan-nimf ve erişkin formlara transstadiyal olarak kene popülasyonuna bulaştırır ve bu keneler vektör olmanın yanında aynı zamanda virüs için rezervuar özelliği de taşır. Enfekte dişi kenenin yumurtalarının %3'ünün enfekte olduğu gösterilmiştir (15). 27 yaşında KKKA hastalığı olan hamile bir anne ribavirinle tedavi edilmiş ve annede hemarajiyile ilgili herhangi bir kanıt görülmemiş. Doğumdan sonraki 5. günde çocukta ateşin yükseldiği görülmüştür. PCR yöntemiyle elde edilen çocuktaki

virüsün gen dizisi ile anneden elde edilen gen dizisi birbirine benzer olduğu görülmüş ve dolayısıyla virüsün anneden çocuğa geçmiş olduğu gösterilmiştir (23).

2.1.6. KKKA HASTALIĞININ KLİNİK BELİRTİLERİ

Hastalık insanlara genellikle kene ısırmasıyla ya da enfekte hayvan veya insanların kan veya vücut sıvılarıyla temas sonucunda bulaşmaktadır. KKKA'nın inkübasyon süresi hastalığın bulaşma şekline göre değişmektedir. İnkübasyon süresi kene ısırmasından sonra 2-7 gün, bazı kaynaklara göre 1-3 gün olmakta hatta dokuz güne kadar çıkabilmektedir. Enfekte kan, vücut sıvısı veya diğer dokulara doğrudan temas sonucu bulaşmalarda 5-6 gün, en fazla ise 13 gün olabilmektedir. Hastalık aniden başlar, başlangıcı ani ve ateş, titreme, kas ağrısı, baş ağrısı, kusma ve karın ağrısı görülür. Hemorajik durum 3-5.ci günde olur, ciltte peteşi ve pulpura görülür, mukozal membranlarda kanama, burun kanaması, hemoptozi, hematemez, melana ve kanlı idrar görülür. Bu safhada göz infete, yüz kızarıklık, dil kuru, kan basıncı düşük ve kalp sesleri zayıftır. Karaciğer büyük ve hassastır. Dalak ve epigastriumun üzeri daha az duyarlıdır. İyileşen hastalarda ateş 10-20 gün içinde düşer ve kanama durur. Ancak iyileşme dönemi 4 hafta veya daha uzun sürebilir. Ölen hastalarda hastalığın başlangıcından 7-9 gün sonra ağır kanamalardan dolayı kardiak arrest gelişir (24, 25).

KKKA hastalarında ölüm oranları değişik kaynaklarda farklı olarak bildirilmiştir. Bazı kaynaklara göre bu oran %8-80 arasında değişmektedir (16, 26). Ancak Türkiye'de ölüm oranı %5-6 olarak saptanmıştır (11).

2.1.7. KKKA HASTALIĞINDA LABORATUVAR BULGULARI

Hastalığın özgül tanısında kullanılan yöntemler: virüs izolasyonu, serolojik tanı yöntemleri ve moleküler tanı yöntemleridir. Virüs izolasyonu ve kültür için mutlak suretle biyogüvenilirlik seviyesi 4 olan laboratuvarlar gereklidir. Kanda oluşan immünoglobulin M (IgM) ve immünoglobulin G (IgG) yapısındaki antikorların her ikisini de göstermeye yönelik indirekt flüoresans antikor (IFA) ve enzyeme-linked immunoassay (ELISA) testleri tanı amacıyla günümüzde kullanılmaktadır. Bu antikorların ikisi de hastalığın 7. gününden itibaren hasta serumlarında saptanabilir. Özgül Ig M yapısındaki antikorlar hastalıktan sonraki 4 ay kadar, Ig G yapısındaki antikorlar ise en az 5 yıl süreyle hasta serumunda saptanabilmektedir. Serolojik

testler ile akut fazda Ig G yapısındaki antikor titresinin en az 4 kat artması ve Ig M yapısındaki antikorların tek ölçümde gösterilmesi ile tanı konulmaktadır. Ölüm ile sonuçlanan olgularda serolojik testler yüksek oranda negatif olabilir. Böyle olgularda tanı için kan ve karaciğer dokusunda virüsün gösterilmesi gereklidir. Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) tekniği ile hastalığın 16. gününe kadar viral RNA serum örneklerinde saptanabilmektedir. Bazı Araştırmacılara göre RT-PCR tekniği ile hem daha hızlı tanı konmakta, hem de örneklerdeki virüs yükü gösterilebilmektedir (27).

KKKA virüsü ile enfekte olmuş kişilerde trombosit ve lökosit sayısında azalma, alanin transferaz, aspartat transferaz, laktik dehidrojenaz ve kreatinin fosfokinaz seviyesinde yükselme görülür. Koagülasyon testlerinde protrombin ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı uzamıştır. Fibrinojen seviyesi azalabilir ve fibrin yıkım ürünleri artabilir. İyileşen hastalarda biyokimyasal test değerleri 5-9 gün içinde normal değere döner (28, 29). KKKA teşhisi konmuş 35 hastada yapılan çalışmada; hastalığın başlangıcından 5 gün sonra 17 hastada trombositopeni, 30 hastada AST seviyesi ≥ 200 U/L, 26 hastada ALT seviyesi ≥ 150 U/L, 11 hastada aPTT > 60 s olduğu görülmüştür. Ölen hastalar hariç hiç birinde lökositoz görülmemiştir (30).

2.1.8. KKKA HASTALIĞININ COĞRAFİK DAĞILIMI

KKKAi Afrika, Asya, Güney-Doğu Avrupa, Orta Doğu olmak üzere 30'dan fazla ülkede olduğu bildirilmiştir. KKKA'nın son yıllarda Kosova, Arnavutluk, İran, Pakistan ve Güney Afrika'da sporadik ve epidemik vakalar bildirilmiştir. Ülkemizde özellikle İç Anadolu Bölgesi'nde 2002-03 yıllarında Kızılırmak havzasından, Tokat, Sivas ve Yozgat illerinde Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında etkeni belli olmayan, insanlarda gribal enfeksiyona benzer semptomlar gösteren hastalık görülmüş yapılan çalışmalar sonucunda KKKA olduğu anlaşılmıştır. 2004 yılında ise tüm Türkiye genelinde 249 kesin tanılanmış vaka bildirimleri yapılmıştır. Ülkemizde hastalığın yalnız İç Anadolu Bölgesi ile sınırlı olmadığı Doğu Karadeniz Bölgesi'nde de olduğu anlaşılmaktadır. 2006 yılı içerisinde de Yozgat, Çorum ve İstanbul illerinden vaka bildirimleri olmuştur. Sağlık Bakanlığı kayıtlarının verilerine göre 2002-2006 yılları arasında vaka sayısının 1000 in üzerinde olduğu açıklanmıştır (11, 14, 16, 31).



Şekil 3: Kırım Kongo Hemorajik hastalığının görüldüğü coğrafya (14)

2.2. SERBEST RADİKALLER

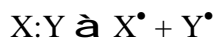
Biyolojik materyallerdeki serbest radikallerin varlığı yaklaşık 50 yıl önce keşfedilmiştir. Keşfinden hemen sonra Denham Harman oksijen radikallerinin *in vivo* olarak enzimatik reaksiyonlarının ürünü olabileceğini ileri sürdü. 1956 yılında McCord ve Fridovich'in süperoksit dismutaz enzimini keşfetmeleriyle biyolojide serbest radikallerin önemi anlaşılmaya başlanmıştır (32, 33).

Serbest radikaller, son yörüngelerinde bir veya birden fazla paylaşılmamış elektron içeren moleküllerdir. Son yörüngelerinde paylaşılmamış elektron bulunması reaktivitelerini olağanüstü artırdığı için, serbest radikaller kimyasal aktivitesi yüksek olan moleküllerdir.

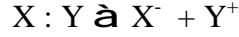
2.2.1. SERBEST RADİKALLERİN OLUŞUM MEKANİZMALARI:

Serbest radikaller başlıca üç şekilde oluşmaktadır;

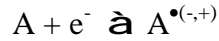
a. Bir molekülün yapısındaki kovalent bağın homolitik yıkımı sonucu oluşanlar. Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.



b. Bir molekülün yapısındaki kovalent bağı heterolitik olarak bölünmesi ile oluşanlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



c. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi veya tek bir elektronun kaybı ile oluşanlar.



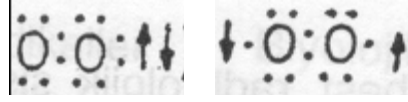
Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, fazla üretilmeleri halinde doku hasarı ve hücre ölümüne sebep olurlar (34).

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri insanlarda ya esansiyel metabolizma ürünü ya da dış kaynaklı (ışınlar, ozon, sigara dumanı, belirli ilaçlar, pestisitler, hava kirliliği ve endüstriyel atıklar) olarak meydana gelir. Serbest radikallerle antioksidan savunma sistemi arasındaki denge hastalık sürecinde önemlidir. Serbest radikal üretimi (oksidatif stres şartlarının olduğu durumda) antioksidan savunma kapasitesinden fazla olduğunda sürekli doku hasarı ve kronik hastalıklara sebep olabilir (35).

2.2.2. MOLEKÜLER OKSİJENİN ÖZELLİKLERİ

Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir. Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Mo^{+5} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Serbest radikal tanımına göre O_2 , bir radikal olarak değerlendirilir. Radikal oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Radikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer

değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür, delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır.



Şekil 4: Delta O₂ Sigma O₂

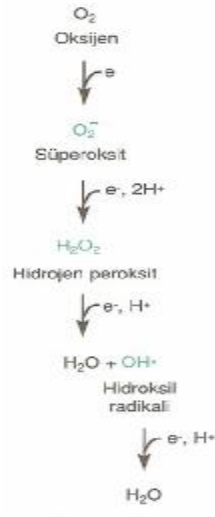
Organizmada geçiş metallerini (Fe⁺² ve Cu⁺² gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. O₂ radikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede Reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir (36).

2.2.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Oksijen insan yaşamı için hem esansiyel hem de oldukça toksik bir moleküldür. Adenozin trifosfat (ATP) üretilmesi, detoksifikasyon ve biyosentez yollarındaki oksidasyon tepkimeleri için O₂'e bağımlıyız. Öte yandan, O₂ tek elektron aldığı zaman hücrenin lipitleri, proteinleri ve DNA'sını tahrip eden ileri derecede reaktif oksijen radikallerine dönüşmektedir. Reaktif oksijen radikallerinin yaptığı hasar çok geniş bir hastalık grubunda hücre ölümüne ve yozlaşmasına katkıda bulunur. Radikaller, genellikle dış yörüngelerinden bir tanesinde bir tek-elektron içeren bileşiklerdir. Oksijen, ayrı yörüngelerde iki tane eşleşmemiş elektron taşıyan bir molekül olan çift radikaldir. Hücrede olağan şekilde görülen bir grup enzimatik olan ve olmayan olay sırasında O₂'den reaktif oksijen türleri (ROT) yapmak üzere tek elektron kabul ederek meydana gelmektedir. ROT; süperoksit (O₂⁻), radikal olmayan hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil (OH[·]) radikalleridir. Süperoksit, KoQ'dan enzimatik olmayan bir yoldan veya metal içeren enzimlerden (örneğin, sitokrom P₄₅₀, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz) üretilebilir. İleri derecede toksik hidroksil radikali, Fenton tepkimesi ile, Fe⁺² veya Cu⁺²,ın varlığında süperoksitten enzimatik olmayan yoldan veya Haber-Weiss tepkimesinde hidrojen peroksitten üretilir. O₂'in indirgenmesiyle oluşan oksijen radikalleri ve bunların türevleri hücreler için öldürücü olabilir. Hidroksil radikali proteinler ve DNA'da oksidatif hasara neden olur. Çok doymamış yağ asitleri içeren zar lipitlerinden lipit peroksitlerin oluşmasına

neden olur. Bazı hallerde, serbest radikal hasar hastalık tablosunun doğrudan nedenidir; örneğin, iyonlaştırıcı ışınlarla maruz kalmanın başlattığı doku harabiyeti. Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda veya iskemi-reperfüzyon örsentisinde ROT bir başka olayın yaptığı hücre harabiyetini şiddetlendirebilir. Oksijen radikalleri yıkıcı harabiyet yapmaları yönünden serbest radikal nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri olan hipoklorik asit (HOCl) ile bağlantılıdır (36).

O₂'e ait dört tek-elektron indirgenme basamağı süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve su yapmak üzere giderek ilerler. Süperoksit, kendisine ait tek, eşleşmemiş elektronu daha iyi göstermek için bazen O₂⁻ şeklinde yazılır. O₂'in yarı indirgenmiş biçimi olan H₂O₂ iki elektron kabul eder ve dolayısı ile bir oksijen radikali değildir. Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R[•]), peroksit radikalleri (ROO[•]), alkoksi radikalleri (RO[•]), tiyol radikalleri (RS[•]), sülfenil radikalleri (RSO[•]), tiyol peroksit radikalleri (RSO₂[•]) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (36).



Şekil 5: Oksijenin dört tek-elektron basamağı tarafından indirgenmesi.

2.2.3.1. SÜPEROKSİT (O₂⁻)

Canlılarda oluştuğu gösterilen ilk radikal süperoksittir.

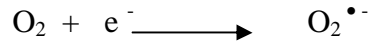
Başlıca şu mekanizmalarla üretilmektedir:

a. İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotitler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.

b. Bazı dehidrojenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali oluşabilir.

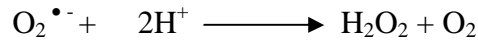
c. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır.

d. Aktif fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek bunları fagozom içine ve buldukları ortama verirler (37).

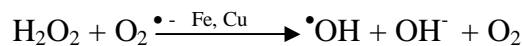


2.2.3.2 HİDROJEN PEROKSİT (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik/nonenzimatik dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur.

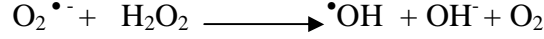
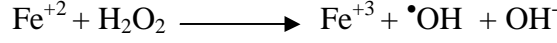
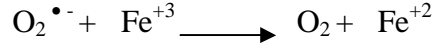


Hidrojen peroksitin pK's =10.6 olduğundan, nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz, biyolojik zarları kolayca geçebilir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, Cu veya Fe gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. Hidrojen peroksit süperoksitle reaksiyona girerek, en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. Ferri demiri (Fe⁺³) süperoksit tarafından ferro demire (Fe⁺²) indirgenir. Sonra bu ferro demir

kullanılarak “fenton reaksiyonu” ile hidrojen peroksitten $\bullet\text{OH}$ ve OH^- üretilir. Reaksiyon mekanizması;



Görüldüğü gibi süperoksit, hem hidrojen peroksit kaynağı hem de geçiş metal iyonlarının indirgeyicisidir (34, 37).

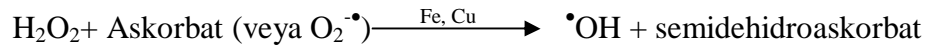
2.2.3.3. HİDROKSİL RADİKALİ ($\bullet\text{OH}$)

Biyolojik ve kimyasal sistemlerde üretilen hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir:

a. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda hidroksil radikalleri oluşur.



b. Hidrojen peroksitin eksik indirgenmesi ile $\bullet\text{OH}$ oluşur. Vücuttaki $\bullet\text{OH}$ radikalinin en önemli kaynağıdır. H_2O_2 'in iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektronla indirgenmesi $\bullet\text{OH}$ oluşmasına neden olur. Bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda, oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden, H_2O_2 'ten $\bullet\text{OH}$ yapımı sürekli bir duruma gelir:



Haber-Weiss tepkimesi ya da Fenton tepkimesi olarak adlandırılan bu tepkime ile ne kadar $\bullet\text{OH}$ oluşacağı, vücutta üretilen H_2O_2 derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. Süperoksit hem H_2O_2 'in öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan ve proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına da neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda süperoksit yapımının arttığı ortamda $\bullet\text{OH}$ üretimi kaçınılmazdır. Fenton tepkimesini katalizleyen en aktif metal iyonları demir ve bakırdır. Mangan ve kobalt da bu bakımdan aktif olsa da, vücuttaki derişimlerinin düşük olması nedeniyle demir ile kıyaslandıklarında çok daha az etkindirler (34, 37).

2.2.3.4. SİNGLET OKSİJEN ($O_2^{\cdot -}$)

Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunda spin kısıtlamasının kaldırılmış olması nedeniyle reaktivitesi oldukça yüksektir. Aldığı enerjiyi çevreye dalga enerjisi şeklinde verip oksijene geri dönebildiğinden, oluşumu kemolüminesans ölçümü ile izlenebilir. Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir:

- a) Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotitler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorplamasıyla
- b) Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde
- c) Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında (örneğin fagozom içinde)
- d) Prostoglandin endoperoksit sentaz, bazı sitokrom P_{450} tepkimelerinde, miyelo/ kloro/laktoperoksidaz enzimlerinin etkileri sırasında oluşur (37).

2.2.3.5. NİTRİK OKSİT (NO)

Nitrik oksit, yüksek yapılı canlılarda çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir. Paylaşılmamış elektron aslında nitrojen atomuna ait ise de, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde delokalize olması nedeniyle tam radikal özelliği taşımaz. Bu nedenle, bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi baskılandığından oldukça uzun ömürlüdür (37).

2.2.4. SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI

2.2.4.1. BİYOLOJİK KAYNAKLAR:

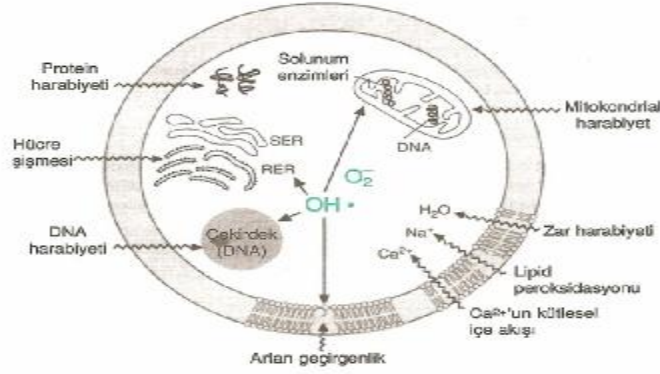
- Aktif fagositler
- Antineoplastik ajanlar (kanser ilaçları)
- Radyasyon
- Alışkanlık yapan maddeler (alkol ve uyuşturucu)
- Çevresel ajanlar (Sıcak şoku, güneş ışını, hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler: pestisit, sigara ve solventler vb.)
- Stres

2.2.4.2. HÜCRE İÇİ KAYNAKLAR:

- Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidropterinler, antibiyotikler.
- Enzimler ve proteinler: Ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, hemoglobin
- Mitokondride elektron transportu
- Endoplazmik retikulum ve çekirdek zarı elektron transport sistemleri (sitokrom P₄₅₀, sitokrom b₅)
- Peroksizomlar: Oksidazlar ve flavoproteinler
- Plazma membranı: Lipoksijenaz, prostaglandin sentataz, NADPH oksidaz ve lipit peroksidasyonu
- Oksidatif stres yapıcı durumlar: İskemi, travma, intoksikasyon, radyoaktivite, hemoraji
- Uzun süreli metabolik hastalıklar (34, 38, 39).

2.2.5. SERBEST RADİKALLERİN ETKİSİ

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli patolojilere yol açar. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, en fazla etkileneni lipitlerdir. Serbest radikallerin hücre hasarı şekil 6' gösterilmiştir. Süperoksit ve hidroksil radikali hücresel, mitokondriye, nükleer ve endoplazmik retikulum zarlarında lipit peroksidasyonunu başlatır. Hücre geçirgenliğindeki artış Ca⁺²'un hücre içine girmesine, bu da daha fazla mitokondri harabiyetine neden olur. Proteinler üzerindeki sistem sülfidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları oksidlenir ve yıkılır. Çekirdek ve mitokondri DNA'sı oksitlenebilir ve bu da ipliklerin kırılmasına ve diğer tip harabiyetlere neden olur. RNOS (NO, NO₂ ve peroksinitrit) benzer etkilere sahiptir (36).

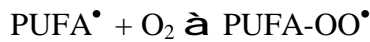


Şekil 6: Serbest radikal aracılı hücre hasarı.

2.2.5.1. LİPİT PEROKSİDASYONU

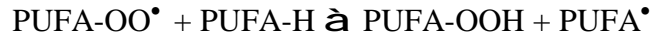
Membran lipitlerinin ana kaynağı olan çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ve kolesterol peroksidasyona yatkındır. PUFA ve kolesterol enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla oksitlenir. Lipit peroksidasyonu normal koşullar altında doğal bir metabolik süreçtir. Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur ve üç aşamadan oluşur; Başlangıç, ilerleme ve sonlanma.

a. Başlangıç safhası; Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan PUFA zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması, $\bullet\text{OH}$ radikalleri ve ya singlet oksijenin doymamış yağ asitlerinin metil gruplarıyla reaksiyona girerek lipit peroksi radikalleri ve hidroperoksitlerin oluşmasıyla başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipit radikali niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipit radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipit peroksi radikali meydana gelir.



b. İlerleme safhası; Lipit peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer PUFA'lerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşmasına yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşürler. Bu oluşan

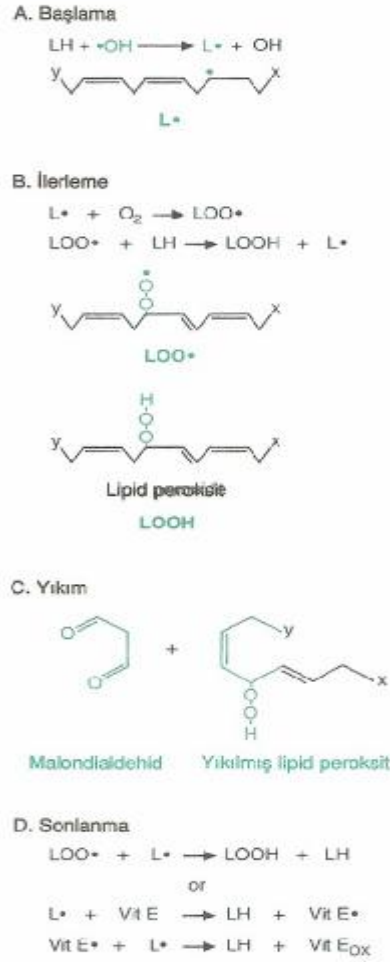
peroksi radikalleri oldukça reaktiftir ve zincirleme reaksiyon oluştururlar. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder.



c. Sonlandırma safhası; Lipit peroksidasyonu ya toplayıcı reaksiyonlarla sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonlarıyla devam eder.

PUFA oksidatif yıkımı, lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendine devam eden zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (37, 40, 41).

Bir biyomarkırın tam olarak tanımlanabilmesi için şüphesiz çeşitli kriterlerin olması gerekirken, bir biyomarkırda beklenen fenomen hastalığın patojenezi ve durumu ile ilgili bazı biyolojik olayların doğrudan ölçülebilirliğini sağlamalıdır. Örneğin; lipit peroksidasyonu biyolojik bir olaydır ve ateroenez lipit peroksidasyonun oluşturduğu patolojidir. MDA lipit peroksidasyonunun son ürünüdür. MDA konsantrasyonundaki değişiklik, lipit oksidasyonuna bağlı olarak ateroenez oluşumu hakkında bilgi verir (42).



Şekil 7: Lipit peroksidasyonu: Serbest radikal zincir tepkimesi: **A.** Lipit peroksidasyonu çoklu doymamış bir lipitten (LH) bir hidrojen atomu söken ve böylece bir lipit radikali (L) yapan bir hidroksil veya diğer radikalle başlatılır. **B.** Serbest radikal zincir tepkimesi O_2 ile tepkimeye girip lipit peroksi radikali (LOO) ve lipit peroksit (LOOH) üreterek ilerler. **C.** Tek elektronun yeniden düzenlenmesi lipit yıkımı ile sonuçlanır. Oluşan ürünlerden biri olan malondialdehit suda çözünür ve kanda belirir. **D.** Zincir tepkimesi tek elektronlar bağışlayan E vitamini ve diğer lipitte çözünür antioksidanlar tarafından bitirilir. Daha sonraki iki indirgenme basamağı ile kararlı, oksitlenmiş bir antioksidan oluşur (36).

2.2.5.2. PROTEİNLERE ETKİSİ

Proteinler serbest radikal etkisine karşı, PUFA'dan daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, fenil alanin, histidin,

metionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu immünglobülin G ve albumin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur (34).

2.2.5.3. NÜKLEİK ASİTLERE VE DNA'YA ETKİSİ:

İyonlaştırıcı radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek mutasyona ve hücre ölümüne yol açarlar. Sitotoksiste, büyük oranda nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar (34).

2.2.5.4. KARBOHİDRATLARA ETKİSİ:

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik süreçlerde önemli rol oynar (34).

2.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

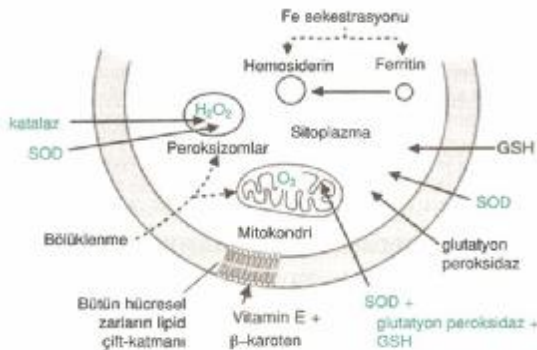
Sağlıklı bir bireyde oksidanların düzeyi antioksidanlar tarafından belirli bir dengede tutulmaktadır. Plazma ve doku antioksidanları savunma özelliklerine göre primer, sekonder ve tersiyer olarak gruplandırılabilir. Primer olanlar radikallerin oluşumunu önleyen grup olarak tanımlanabilir. Hücre dışı sıvı içinde yer alan transferrin ve laktoferrin bu özelliklere sahiptirler. Sekonder olarak tanımlanan gruptakiler ise oluşmuş olan ROT'ni inaktifleştirerek veya ortamdaki uzaklaştırarak etkilerini gösterirler. Bunlar SOD, katalaz, ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler ya da E-vit, C-vit ve GSH gibi küçük moleküller olabilir. Tersiyer grupta yer alanlar ise ROT ile hasarlanmış molekülleri tamir ederek veya bunları uzaklaştırarak etki gösterir. Bu da özellikle DNA'nın sentezinde büyük öneme sahiptir (43).

Hücrel Antioksidan Kapasitenin Kontrolü: Oksidatif hasar, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar. Antioksidanların yapımında bozukluk ya da ROT'inin aşırı derecede üretilmesi bu dengeyi bozabilir. Bazı antioksidanların sitokinler tarafından düzenlendiği muhtemeldir. İnterlökin-1

(IL-1) ve TNF α Mn-SOD aktivitesini indüklemektedir, diğer antioksidanların üzerine etkisi yoktur. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, aşırı derecede oksidatif strese maruz kalan farelerde IL-1 ve TNF α aktivitesine bağlı olarak Mn-SOD, CuZn-SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitesinde bir artış olduğu görülmüştür (43).

Aerobik canlılarda, ROT oluşumuyla birlikte, ROT'nin zararlı etkilerini önlemek amacıyla antioksidan savunma sistemleri ya da kısaca antioksidan olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları da gelişmiştir. Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz gibi enzimler ve vitaminler, tiyoller gibi enzim olmayanlar şeklinde yapılarına göre sınıflandırılabilen antioksidanlar, serbest radikallerin lipitler, proteinler, nükleik asitler gibi hedef biyomoleküllere vereceği hasarı önleyen maddelerdir (44).

Hücrenin farklı alt birimlerinde ROT'a karşı farklı savunmalar vardır. Serbest radikal savunma enzimlerinin bulunduğu yerler şekil 8'de gösterilmiştir. Her subsellüler bölgede üretilen ROT'un tipi ve miktarı ile uyum içindedir. Bu enzimlerin en yüksek aktivitesi karaciğer, böbreküstü bezleri ve böbrekte bulunmakta olup buralarda mitokondri ve peroksizom içeriği yüksektir ve düz ER'de bol miktarda sitokrom P₄₅₀ enzimleri bulunur. Süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri farklı kompartmanlarda izoenzimler halinde bulunur. Kompartmanlaşmış bir diğer şekli Fe'in sekestrasyonu olup bu element, ferritin içinde mobilize edilebilir ve Fe halinde depolanır. Fe fazlası, mobilize olmayan hemosiderin depolarına yerleştirilir. Glutatyon (GSH) enzimatik olmayan bir antioksidandır (36).

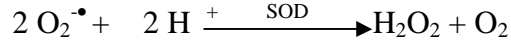


Şekil 8: Serbest radikal savunmanın şematik olarak gösterilmesi.

2.3.1. ANTİOKSİDAN ENZİMLER

2.3.1.1. SUPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)

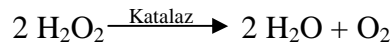
Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1.) enziminin üç izoformu olan bir metalo enzimdir. SOD₁ ya da CuZn-SOD tanımlanan ilk enzimdir, sitoplazmada bulunur ve Cu ve Zn içeren molekül ağırlığı 32000 Da olan homodimerdir. Tüm memeli hücrelerinin sitoplazmasında yaygın olarak bulunur. SOD₂ ya da Mn-SOD Mn içeren tetramerdir, mitokondride bulunur. SOD₃ ya da EC-SOD en son tanımlanan SOD'dır. Cu ve Zn içeren tetramerdir ve hücre dışı alanda bulunur (45). SOD enziminin esas görevi oksijen toksitesine karşı hücrelerin korunmasında önemli rol oynar. SOD, oksijene maruz kalan hücrelerde süperoksiti oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalizleyen önemli bir antioksidandır (46-49).



2.3.1.2. KATALAZ (CAT)

Katalaz (EC 1.11.1.6), kanda, kemik iliğinde müköz membranda dört hem grubu içeren bir hemoproteindir. Birbirine benzer 60 kDa olan dört altbirimden meydana gelmiş bir tetramerdir. Her altbirim bir hem grubu ve bir de NADPH içerir (50). Katalaz canlı organizmalarda en yaygın bulunan enzimdir ve hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşmesini katalizler. Katalaz en yüksek turnover oranına sahip enzimlerden biridir. Katalazın optimum sıcaklığı türlere göre değişmesine rağmen, farelerde yapılan bir çalışmaya göre optimum sıcaklığı 40 °C'de optimum pH 8.0 olarak hesaplanmıştır. Eritrositler ve karaciğer, katalazın en yüksek aktiviteye sahip olduğu yapılardır. Katalaz hücreyi solunum patlamalarına karşı da koruyucu olarak hizmet eder (51-53).

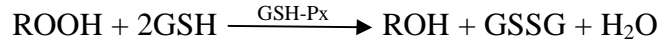
başlıca memeli hücrelerinin peroksizomlarında bulunan



2.3.1.3. GLUTATYON PEROKSİDAZ (GSH-Px)

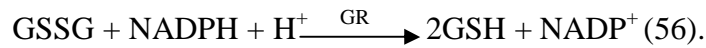
Glutatyon peroksidazın (EC 1.11.1.19) 1957 yılında eritrositleri oksidatif hasara karşı koruyan bir enzim olduğu keşfedildi. Daha sonraları, memeli GSH-Px'ın diğer formları izole edildi. Memeli GSH-Px ailesi amino asit dizisi, substrat

özgüllüğü ve hücre içi lokalizasyonuna göre 6 sınıfa ayrılır; klasik ya da sitosolik GSH-Px₁, gastrointestinal GSH-Px₂, plazma GSH-Px₃, fosfolipit hidroperoksit GSH-Px ya da GSH-Px₄, epidemial GSH-Px₅ ve koku epiteli GSH-Px₆. GSH-Px₅ ve GSH-Px₆ hariç tüm memeli GSH-Px proteinleri sistein yerine seleno sistein (SeCys) içerir. GSH-Px'ın iki farklı tipi vardır; aktivitesi için selenyuma gereksinim duyan formu hem H₂O₂ hem de LOOH'ları, selenyuma gerek duymayan formu ise sadece LOOH'ları metabolize eder (54). Se- GSH-Px hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin her ikisine karşı yüksek aktiviteye sahip, 84 kDa olan bir tetramerdir. Se- GSH-Px'ın %70'i sitoplazma, %30'u ise mitokondridedir. Glutasyon peroksidaz glutasyonu kullanarak çeşitli hidrojen peroksitlerin (ROOH ve H₂O₂) indirgenmesini katalizler. Memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı korur (55).



2.3.1.4. GLUTATYON REDÜKTAZ (GR)

Glutasyon redüktaz (EC 1.6.4.2) ilk kez 1931 yılında Hopkins ve Elliott tarafından çeşitli hayvanların karaciğerinde elde edilmiştir. GR yaklaşık 120 kDa ağırlığında, iki altbirim ve her birinin aktif merkezinde bir flavin adenin dinükleotit (FAD) vardır. GR enzimi hem sitoplazma hem de mitokondride bulunur. 1,3-bis-kloroetil-1-nitroz üre GR'in inhibitörüdür. Glutasyon redüktaz indirgeyici elektron kaynağı olarak NADPH'ı kullanarak okside glutasyonu indirgeyen reaksiyonu katalizler. Enzimin katalizlediği reaksiyon;



2.3.2. DİĞER ANTIOKSİDANLAR

Hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan daha az bir oranda enzimler, daha çok olarak E ve C vitamini, transferrin, haptoglobin, seruloplazmin, albümin, bilirubin, β- karoten, ürik asit, glikoz, sistein, trakeobronşial mukus ve α-1 antitripsin sorumludur.

2.3.2.1 E-VİTAMİNİ

E vitamini 4 tokoferol (α, β, γ, δ) ve 4 tokotrienolden (α, β, γ, δ) oluşan, yağda çözünen ve zincir kırıcı (lipit peroksit radikallerini yıkarak lipit peroksidasyon zincir

reaksiyonlarını bozar) bir antioksidandır. E vitamin'nin doğada en yaygın ve en aktif formu olan α -tokoferol çok kuvvetli bir antioksidandır ve hücre zarı fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkilerinden korur (57). Hücre ve hücre içi zarlarında bulunan doymamış yağ asitlerinde lipit oksidasyonu oluşmadan önce serbest radikaller α -tokoferol tarafından nötralize edilir (58). α -tokoferolün aktif merkezinde altı hidroksil grubu vardır. İkinci pozisyondaki yan zincir E-vitamininin biyolojik membranın içine girmesini ve tutunmasını sağlar. Böylece altıncı pozisyon lipit peroksidasyonunu ortadan kaldırır ve serbest radikalleri temizlemek için uygun ortam sağlar (59).

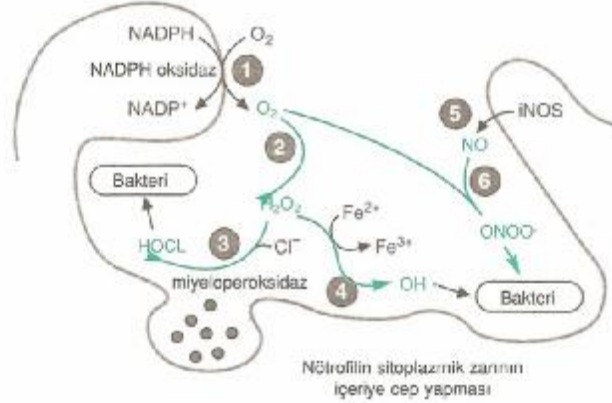
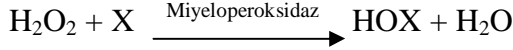
2.4. MİYELOPEROKSİDAZ (MPO)

Miyeloperoksidaz enzimi (EC: 1, 11, 1, 7) ilk kez 1940 yılında Agner tarafından saflaştırılmıştır. İlk başlarda, canlı yeşil renginden dolayı bu enzime verdoperoksidaz adı verilmiştir. Daha sonraki yıllarda miyeloperoksidaz adı kullanılmıştır (60). Miyeloperoksidaz enzimi laktoperoksidaz, eozinofil peroksidaz ve tiroid peroksidazı da içeren memeli peroksidaz ailesinin bir üyesidir. Miyeloperoksidaz enziminin üç izoenzimi vardır; MPO I, II ve III'dür (61-63). Miyeloperoksidaz azurofilik granüler lökositlerin önemli proteinlerindedir. Miyeloperoksidaz enzimi, sindirim enzimleri ve diğer antimikrobiyal proteinlerle azurofilik granüllerin stoplazmasında bulunur (60). Bazı araştırmacılara göre MPO enzimi hücrenin kuru ağırlığının %1-2'sini oluştururken, başka araştırmacılara göre de %5 olduğu bildirilmektedir (64, 65).

Lökositler antimikrobiyal fonksiyonlarını, mikroorganizmanın hücre içine alınıp sindirildiği fagositoz olayı ile gerçekleştirirler. Fagozom membranında lokalize olan NADPH oksidaz aracılığıyla solunum patlaması (respiratory burst) adı verilen, oksijen tüketiminin hızla arttığı ve süperoksit radikalinin olduğu bir süreç gerçekleşir. Fagositoz esnasında aşırı oksijen kullanılması sonucunda; süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit oluşur. Süperoksit serbest bir radikaldir ve oksijen molekülünden bir elektronun kaybı sonucu ortaya çıkar (66).

Miyeloperoksidaz enzimi H_2O_2 ve halojenleri (Cl^- , F^- , Br^- ve I^-) katalizleyerek hipohalozları oluşturur. Örneğin; miyeloperoksidaz enzimi H_2O_2 ile Cl^- iyonu

katalizleyerek bakterisitik bir madde olan hipoklorür ve Br^- ile hipobromür vb. oluşturur. Bu maddeler bakteriler, mantarlar ve memeli hücrelerine karşı oldukça toksiktir (67).



Şekil 9: Aktif nötrofillerin fagozom sırasında ROT'nin oluşması: 1-Plazma zarının dış yüzündeki NADPH oksidazın aktifleşmesi solunum patlamasını başlatmakta ve süperoksit oluşmaktadır. Fagositoz sırasında, plazma zarı iç cep yapmakta ve böylece süperoksit vakuol boşluğuna salınmaktadır. 2-Süperoksit kendiliğinden veya süperoksit dismütaz yoluyla enzimatik olarak H_2O_2 ' e dönüştür. 3-Miyeloperoksidaz içeren tanecikler fagozomlar içine salgılanır ve burada miyeloperoksidaz HOCl ve diğer halidleri üretir. 4- H_2O_2 , Fenton tepkimesinden hidroksil radikal şeklini de üretebilir, 5-İndüklenebilir nitrik oksit sentaz aktifleşerek NO üretir. 6-Nitrik oksit, peroksinitrit üretmek üzere süperoksitle birleşir ve bu da ilave RNOS yaratabilir. Sonuçta, fagositoza uğratılan hücrelerin zarları ve diğer bileşenlerine saldırılması ve en sonunda hücre ölür. Sadece 30-60 dakika sürmesi ve O_2 tüketmesi nedeniyle bu olayın tümüne solunum patlaması adı verilir (36).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

- ELISA okuyucusu (Rayto marka 2100 C model)
- Santrifüj (MSE MISTRAL 100)
- Laminar Kabin (STERIL-VBH marka)
- Derin dondurucu Low -85 °C (SANYO-Ultra marka)
- Sonikatör (FISHER sonic DISMEMBRATOR * MODEL 300 marka)
- Sıcak su banyosu (Mommert marka)
- Vorteks (Nuvemix marka)
- Spektrofotometre (UV-VIS Double BEAM PC scanning LABOMED.INC. marka)

3.2. YÖNTEM

3.2.1. HASTA VE KONTROL GRUBU

Bu çalışmada kullanılan örnekler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nda, takip ve kontrolleri yapılan KKKA ön tanısıyla yatan ve daha sonra Hıfzı Sıhha Enstitüsü'nde kesin tanısı konulmuş olan hastalar seçildi. KKKA tanısı konmuş olan hastalardan örnekler rast gele seçildi; yaş, cinsiyet açısından herhangi bir ayırım yapılmadı. Kontrol grubunu oluşturan bireyler seçilirken her hangi bir sistemik hastalığı olmayan bireylerin seçilmesine ve hasta grubundaki bireylerin yaş, cinsiyet özelliklerine benzer dağılım gösterilmesine özen gösterilmiştir.

3.2.2. NUMUNELERİN HAZIRLANMASI

KKKA tanısı konmuş hastalardan alınan kan örneklerinden glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, superoksit dismutaz, katalaz, miyeloperoksidaz enzim aktivitesi ve malondialdehit, E vitamini düzeyini ölçmek için heparinli, EDTA içeren tüplere alınan örneklerden plazma, eritrosit ve lökosit elde edildi.

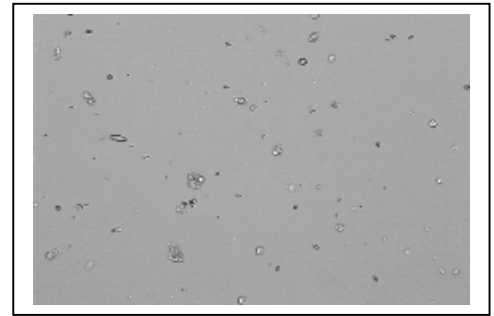
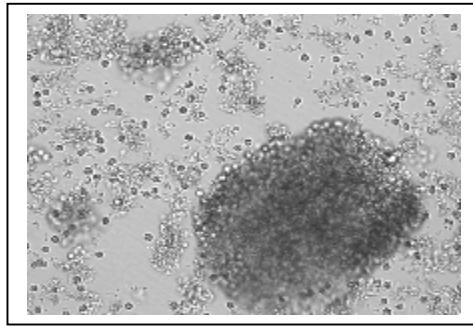
a. EDTA içeren plazma ve eritrosit suspansiyonu

EDTA içeren tüplere alınan kan örnekleri +4°C’de 1000 rpm’de 10dk santrifüj edildi. Üstteki plazma kısmı lökosit tabakasına zarar vermeden aspirasyonla alındı. Eritrosit süspansiyonunun üzerine 2 ml serum fizyolojik ilave edildi ve yavaşça alt üst edilerek karıştırılıp 1000 rpm’de 10dk santrifüj edildi. Bu işlem 4 kez tekrarlandıktan sonra, elde edilen eritrosit suspansiyonu -80°C’de saklandı.

b. Heparinli Plazma ve lökositin elde edilmesi

Heparin içeren tüplere alınan kan örnekleri 4000 rpm’de 5dk santrifüj edildi. Üstteki plazma kısmı lökosit tabakasına zarar vermeden aspire edilerek ayrıldı. Geriye kalan şekilli elemanlar kısmına % 0,72 (w/v) olacak şekilde dekstran ilave edildi. 1000 rpm’de 6dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında sırasıyla en üstteki tabaka lökosit tabakası, onun altında dekstran en altta eritrosit tabakaları oluştu. Üstteki lökosit tabakası Pastör pipeti yardımıyla aspire edilerek alındı. Bu işlemler +4 °C’de yapıldı. Elde edilen lökosit suspansiyonu -80°C’de saklandı (68).

Lökositlerin parçalanması; -80 °C’de dondurulmuş olan lökosit suspansiyonları oda ısısına getirildi. 10 µl numuneden alındı üzerine 490µl tampon ilave edilerek vorteksle karıştırıldı. Daha sonra bu suspansiyon sonikatörle 1-2dk muamele edildi (69, 70). Elde edilen lökositler parçalanmadan önce ve parçalandıktan sonra mikroskop altındaki görüntüleri şekil 10’da gösterilmiştir.



Şekil10: a: Lökositler parçalanmadan önce **b:** Lökositler parçalandıktan sonra

3.2.3. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTE TAYİNİ

Ksatin ve hipoksantion oksidaz tarafından üretilen süperoksit radikalleri tetrazolyum tuzuyla reaksiyona girmesi sonucunda oluşan renk 450 nm dalga

boyunda okunması esasına dayanır. Cayman chemical firmasının üretmiş olduğu Superoxide Dismutase Assay kiti, *Rayto marka 2100 C* model ELISA okuyucusu kullanılarak ölçüldü 1U SOD süperoksit radikalının %50'sini tüketmesi için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanır (71). SOD enzim aktivitesi kontro ve KKKA hasta gruplarının eritrositlerinde çalışıldı.

a. Süperoksit dismutaz reaktiflerinin hazırlanması

Test tamponu; test tampon şişesinden 3 ml çözelti alındı üzerine 27 ml distile su ilave edip karıştırıldı. Bu hazırlanmış olunan çözelti; 0,1mM dietilenetriaminpentaasetik asid (DTPA) ve 0.1 mM hipoksantin içeren 50 mM Tris-HCl (pH=8.0) tamponudur. + 4 °C'de en az iki ay stabildir.

Örnek tamponu; örnek tampon şişesinden 2 ml çözelti alındı üzerine 18 ml distile su ilave edip karıştırıldı. Bu hazırlanmış olunan çözelti; 50mM Tris-HCl (pH=8.0) tamponudur. Bu tampon SOD standartı hazırlanırken, ksantin oksidaz ve SOD ölçülecek örneklerin sulandırılmasında kullanıldı. + 4 °C'de en az iki ay stabildir.

Radikal dedektörü; tetrazolyum tuzu içeriren şişeden 50 µl alındı üzerine 19,95 ml test tamponu ilave edilerek sulandırıldı. Bu sulandırılmış olan radikal dedektörü 2 saat stabildir.

Süperoksit dismutaz standartı; sığır eritrositlerinden elde edilmiş SOD enzimi kullanıma hazır. Eritilmiş enzim çalışma esnasında buz kabı içinde tutulmalı.

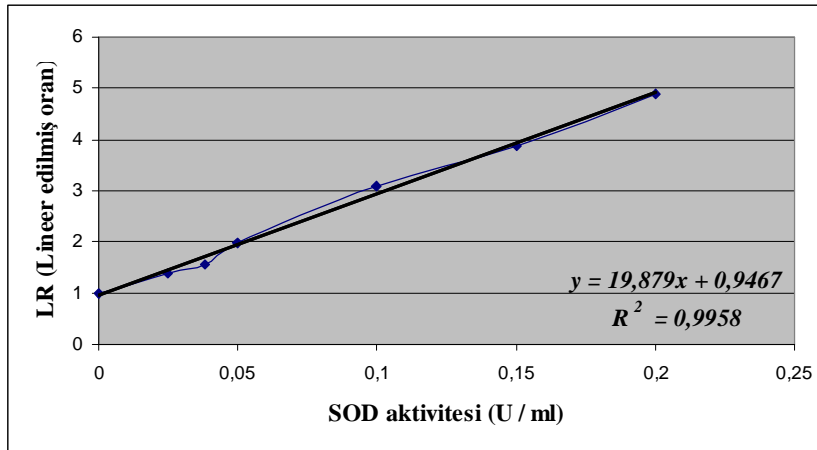
Ksantin oksidaz çözeltisi; kullanmadan önce ksantin oksidaz içeren şişeden 50 µl alındı üzerine 1,95 ml örnek tamponu ilave edilerek sulandırıldı. Eritilmiş enzim çalışma esnasında buz kabı içinde tutulmalı. Sulandırılmış olunan ksantin oksidaz çalışma esnasında buzlu ortamda tutulmalı. Sulandırılmış olan enzim 1 saat stabildir. Eritilmiş enzim tekrar dondurulmamalı.

b. Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini: Reaksiyon kabının ilk 7'sine radikal dedektöründen 200µl koyup, üzerine 10µl süperoksit dismutaz standartı ilave edildi.

- Diğer kuyucuklara radikal dedektöründen 200µl koyup, üzerine 10µl numune ilave edildi.

- Bu karışımların üzerine ksantin oksidaz çözeltisinden 20 µl eklendi.
- Doksan altılık kuyucuklu tabak çalkalayıcı yardımıyla birkaç saniye karıştırılıp üzeri kapatıldı.
- 20 dk inkübasyondan sonra numune ve standartlar 450 nm dalga boyunda okundu.

c. Hesaplama:



Şekil 11. SOD aktivite standart grafiği

Lineerize edilmiş oran (LR); Standart ve numune absorbanlarının birinci standartın absorbanına bölünmesi ile bulundu. Örneğin; standart A, B, C, D ... absorbanları, stan. A/stan. A, stan. B/stan. A, stan. C/stan. A, stan. D/stan. A ... vb.

$$\text{SOD (U/ml)} = \left[\left(\frac{\text{Örnek LR} - y\text{-kesim noktası}}{\text{eğim}} \right) \times \frac{0,23 \text{ ml}}{0,01 \text{ ml}} \right] \times \text{sulandırma oranı}$$

Her bir eritrosit süspansiyonunda, hemogloblin tayini yapılarak SOD seviyeleri g hemogloblin başına U olarak hesaplandı.

3.2.4. KATALAZ AKTİVİTE TAYİNİ

Optimum konsantrasyonda ki hidrojen peroksitle metanolün enzimatik reaksiyonun sonucunda formaldehit oluşur. Bu formaldehit 4-amino-3-hidrazin-5merkpto-1,2,4-triazol (Purpald) ile reaksiyonu sonucunda oluşan renk 540 nm dalga boyunda ölçme prensibi ile Cayman Chemical firmasının üretmiş olduğu

Catalase Assay kiti, *Rayto marka 2100 C* model ELISA okuyucusu kullanılarak ölçüldü. (71). CAT enzim aktivitesi kontro ve KKKA hasta gruplarının eritrositlerinde çalışıldı.

a. Katalaz reaktiflerinin hazırlanması

Test tamponu; test tampon şişesinden 2ml çözelti alındı üzerine 18 ml distile su ilave edilerek sulandırıldı. Bu hazırlanmış olunan çözelti; 100 mM potasyum fosfat tamponudur (pH= 7.0). Bu tampon + 4 °C’de en az iki ay stabildir.

Örnek tamponu; örnek tampon şişesinden 5ml çözelti alındı üzerine 45ml distile su ilave edip karıştırıldı. Bu hazırlanmış olunan çözelti; 1mM EDTA ve % 0,1 BSA (sığır serum albumin) içeren 25 mM potasyum fosfat tamponu (pH= 7.5) olarak hazırlandı. Bu tampon formaldehit standartının, CAT kontrolünün ve örneklerin sulandırılmasında kullanıldı. + 4 °C’de en az iki ay stabildir.

Katalaz standardı; 4.25 M formaldehit kullanıma hazır.

Kontrol; liyofilize olarak şişelenmiş sığır karaciğerinden elde edilen katalaz enzimi 2ml örnek tamponu ilave edilerek sulandırıldı. Sulandırılmış enzim 30 dk stabildir. Bu çözültiden 100 µl alınıp, üzerine 1,9 ml örnek tamponundan ilave edilerek sulandırıldı.

Potasyum hidroksit; KOH içeren şişe buz içine yerleştirdi. Şişenin içine 4 ml distile su ilave edilip karıştırıldı. Bu çözelti 10 M KOH içerecek şekilde hazırlandı. + 4 °C’de en az üç ay stabildir.

Metanol; kullanıma hazır

Hidrojen peroksidaz; 8.82 M H₂O₂’ten 40 µl alınıp üzerine 9,96 ml distile su ilave edilerek karıştırıldı. Sulandırılmış H₂O₂ solusyonu iki saat stabildir.

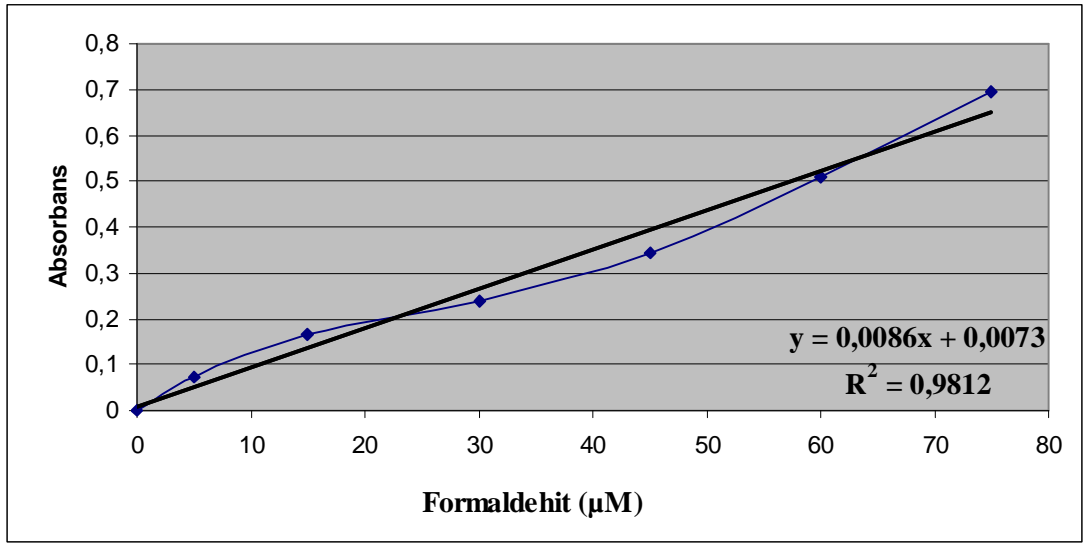
Purpald; 0.5 M hidroklorik asit içinde 4-amino-3-hidrazin-5merkapt-1,2,4-triazol (Purpald) kullanıma hazır.

Potayum periodat; 0.5 M potasyum hidroksit içindeki potasyum periodat kullanıma hazır.

b. Katalaz aktivite tayini

- Doksan altılık kuyucuklu tabağa ilk önce 100 µl test tamponu konuldu, üzerine 30 µl Metanol ilave edildi.
- İlk 7 kuyucuğa 20 µl standart diğer kuyucuklara 20 µl örnek konuldu.
- Tüm kuyucuklara 20 µl hidrojen peroksidaz ilave edildi.
- Orbital çalkalayıcı yardımıyla karıştırılıp 20 dk inkübe edildi.
- Tüm kuyucuklara 30 µl potasyum hidroksit ve 30 µl purpald ilave edildi.
- 10 dk inkübe edildi.
- 10µl potayum periodat ilave edilip 5 dk inkübe edildi.
- 540 nm dalga boyunda okutuldu.

c. Hesaplama:



Şekil 12. CAT aktivite standart grafiği

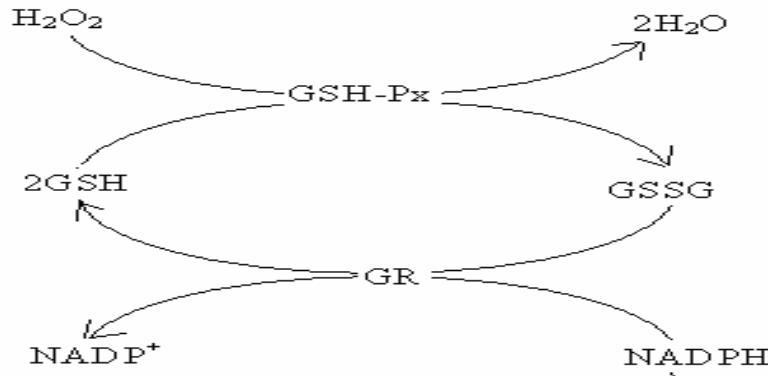
$$\text{Formaldehit } (\mu\text{M}) = \frac{\text{Örnek absorbans} - (\text{y eksenini kesen nokta})}{\text{Eğim}} \times \frac{0,17 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}}$$

$$\text{CAT Aktivitesi} = \frac{\text{Formaldehit } (\mu\text{M})}{20 \text{ dk}} \times \text{Sulandırma oranı} = \text{nmol/dk/ml (0,001U/ml)}$$

Her bir eritrosit süspansiyonunda, hemoglobin tayini yapılarak CAT seviyeleri g hemoglobin başına mU olarak hesaplandı.

3.2.5. GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTE TAYİNİ

GSH-Px redükte glutatyonu kullanarak hidrojen peroksidi indirger, bu esnada okside glutatyon oluşur. Okside glutatyon NADPH'ı koenzimolarak kullanan glutatyon redüktaz enzimi tarafında redükte glutatyonla dönüşüren reaksiyonu katalizler. 340 nm'de azalan NADPH konsantrasyonuna göre ölçülür. Northwest life science specialties, LLC firmasının üretmiş olduğu Glutathione Peroxidase Assay kiti, *Rayto marka 2100 C* model ELISA okuyucusu kullanılarak ölçüldü. (72). GSH-Px enzim aktivitesi kontro ve KKKA hasta gruplarının eritrositlerinde çalışıldı.



a-Glutatyon peroksidaz reaktiflerinin hazırlanması

Test tamponu; EDTA'lı fosfat tamponu (pH= 7.0)

NADPH diluenti; EDTA'lı fosfat tamponunda (pH= 7.0) stabilize edilmiş glutatyon redüktaz çözeltisi kullanıma hazır.

NADPH çözeltisi; NADPH diluenti içeren şişe NADPH ve indirgenmiş GSH içeren şişeye boşaltılıp karıştırıldı. Bu çözelti 2-8 °C'de üç gün stabildir

H₂O₂ çözeltisi; 1. sulandırma; %3 H₂O₂ reaktifi 1/100 oranında (0,2 ml %3 H₂O₂ ile 2 ml test tamponu ilave edilerek karıştırıldı) sulandırıldı.

2. sulandırma 13/ 100 oranında (1.sulandırma solusyonuna 10 ml test tamponu ilave edildi) sulandırıldı.

b. Glutasyon peroksiadaz enzim aktivite tayini:

- Plazma örnekleri seyreltmeden, eritrositler numuneleri hemoglobin konsantrasyonu 0.2–0.5mg/dl olacak şekilde 30–50 oranında seyreltildi.
- Bütün kuyucuklara bu örneklerden 50 µl konuldu.
- 50 µl NADPH çözeltisi ilave edildi.
- 50µl H₂O₂ çözeltisi ilave edilip 1dk. bekletikten sonra 5dk. boyunca her 30 saniyede bir 340nm’de okuma yapıldı.

c. Hesaplama:

$$mOran_{1s} = -1000 \times \Delta A_{340}/dk$$

$$mOran_{1b} = -1000 \times \Delta A_{340}/dk$$

6.22= 1 cm’lik ışık yolunda 340 nm dalga boyunda NADPH’in milimolar absorpsiyon katsayısı.

$V_{R_{xm}}$ = reaksiyon hacminin karışımı

V_s = örnek hacmi

2= 2mol GSH’ın 1mol GSSG dönüşmesinde her bir mol için okside edilen NADPH başına düzeltme katsayısı

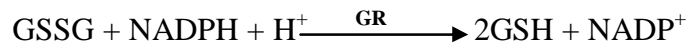
df= Örnek sulandırma faktörü

$$GSH-Px \text{ (mU/ml)} = \frac{2(mOran_{1s} - mOran_{1b}) \times V_{R_{xm}}}{6.22 \times V_s} \times df$$

Her bir eritrosit süspansiyonunda, hemoglobin tayini yapılarak GSH-Px seviyeleri g hemoglobin başına mU olarak hesaplandı.

3.2.6. GLUTATYON REDÜKTAZ AKTİVİTE TAYİNİ

GR aktivitesi Cariberg’nin tarif ettiği yöntemine göre, Northwest life science specialties, LLC firmasının üretmiş olduğu Glutathione Reductase Assay kiti, *Rayto marka 2100 C* model ELISA okuyucusu kullanılarak ölçüldü. Test prensibi;



GR aktivitesi; 340 nm'de NADPH'ın azalan miktarının ölçülmesi esasına dayanır. 1U GR aktivitesi 25 °C, pH= 7,6 ve bir dakikada GSSH'ı indirgeyecek enzim miktarı olarak tanımlanır (72). GR enzim aktivitesi kontro ve KKKA hasta gruplarının eritrositlerinde çalışıldı.

a. Glutasyon redüktaz reaktiflerinin hazırlanması

Test tamponu; 1-2 mM EDTA'lı 50-100 mM fosfat tamponu (pH=7.0-7.6) kullanıma hazır.

GSSG reaktifi; kullanıma hazır.

NADPH çözeltisi; NADPH içeren şişeye NADPH sulandırma solüsyonu boşaltılıp karıştırıldı. Bu çözelti orijinal şişesinde ve soğuk ortamda saklanırsa 14 gün stabildir.

b. Glutasyon redüktaz enzim aktivite tayini:

- Plazma numuneleri direk kullanıldı, eritrosit numuneleri 1/6 oranında seyreltildi.
- Doksan altılık kuyucuklu tabağın her bir kuyucuğuna 150 µl örnek konuldu.
- 50µl GSSG reaktifi ilave edilip karıştırıldı. 1dk. bekletildi.
- 50 µl NADPH çözeltisi ilave edilip karıştırıldı. 1dk. bekletildi.
- 340 nm dalga boyunda 3dk. boyunca 30 saniyede bir okuma alındı.

c. Hesaplama:

Eğim =2,725

Kesim noktası= 0.5486

$V_t = 250 \mu l$

$V_s = 150 \mu l$

Sulandırma oranı= 1/60

mOranı = 21.33 $\Delta A_{340}/dk$

$$\text{GR aktivitesi} = \frac{(-m\text{Oranı} - \text{kesim noktası})(Vt)(\text{sulandırma oranı})}{(\text{eğim}) \times (Vs)} = \text{mU/ml}$$

Her bir eritrosit süspansiyonunda, hemoglobin tayini yapılarak GR seviyeleri g hemoglobin başına mU olarak hesaplandı.

3.2.7. E VİTAMİNİ TAYİNİ

E vitamini mutlak etanol ve ksilen ekstraksiyonu ile elde edilen filtratın 2,4,6-tripidil-s-triazin (TPTZ) ve demir 3 klorür (FeCl_3) ile renklendirilmesi esasına dayanan metoda göre yapıldı (73). E vitamini düzeyi kontrol ve KKKA hasta gruplarının plazmasında çalışıldı.

a. E vitamini reaktiflerinin hazırlanması

Stok α -tokoferol (200mg/dl), çalışma standart α -tokoferol (1mg/dl)

% 0,12 2,4,6-tripidil-s-triazin (TPTZ)

% 0,12 demir 3 klorür (FeCl_3)

b. E vitamini düzeyi tayin yöntemi

	Kör	Standart	örnek
Mutlak etanol	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Serum	1.0 ml
α -tokoferol	1.0 ml
Distile su	1.0 ml
Ksilen	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

-Tüm tüpler 30 saniye vorteks yardımıyla karıştırıldı.

-Tüm tüpler 5 dk. santrifüj (1000 rpm) edildikten sonra her bir tüpten 0.5 ml ksilen tabakası alındı.

-Üzerine 0.5 ml TPTZ çözeltisi eklenerek karıştırıldı.

-İlk 4 dk. içinde 460 nm'de köre karşı numunelerin absorbansı kaydedildi.

-Her küvete 0.1 ml FeCl_3 eklendi ve karıştırıldı.

-600 nm’de köre karşı numunelerin absorbansı kaydedildi.

c. E vitamini düzeyinin hesaplanması

$$E \text{ vitamini} = \frac{\text{Örneğin } A_{600nm} - (0.40 \times \text{örneğin } A_{460nm})}{\text{standart } A_{600nm}} = \text{mg/dl}$$

3.2.8. LİPİT PEROKSİDASYONU TAYİNİ

Metodun temel prensibi lipit peroksidasyonu sonucunda açığa çıkan MDA’in tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucunda 532 nm dalga boyunda maksimum absorbans veren renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır (74). MDA düzeyi kontrol ve KKKK hasta gruplarının plazma ve eritrositlerinde çalışıldı.

a. Malondialdehit çözeltilerinin hazırlanması

Fosfat tamponu pH=7.4

0.1M EDTA

%30’luk TCA

6.072M MDA stok çözeltiden farklı konsantrasyonlarda yedi standart ve %1’lik TBA (0.05M NaCl) hazırlandı.

0.6 ml eritrosit süspansiyonuna 2.4 ml fosfat tamponu ilave edilerek örnek 1/5 oranında seyreltildi.

b. Malondialdehit düzeyinin ölçülmesi

	Kör	Standart	örnek
Standart	0.6 ml
Serum	0.6 ml
Distile su	0.6 ml
Fosfat tamponu	2.4 ml	2.4 ml	2.4 ml
%30 TCA	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml

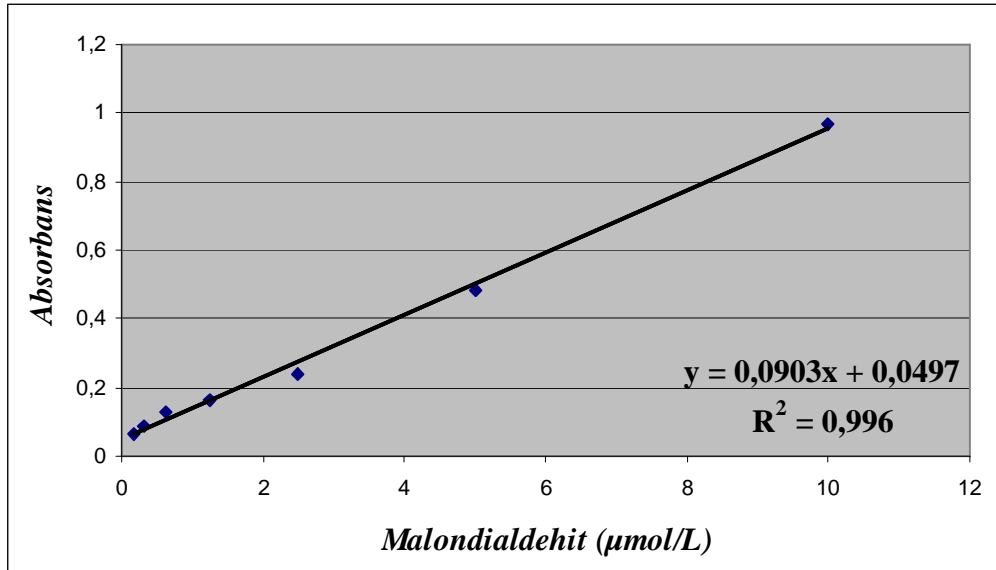
- 2 saat buz banyosunda bekletildikten sonra 2000 rpm’de 5dk. santrifüj edildi.

- 3 ml üst faz sıvı alınıp üzerine sırasıyla 0.225ml 0.1M EDTA ve 0.75ml %1'lik TBA eklendi. Tüplerin ağzı iyice kapatılıp, 15dk. sıcak su banyosunda kaynatıldı.

-Tüpler soğuduktan sonra spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda standart ve numuneler köre karşı absorbansları okutuldu.

c. Hesaplama:

MDA ile TBA tepkimesi sonucu oluşturulan standart eğri ile yapıldı. Lipit peroksidasyonu değerlendirilmesinde kullanılan malondildehit standart eğrisinin hazırlanması; Standart olarak 6.072M saf MDA kullanıldı. Stok standart çözeltisinden 100 µmol/L ve 10 µmol/L MDA içeren ara stok çözeltiler hazırlandı. Daha sonra sırasıyla 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 µmol/L standart seri hazırlandı. Hazırlanmış olan her bir standarttan 0.6ml alınarak numunelerle aynı işlemden geçirildi. Elde edilen absorbans değerleri ile MDA derişimleri arasındaki ilişkiye dayanılarak standart eğri oluşturuldu. Her bir eritrosit süspansiyonunda, hemoglobin tayini yapılarak MDA seviyeleri g hemoglobin başına µmol olarak hesaplandı.



Şekil 13. MDA standart grafiği

3.2.9. MİYELOPEROKSİDAZ AKTİVİTE TAYİNİ

Streptaividin peroksidazala Tetrametilbenzidin örnekteki MPO enzimiyle doğru orantılı olarak renklenme oluşur. Bu reaksiyon sitrik asit çözeltisi ilavesiyle durdurularak oluşan renk 450 nm dalga boyunda okunur. MPO enzim aktivitesi; insan MPO antikorlarını yakalayan kuyucuklar kullanarak ELISA yönteme göre, *Northwest life science specialties, LLC* firmasının üretmiş olduğu *Myeloperoxidase ELISA kiti*, *Rayto marka 2100 C* model ELISA okuyucusu kullanılarak ölçüldü (72). MPO enzim aktivitesi kontro ve KKKA hasta gruplarının plazma ve lökositlerinde çalışıldı.

a. Miyeloperoksidaz reaktiflerinin hazırlanması

Yıkama tamponu: 20 ml yıkama tamponu (200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris tamponu pH=7.4) alınarak üzerine 380 ml deiyonize su koyup karıştırıldı.

Sulandırma tampon: tampon A şişesinden (koruyucu olarak 2-kloroasetamidli 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris tamponu pH=7.4) 10ml alındı üzerine 15ml deiyonize su ilave edildi, tampon B şişesinden (koruyucu olarak 2-kloroasetamidli içeren protein solüsyonu) 5ml alındı üzerine 20ml deiyonize su ilave edilip karıştırıldı. Daha sonra bu iki tampon 1:1 oranında karıştırıldı.

Çözelti 4: 5a şişesiyle (Biyotinle işaretlenmiş anti-miyeloperoksidaz) 5b (deiyonize su) şişesi karıştırıldı. 96 çalışma gurubu için bu karışımdan 1ml alınıp üzerine 11 ml tamponla (200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris pH=7.4) sulandırıldı.

Çözelti 5: Şişe 6'ya (Streptavidin-peroksidaz) 1ml deiyonize su ilave edilip karıştırıldı. 96 çalışma gurubu için stoktan 0,5ml alınıp üzerine 11,5 ml tampon (200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris pH=7.4) ilave edilir.

Çözelti 6: 6. Şişe (tetrametilbenzidin), 7. şişe (sitrik asit çözeltisi) kullanıma hazır.

b. Miyeloperoksidaz enzim aktivite tayini:

1- Çalışmaya başlamadan önce tüm numuneler oda ısısına getirildi.

2- Okuma küvetlerine 100 µl standart/kontrol/numune koyduktan sonra üstü kapatılarak oda ısısında 1saat bekletildi.

3-Küvetler ters çevrilerek boşaltıldı, boşaltılmış olunan küvetlere 200 µl tampon koyup 20 saniye bekledikten sonra küvetler ters çevrilerek boşaltıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.

4-Her bir küvete **çözelti 4**'den 100 µl ilave edip üzeri kapatıldı. Oda ısısında 1saat bekletildi.

5- Küvetler ters çevrilerek boşaltıldı, boşaltılmış olan küvetlere 200 µl tampon koyup 20 saniye bekledikten sonra küvetler ters çevrilerek boşaltıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.

6- Her bir küvete **çözelti 5**'den 100µl ilave edip üzeri kapatıldı. Oda ısısında 1saat bekletildi.

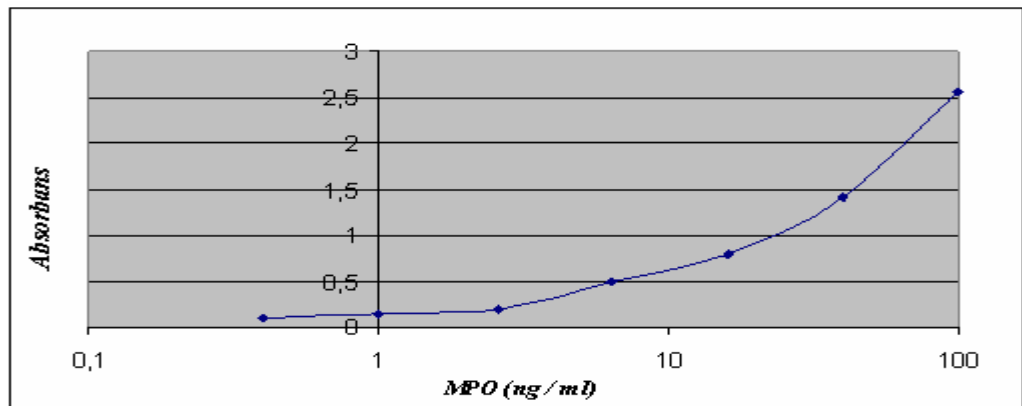
7- Küvetler ters çevrilerek içi boşaltıldı, boşaltılmış olan küvetlere 200 µl tampon koyup 20 saniye bekledikten sonra küvetler ters çevrilerek boşaltıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.

8- Her bir küvete **şişe 6**'dan 100 µl ilave edip üzeri kapatıldı. Karanlık ortamda oda ısısında 20-30 dk bekletildi.

9- Her bir küvete **şişe 7**'den 100 µl ilave edip karıştırıldı.

10- 450 nm dalga boyunda okuma yapıldı.

c. Hesaplama:



Şekil 14. MPO aktivite standart grafiği

$MPO(\text{ng/ml})=3,713x - 2,242x^2 + 0,4587x^3 - 0,4927$ (x=450 nm dalgaboyundaki absorbans) formülüne göre hesaplandı. Lökosit miyeloperoksidaz aktivitesi; elde edilen sonuçlar lökosit sayısına bölündü.

3.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 14.0 bilgisayar programı kullanılarak, bağımsız guruplarda iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi Man Whitney U testi ve Kruskal Waallis testi uygulanarak yapılmıştır. Verilerimiz tablolarda aritmetik ortalama + standart sapma şeklinde belirtilip yanılma düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. HASTA VE KONTROL GRUBU CİNSİYET VE YAŞ DAĞILIMI

KKKA hastalarında, oksidatif stresin neden olduğu lipid peroksidasyonunun olup olmadığını göstermek için eritrosit ve plazma malondialdehit düzeyine, eritrositlerde antioksidanlardan; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz enzim aktivitelerine ve plazma E vitamini düzeyine, plazma ve lökosit miyeloperoksidaz enzim aktivitesinin belirlenmesi amaçlandı. Yapılan çalışmada kullanılan kontrol ve hasta grubunu oluşturan bireylerin yaş dağılımı tablo 2’de verildi.

Tablo 1. Kontrol ve hasta gruplarının yaş ve cinsiyet demografik bilgileri

	Kontrol	Hasta
Birey sayısı	41	47
Cinsiyet		
Erkek	16 (%39)	27 (%57,4)
Kadın	25 (%61)	20 (%42,6)
Yaş (Yıl)		
Ortalama \pm SD	42,63 \pm 20,56	42,53 \pm 20,38

t =0,02, p=0,981 ; p>0,0 5 yaş yönünden gruplar arası fark önemsizdir. $X^2= 2,97$ p= 0,085; p>0,05 Cinsiyet açısından gruplar arasındaki farklılık önemsizdir.

Tablo 2. Çalışma Gruplarının Yaş Dağılımı

Yaş	Kontrol		Hasta		Toplam
	S	%	S	%	
≤ 14	4	9,8	6	12,8	10
15-19	4	9,8	3	6,4	7
20-29	5	12,2	4	8,5	9
30-39	6	14,6	4	8,5	10
40-49	4	9,8	9	15,1	13
50-59	8	19,5	10	21,3	18
60 \leq	10	24,4	11	23,4	21
Toplam	41	100	47	100	88
$X^2 = 2,85$		p= 0,827		p > 0,05	

Kontrol ve hasta grubundaki bireylerin yaş dağılımları karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0,05$).

Tablo 3. Hasta ve Kontrol Grubu ölçülen Parametrelerin Değerlendirilmesi

	Kontrol $n = 41 \bar{X} \pm S$	Hasta $n = 47 \bar{X} \pm S$	Sonuç
SOD U/gHb	1199,52 \pm 216,81	1798,85 \pm 257,98	$t=-11,700$ $p=0,000$ $p < 0,05$
CAT U/gHb	12046,32 \pm 1907,93	12754,15 \pm 2129,11	$t=-1,632$ $p=0,106$ $p > 0,05$
GSH-Px U/gHb	19,226 \pm 3,934	18,782 \pm 2,877	$t=0,610$ $p=0,544$ $p > 0,05$
GR U/gHb	8,872 \pm 1,399	9,342 \pm 1,275	$t=-1,621$ $p=0,109$ $p > 0,05$
MPO _{plaz.} ng/ml	44,836 \pm 9,710	57,623 \pm 8,846	$t=-6,463$ $p=0,000$ $p < 0,05$
MPO _{lök.} ng/ml/lökosit	0,486 \pm 0,114	0,790 \pm 0,290	$t=-6,237$ $p=0,000$ $p < 0,05$
MDA _{erit.} μ mol/gHb	0,210 \pm 0,048	0,290 \pm 0,048	$t=-7,570$ $p=0,000$ $p < 0,05$
MDA _{plaz.} μ mol/L	0,457 \pm 0,164	0,784 \pm 0,196	$t=-8,193$ $p=0,000$
E-vit. mg/dl	1,092 \pm 0,233	0,931 \pm 0,122	$t=4,130$ $p=0,000$ $p < 0,05$

Hasta ve kontrol grubunda ki bireyler enzim aktiviteleri açısından karşılaştırıldığında CAT, GSH-Px ve GR yönünden iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilken ($p>0,05$), SOD, MPO_{plaz.}, MPO_{lök.} enzim aktiviteleri ile MDA_{erit.}, MDA_{plaz.} E-vit. düzeyleri karşılaştırıldığında iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Tablo 4. Kontrol Grubunda yaş gruplarına göre ölçülen Parametrelerin karşılaştırılması

Yaş	SOD U/gHb $\bar{X} \pm S$	CAT U/gHb $\bar{X} \pm S$	GSH-Px U/gHb $\bar{X} \pm S$	GR U/gHb $\bar{X} \pm S$	MPO _{plaz} ng/ml $\bar{X} \pm S$	MPO _{lök.} ng/ml/lök $\bar{X} \pm S$	MDA _{erit} $\mu\text{mol/gHb}$ $\bar{X} \pm S$	MDA _{plaz} $\mu\text{mol/L}$ $\bar{X} \pm S$	E-vit. mg/dl $\bar{X} \pm S$
≤ 14	1261,11 ± 330,51	12309,25 ± 693,07	17,38 ± 2,52	8,39 ± 0,99	57,052 ± 13,690	0,448 ± 0,06	0,225 ± 0,06	0,450 ± 0,18	1,117 ± 0,03
15-19	1170,01 ± 217,3	12610,25 ± 786,70	17,78 ± 5,09	8,80 ± 1,24	40,820 ± 2,454	0,513 ± 0,11	0,190 ± 0,04	0,550 ± 0,21	0,905 ± 0,48
20-29	1205,44 ± 182,4	12094,20 ± 740,55	21,48 ± 4,36	8,90 ± 1,74	57,652 ± 8,540	0,608 ± 0,14	0,229 ± 0,04	0,386 ± 0,11	1,272 ± 0,17
30-39	1231,25 ± 264,84	13061,33 ± 652,48	17,94 ± 3,30	9,30 ± 1,55	43,403 ± 4,884	0,517 ± 0,13	0,222 ± 0,05	0,487 ± 0,14	1,178 ± 0,20
40-49	1271,75 ± 283,35	12582,75 ± 996,21	19,62 ± 1,57	9,80 ± 2,10	38,980 ± 4,239	0,440 ± 0,04	0,215 ± 0,04	0,560 ± 0,19	1,078 ± 0,25
50-59	1188,85 ± 202,36	12006,00 ± 666,23	19,90 ± 4,73	8,81 ± 1,34	41,678 ± 9,732	0,468 ± 0,13	0,202 ± 0,05	0,453 ± 0,15	1,058 ± 0,16
60 +	1144,31 ± 189,29	10900,30 ± 485,76	19,48 ± 4,27	8,43 ± 1,20	40,779 ± 3,568	0,444 ± 0,06	0,194 0,04	0,402 ± 0,16	1,050 ± 0,16
	KW=1,36 p=0,968 p>0,05	KW=6,27 p= 0,393 p> 0,05	KW=4,19 p= 0,651 p> 0,05	KW=2,92 p= 0,819 p> 0,05	KW= 13,19 P=0,04 P<0,05	KW= 6,44 p= 0,376 p> 0,05	KW= 3,61 p= 0,730 p> 0,05	KW= 4,50 p= 0,609 p>0,05	KW= 5,48 p= 0,483 p> 0,05

Kontrol grubundaki bireylerin yaş gruplarına göre ölçülen parametreleri karşılaştırıldığında yaş grupları arasındaki farklılık MPO yönünden önemli bulunurken ($p<0,05$), diğer parametreler yönünde istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p>0,05$). MPO değerleri yaş gruplarına göre ikişerli karşılaştırıldığında 14 ve daha küçük yaşlar ile 40-49 yaş, 50-59 yaş 60 + yaş arasındaki farklılık 20-29 yaş ile 30-39 yaş, 40-49 yaş 50-59 yaş, 60+ yaş arasındaki farklılık önemli bulunurken ($p<0,05$) diğer yaş grupları arası fark önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo 5. Hasta Grubunda yaş gruplarına göre ölçülen Parametrelerin karşılaştırılması

Yaş	SOD U/gHb $\bar{X} \pm S$	CAT U/gHb $\bar{X} \pm S$	GSH-Px U/gHb $\bar{X} \pm S$	GR U/gHb $\bar{X} \pm S$	MPO _{plaz} ng/ml $\bar{X} \pm S$	MPO _{lök} ng/ml/lök $\bar{X} \pm S$	MDA _{erit} $\mu\text{mol/gHb}$ $\bar{X} \pm S$	MDA _{plaz} $\mu\text{mol/L}$ $\bar{X} \pm S$	E-vit. mg/dl $\bar{X} \pm S$
≤ 14	1848,43 ± 226,39	13041,33 ± 1179,65	18,87 ± 3,98	10,30 ± 1,56	63,186 ± 2,857	0,904 ± 0,28	0,259 ± 0,04	0,753 ± 0,179	0,943 ± 0,114
15-19	1766,73 ± 336,56	12120,67 ± 1217,87	20,14 ± 1,67	9,39 ± 0,43	59,617 ± 7,440	0,927 ± 0,37	0,319 ± 0,02	0,780 ± 0,229	0,870 ± 0,159
20-29	1696,18 ± 300,13	12574,75 ± 854,40	17,27 ± 1,91	8,33 ± 1,13	59,198 ± 11,578	0,810 ± 0,27	0,308 ± 0,04	0,715 ± 0,161	0,905 ± 0,177
30-39	1299,69 ± 296,03	13030,50 ± 828,94	19,49 ± 2,96	10,07 ± 0,69	63,405 ± 2,840	0,617 ± 0,03	0,293 ± 0,06	0,728 ± 0,262	0,935 ± 0,451
40-49	1720,52 ± 245,75	12879,00 ± 731,81	17,24 ± 2,34	9,01 ± 1,46	55,551 ± 8,866	0,881 ± 0,43	0,296 ± 0,03	0,809 ± 0,188	0,970 ± 0,145
50-59	1890,64 ± 241,83	12649,40 ± 795,29	19,00 ± 2,89	9,22 ± 1,24	50,446 ± 9,569	0,698 ± 0,19	0,294 ± 0,04	0,697 ± 0,155	0,894 ± 0,136
60 +	1799,22 ± 289,23	12728,09 ± 625,19	19,70 ± 3,01	9,32 ± 1,22	59,588 ± 7,946	0,743 ± 0,25	0,298 ± 0,04	0,885 ± 0,217	0,952 ± 0,097
	KW= 2,75 p= 0,839 p> 0,05	KW=0,750 p= 0,993 p>0,05	KW= 5,47 p= 0,485 p> 0,05	KW= 7,23 p= 0,300 p>0,05	KW=10,47 p= 0,106 p>0,05	KW= 4,61 p= 0,594 p>0,05	KW= 4,35 p= 0,628 p>0,05	KW=5,66 p= 0,462 p>0,05	KW= 2,58 p= 0,859 p>0,05

Hasta grubundaki bireylerin yaş gruplarına göre ölçülen parametreleri karşılaştırıldığında yaş grupları arası fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p > 0,05$).

Tablo 6. Kontrol Grubunda ölçülen Parametreler yönünden erkek ve kadınların karşılaştırılması

	Erkek $n = \bar{X} \pm s$	Kadın $n = 25 \bar{X} \pm s$	Sonuç
SOD U/gHb	1184,50 ± 224,82	1209,12 ± 215,66	p= 0,789 p> 0,05
CAT U/gHb	11385,13 ± 1601,85	12469,48 ± 1994,31	p= 0,078 p> 0,05
GSH-Px U/gHb	18,43 ± 3,68	19,73 ± 4,07	p= 0,285 p> 0,05
GR U/gHb	8,28 ± 1,29	9,25 ± 1,35	p= 0,013 p< 0,05
MPO _{plaz.} ng/ml	44,312 ± 8,708	45,172 ± 10,462	p= 0,748 p>0,05
MPO _{lök.} ng/ml/lökosit	0,463 ± 0,102	0,500 ± ,121	p= 0,329 p> 0,05
MDA _{erit.} µmol/gHb	0,203 ± 0,048	0,212 ± 0,050	p= 0,584 p> 0,05
MDA _{plaz.} µmol/L	0,423 ± 0,162	0,478 ± 0,165	p= 0,261 p> 0,05
E-vit. mg/dl	1,073 ± 0,145	1,105 ± 0,278	p= 0,415 p> 0,05

Kontrol grubundaki bireylerin ölçülen parametreleri yönünden erkek ve kadınlar değerlendirildiğinde, erkeklerle kadınlar arasında GR enzim aktivitesi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı iken (p<0,05), diğer parametreler açısından cinsiyetler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0,05).

Tablo 7. Hasta Grubunda ölçülen Parametreler yönünden erkek ve kadınların karşılaştırılması

	Erkek n = 16 $\bar{X} \pm s$	Kadın n = 25 $\bar{X} \pm s$	Sonuç
SOD U/gHb	1762,21 \pm 276,97	1848,32 \pm 227,32	P = 0,302 p>0,05
CAT U/gHb	12382,52 \pm 2385,44	13255,85 \pm 1651,33	p= 0,228 p>0,05
GSH-Px U/gHb	18,269 \pm 2,527	19,475 \pm 3,228	p= 0,162 p>0,05
GR U/gHb	9,158 \pm 1,401	9,584 \pm 1,076	p= 0,218 p>0,05
MPO _{plaz.} ng/ml	58,218 \pm 9,083	56,819 \pm 8,682	p= 0,505 p>0,05
MPO _{lök.} ng/ml/lökosit	0,827 \pm 0,329	0,740 \pm 0,228	p= 0,511 p>0,05
MDA _{erit.} μ mol/gHb	0,289 \pm 0,044	0,302 \pm 0,044	p= 0,223 p>0,05
MDA _{plaz.} μ mol/L	0,740 \pm 0,190	0,834 \pm 0,195	p= 0,091 p>0,05
E-vit. mg/dl	0,917 \pm 0,130	0,951 \pm 0,112	p= 0,445 p>0,05

Hasta grubundaki erkek ve kadın bireyleri ölçülen Parametreler yönünden değerlendirildiğinde cinsiyetler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p>0,05).

Tablo 8. Hasta ve Kontrol Grubundaki erkeklerin ölçülen Parametrelerin değerlendirilmesi

	Kontrol n = 16 $\bar{X} \pm S$	Hasta n = 27 $\bar{X} \pm S$	Sonuç
SOD U/gHb	1184,51 \pm 224,82	1762,21 \pm 276,97	p= 0,000 p< 0,05
CAT U/gHb	11385,13 \pm 1601,85	12382,52 \pm 2385,45	p= 0,152 p> 0,05
GSH-Px U/gHb	18,432 \pm 3,681	18,269 \pm 2,527	p= 0,669 p> 0,05
GR U/gHb	8,281 \pm 1,297	9,158 \pm 1,402	p= 0,023 p< 0,05
MPO _{plaz.} ng/ml	44,312 \pm 8,708	58,218 \pm 9,083	p= 0,000 p< 0,05
MPO _{lök.} ng/ml/lökosit	0,463 \pm 0,103	0,827 \pm 0,329	p= 0,000 p<0,05
MDA _{erit.} μ mol/gHb	0,203 \pm 0,048	0,289 \pm 0,044	p= 0,000 p< 0,05
MDA _{plaz.} μ mol/L	0,423 \pm 0,162	0,740 \pm 0,190	p= 0,000 p< 0,05
E-vit. mg/dl	1,073 \pm 0,145	0,917 \pm 0,130	p= 0,001 p< 0,05

Hasta ve kontrol grubundaki erkekler ölçülen parametreler yönünden karşılaştırıldığında CAT ve GSH-Px yönünden her iki gruptaki erkekler arasındaki fark önemsiz iken (p>0,05), SOD, GR, E-vit., MDA_{plaz.}, MDA_{erit.}, MPO_{plaz.}, MPO_{lök.} parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p<0,05).

Tablo 9. Hasta ve Kontrol Grubundaki Kadınların ölçülen Parametrelerin değerlendirilmesi

	Kontrol n = 25 $\bar{X} \pm S$	Hasta n = 20 $\bar{X} \pm S$	Sonuç
SOD U/gHb	1209,13 \pm 215,66	1848,32 \pm 227,32	P = 0,000 p< 0,05
CAT U/gHb	12469,48 \pm 1996,32	13255,85 \pm 1651,33	p= 0,244 p> 0,05
GSH-Px U/gHb	19,735 \pm 4,079	19,475 \pm 3,228	p= 0,945 p> 0,05
GR U/gHb	9,250 \pm 1,354	9,584 \pm 1,076	p= 0,236 p> 0,05
MPO _{plaz.} ng/ml	45,172 \pm 10,462	56,819 \pm 8,682	P= 0,001 p< 0,05
MPO _{lök.} ng/ml/lökosit	0,500 \pm 0,121	0,740 \pm 0,228	p= 0,000 p<0,05
MDA _{erit.} μ mol/gHb	0,212 \pm 0,050	0,302 \pm 0,044	p= 0,000 p< 0,05
MDA _{plaz.} μ mol/L	0,478 \pm 0,165	0,834 \pm 0,195	p= 0,000 p< 0,05
E-vit. Mg/dl	1,105 \pm 0,278	0,951 \pm 0,112	p= 0,003 p< 0,05

Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda ölçülen Parametreler karşılaştırıldığında CAT, GSH-Px ve GR yönünde her iki gruptaki kadınlar arasındaki fark önemsiz iken (p<0,05), SOD, E-vit., MDA_{plaz.}, MDA_{erit.}, MPO_{plaz.}, MPO_{lök} parametreleri açısından fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada; Sivas ve çevre illerde yaygın olan KKKA vakalarında, viral enfeksiyona bağlı olarak oksidan/antioksidan dengesini nasıl etkilediğini göstermek için; oksidatif strese bağlı olarak meydana gelen MDA düzeyine, antioksidan enzim (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz) aktivitelerine, E-vitamini düzeyine ve antimikrobiyal etkiye sahip miyeloperoksidaz enzim aktivitesine bakılması planlanmıştır.

Türkiye’de KKKA vakalarında ölüm oranı yaklaşık % 5-10 olduğu bilinmektedir. Özellikle Sivas’ı da kapsayan Orta Anadolu Bölgesi’nde ilk kez 2002 yılında tespit edilen KKKA vaka sayısında günümüze kadar hızlı bir artış olduğu görülmektedir. Bu hastalığın endemik olduğu dünyanın diğer bölgelerinde ölüm oranı yaklaşık % 30’a ulaşabilmektedir (25, 75, 76).

Tablo 10. Orta Anadolu illerinde zamana bağlı olarak artma eğilimi gösteren KKKA vaka ve ölüm sayıları (11, 77)

Yıllar	Vaka Sayısı	Ölü Sayısı
2002	17	-----
2003	133	6
2004	249	13
2005	266	13
2006	438	27
2007	717	33

Tablo 9 incelendiğinde; 2002’den 2007’na kadar yapılan araştırmalar sonucunda vaka ve ölü sayısında doğrusal bir artış olduğu, ölüm oranı ise yaklaşık % 5 civarında olduğu görülmektedir.

Oksidatif stres üzerine yapılan araştırmalarda; kontrol grubunda 12-44 örnek, hasta grubu olarak ta 33-84 örnekte çalışmalar yapılmış (78-81). KKKA hastalarında yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarını, iki bağımsız grubun aritmetik ortalamaları arasındaki farka önemlilik testi uygulandı. Bu testi uygulamak için her bir grupta (kontrol veya hasta) en az 30 örnek bulunması gerekmektedir. Bu yüzden bu çalışmada gruplar 47 hasta ve 41 kontrol örneğinden oluşturuldu. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi aracılığı ile Hıfzısıhha Enstitüsü’nde PCR/ELİZA yöntemiyle KKKA tanısı konmuş 47 hasta ve kontrol grubu örnekleri

sağlıklı, herhangi bir sistemik hastalığı olmayan, yaş ve cinsiyet bakımından hasta grubuna istatistiksel olarak benzerlik gösteren 41 bireyden sağlandı.

KKKA hastalığını oksidatif stres ve antioksidan sistemleriyle ilişkilendirmek için, öncelikle plazma ve lökositlerde MPO enzimi ve oksidatif stresin neden olduğu lipit peroksidasyonu son ürünü olan MDA düzeyine eritrosit ve plazmada bakıldı. Ancak yalnızca bir antioksidan düzeyine bakılarak güvenilir bir sonuca ulaşmanın mümkün olmadığı gerçeği dikkate alınarak bir başka antioksidan olan plazma E vitamini düzeyi ve eritrositlerde SOD, CAT, GSH-Px ile GR enzimlerinin aktiviteleri de ölçüldü. Hasta ve kontrol grubunda ölçümlerle elde edilen sayısal verilerin yaş, cinsiyet açısından istatistiksel analiz sonuçları aşağıda özetlenmektedir:

Kontrol ve hasta grubundaki bireylerin yaş dağılımları karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu (Tablo 2).

Kontrol ve hasta grubundaki bireylerin yaşları ile SOD, CAT, GSH-Px, GR, E-vit., MDA_{plaz}, MDA_{erit}, MPO_{plaz}, MPO_{lök} parametreleri karşılaştırıldığında yaş grupları arası fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu (Tablo. 2-3).

Kontrol ve hasta grubundaki bireylerin SOD, CAT, GSH-Px, GR, E-vit., MDA_{plaz}, MDA_{erit}, MPO_{plaz}, MPO_{lök} parametreleri ile cinsiyet açısından değerlendirildiğinde; kontrol grubunda erkeklerle kadınlar arasında GR enzim aktivitesi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı iken, diğer parametreler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Hasta gruplarındaki erkekler ve kadınlar ölçülen parametrelerde iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo. 4-5).

Hasta ve kontrol grubunda erkekler ile ilişkili SOD, CAT, GSH-Px, GR, E-vit., MDA_{plaz}, MDA_{erit}, MPO_{plaz}, MPO_{lök} parametreler karşılaştırıldığında CAT ve GSH-Px yönünde iki grup arasındaki fark önemsiz iken, SOD, GR, E-vit., MDA_{plaz}, MDA_{erit}, MPO_{plaz}, MPO_{lök} parametreleri açısından fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo. 6).

Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda SOD, CAT, GSH-Px, GR, E-vit., MDA_{plaz}, MDA_{erit}, MPO_{plaz}, MPO_{lök} parametreler karşılaştırıldığında CAT, GSH-Px ve GR yönünde iki grup arasındaki fark önemsiz iken, SOD, E-vit., MDA_{plaz},

MDA_{erit}, MPO_{plaz}, MPO_{lök} parametreleri açısından fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo. 7).

Hasta ve kontrol grubundaki bireylerde SOD, CAT, GSH-Px, GR, E-vit., MDA_{plaz}, MDA_{erit}, MPO_{plaz}, MPO_{lök} parametreleri karşılaştırıldığında; CAT, GSH-Px ve GR enzim aktiviteleri iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilken, SOD, MPO_{plaz}, MPO_{lök} enzim aktiviteleri ile MDA_{erit}, MDA_{plaz}, E-vit. düzeyleri açısından iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo. 8).

Miyeloperoksidaz, oksidan ve antioksidanlar hasta bireylerde niceliksel olarak değişiklik göstermektedir. Reaktif oksijen türleri genellikle artma eğilimi sergilerken, antioksidanlar her iki yönde değişebilmektedir. Miyeloperoksidaz enzim aktivitesi aortik iskemik reperfüzyonu ve kardiyovasküler gibi hastalıklarda çalışılmıştır. Oksidan ve antioksidanlar çeşitli hastalık gruplarında çalışılmıştır. Örneğin; depresyon, yüksek tansiyon, hipotiroidizm, Parkinson hastalığı, alerjik hastalıklar, akciğer kanserleri ve Alzheimer (82-90). Bugüne kadar mevcut literatürde KKKA hastalarında miyeloperoksidaz enzim aktivitesi veya oksidan/antioksidan miktarlarının ölçümüne ilişkin herhangi bir bilgiye ulaşılamamaktadır. Bu nedenle, KKKA virüsünün neden olduğu viral hemorajik ateş hastalığının epidemiyolojisi, sepsisin klinik tablosuna benzediği için, araştırmanın sonuçları hem viral hem de sepsis hastalıklarında yapılan araştırmaların bulguları ile kıyaslandı.

Oksidanların virüslerin inaktivasyonundaki rolü 1970'li yılların başlarında anlaşılmaya başlamış, ancak, viral enfeksiyonlardaki metabolik rolü daha sonraki yıllarda fark edilmiştir (91).

Oksidanlar hücre içi sinyal iletiminde ve mikroorganizmalara karşı konağın savunma sistemlerinde görev alırlar. Ancak, yüksek miktardaki reaktif oksijen türleri birçok hastalığın birincil sebebi olmasalar da, kanser, iskemi, immün yetmezlik, endokrin fonksiyon bozukluğu gibi önemli hastalıkların patojenezlerinde rol oynayabilmekte ve doku hasarına neden olabilmektedirler. Hastalık ile bu reaktiflerin miktarı arttığında, savunma sistemleri antioksidan enzimlerinin sentezini düzenlemektedir (32, 91, 92, 93).

Hasta eritrositlerinde SOD enzim aktivitesinin, kontrol grubu eritrositlerindeki kadar değil, daha yüksek olduğu belirlendi (kontrol grubu, 1199,52 ±

216,81 U/gHb; hasta grubu 1798,85 ± 257,98 U/gHb). İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,000) (Tablo. 8). Hepatit C / B ve HIV virüsü ile enfekte olanlarda, etiyojisi tam olarak bilinmeyen bir virüsün neden olduğu Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) ve Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS) hastalığında da, eritrositlerde SOD enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu bildirilmiştir (78, 94, 95, 96, 97). Bu araştırmalar sonucunda elde edilen SOD enzim aktivitesiyle KKKA hastalarından elde edilen sonuçlar paralellik göstermektedir. Viktor ve arkadaşlarının sepsisli hastalarda ROT'nin inflamasyona bağlı olarak arttığını ve bunun oksidatif strese neden olduğunu bildirmiştir (98). SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO₂ artışıyla artar. KKKA hastalarında viral enfeksiyona cevap sırasında uyarılmış fagositik lökositlerin membranına bağlı NADPH oksidaz enzimi aracılığıyla hücre içi süperoksit derişimi artırarak oksidatif strese neden olduğu, oksidatif stresin artmasına bağlı olarak SOD aktivitesinin arttığı düşünölmektedir. Aynı zamanda artmış SOD aktivitesi, bu hastalarda oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalinin (O₂^{·-}) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı koruyarak ve fagosite edilmiş bakterilerin intrasellöler öldürölmesinde de rol oynar.

Cherian ve arkadaşları sepsisli çocuklarda oksidatif stresi incelediklerinde, hasta eritrosit SOD enzim aktivitesi ile kontrol grubu arasında bir fark olmadığını ve iki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. Cherian ve arkadaşlarının sepsisli hastalarda buldukları eritrosit SOD enzim aktivitesiyle, KKKA hastalarında elde edilen sonuçlar paralellik göstermemektedir. Bu bulgu, vücudun oksidatif strese karşı geliştirmiş olduğu bir tür adaptasyon ile açıklanmıştır (79). KKKA hastalarının eritrosit SOD enzim aktivitesinin artmasına bağlı olarak da ortamda hidrojen peroksit miktarının artacağı düşünölebilir. Hidrojen peroksit toksik bir bileşik değildir. Ancak hidrojen peroksit Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile hidroksil radikallerine dönüşebilir. Oluşan hidroksil radikalleri lipid peroksidasyonuna neden oldukları için oldukça toksik bileşiklerdir. Canlı organizmalar hidrojen peroksitin toksik olan hidroksil radikallerine dönüşmeden ortamdaki uzaklaştıracak antioksidanlar ve antioksidan enzim sistemlerine sahiptirler (99).

Fazla hidrojen peroksiti CAT, GSH-Px ve GR gibi enzimler ortamdaki uzaklaştırılır (100-102). KKKA hastalarının eritrositlerinde CAT, GSH-Px ve GR enzim aktiviteleri incelendiğinde; hasta eritrositlerinde CAT enzim aktivitesinin, kontrol grubu eritrositlerindeki kadar değil biraz daha yüksek olduğu belirlendi (kontrol grubu $12046,32 \pm 1907,92$ U/gHb; hasta grubu, $12754,15 \pm 2129,11$ U/gHb). Ancak İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,100$) (Tablo. 8). Hasta eritrositlerinde GSH-Px enzim aktivitesinin, kontrol grubu eritrositlerindeki kadar değil daha düşük olduğu belirlendi (kontrol grubu $19,226 \pm 3,934$ U/gHb; hasta grubu $18,782 \pm 2,877$ U/gHb). İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,209$) (Tablo. 8). Hasta eritrositlerinde GR aktivitesinin, kontrol grubu eritrositlerindeki kadar değil daha yüksek olduğu belirlendi (kontrol grubu $8,872 \pm 1,399$ U/gHb; hasta grubu, $9,342 \pm 1,275$ U/gHb). Ancak, iki grup arasındaki aktivite farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,011$) (Tablo. 8).

RAS hastalarında yapılan bir çalışmada CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir (97). Hepatit B/C hastalarında GSH-Px enzim aktivitesinde, kontrol grubuna göre, hafif bir artış olduğu belirlenmesine rağmen, bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bildirilmiştir (96). Hepatit B virüsü ile enfekte olmuş hastalarla yapılan bir çalışmada; hasta gruplarında kontrol grubuna göre GSH-Px ve CAT enzimlerinin aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu rapor edilmiştir (78). Yine, etiyojisi tam olarak bilinmeyen bir virüsün neden olduğu DHF hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada, GSH-Px aktivitesinin kontrol grubuna göre düşük olduğu saptanmıştır (97). Öte yandan, HIV ile enfekte olmuş hastalar ile yapılan bir çalışmada eritrositlerdeki GSH-Px aktivitesinin, kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,1$) (95). Hepatit C pozitif hastalar üzerinde yapılan bir başka çalışmada GSH-Px enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre düşük olduğu, ancak GR enzim aktivitesinde bir artış olduğu bildirilmiştir (103). Karabulut ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; 1. grup kontrol, 2. grup akut hepatit C enfeksiyonlu hastalar, 3. grup tedavi görmemiş kronik hepatit C hastaları, 4. grup altı ay interferonla tedavi edilen hastalar olmak üzere farklı dört grupta SOD ve CAT enzim aktiviteleri çalışılmıştır. Akut hepatit C pozitif hastalarda SOD enzim

aktivitesi kontrol grubuna göre %19 daha yüksek, kronik hepatit C pozitif hastalarda SOD enzim aktivitesi %49 daha düşük, interferon tedavisi alan kronik hepatit C pozitif hastalarda ise %22 daha düşük olduğu rapor edilmiştir ($p < 0,005$). Kronik hepatit C pozitif hastalarda, CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre %13 daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir ($p \leq 0,005$). Akut hepatit C pozitif hasta ve kontrol grubu arasında CAT enzim aktivitesi bakımından bir farklılık olmadığı istatistiksel olarak rapor edilmiştir ($p > 0,005$). Akut hepatit C pozitif hastalarda CAT enzim aktivitesi, interferon tedavisi olan hastalara göre %15 daha düşük bulunmuştur (104). Karabulut ve arkadaşlarının akut hepatit C pozitif hastalarda CAT aktivitesinde elde ettiği sonuçla, bu çalışmada akut bir hastalık olan KKKA hastalarında elde edilen CAT aktivitesi sonuçları bir biriyle uyumludur. Ko ve arkadaşlarının (2005) kronik hepatit C pozitif hastalarda elde ettiği MDA ve SOD sonuçları, KKKA hastalarında bu çalışma ile elde edilen sonuçlarla paralellik gösterirken, GSH-Px ve GR sonuçları uyumlu bulunmadı. Araştırmacının da belirttiği gibi kandaki MDA düzeyi, GSH-Px ve GR enzim aktiviteleri, interferon/ribavirin tedavisinin sonucu olarak kişilere bağlı değişkenlik gösterebilmektedir. Ayrıca HCV enfeksiyonlarından etkilenen ve immün sistemde yer alan immüno stokinlerin, bu değişkenlerin bir başka nedeni olabileceği ifade edilmektedir (103). KKKA hastalarında CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik bulunmadı. SOD aktivitesinin artması, ancak CAT ve GSH-Px aktivitelerinin artmaması hücrelerde yüksek miktarda hidrojen peroksit birikmiş olabileceğini düşündürmektedir. Fazla hidrojen peroksitin bir kısmı hidroksil radikallerine dönüşerek oksidatif stresin artmasına neden olabilir. KKKA hastalarında serum ve eritrosit MDA düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek bulunması bu ihtimali desteklemektedir.

Andrades ve arkadaşları (2004) lethal ve non-lethal sepsislerde, oksidatif stres parametrelerindeki farklılıkları inceleyen bir araştırma yapmışlardır. Antioksidan enzimlerin düzenlenmesiyle ROT oluşumu ve ortamdan uzaklaştırılması arasındaki denge önemlidir. Süperoksit radikalleri SOD enzimi tarafından hidrojen peroksite dönüştürülür. Oluşan bu hidrojen peroksit ortamdan CAT enzimi tarafından uzaklaştırılır. Ortamdan uzaklaştırılmayan hidrojen peroksit molekülleri Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla hidroksil radikallerine dönüştürülebilir. Hidroksil

radikalleri oldukça toksik bileşiklerdir. Bu yüzden SOD/CAT enzimi arasındaki denge önemlidir. Bu iki enzim arasındaki denge, lethal sepsis sırasında, hücre hasarının oluşmasıyla ilişkili olabilir. Bu denge SOD/CAT oranının tespit edilmesiyle anlaşılabilir. Lethal sepsisli vakalarda 11 saat sonra SOD/CAT oranı majör organlarda önemli miktarda artar. Bunun aksine, non-lethal sepsisli vakalarda SOD/CAT oranı kalp ve akciğerde 24 saat sonra, böbrekte ise 96 saat sonra artar. Bu organlardaki artışın hiçbirinin lethal sepsislerinki kadar yüksek olmadığı, lethal ve non-lethal sepsiste oksidatif hasarın farklı olduğu, bunun da SOD/CAT oranıyla tespit edildiği rapor edilmiştir (105). Yapmış olduğumuz çalışmada KKKA hastalarında SOD aktivitesinin arttığı, CAT enziminin aktivitesinin artmadığı görüldü. Bu nedenle, yüksek bir SOD/CAT değeri elde edildi. Böylelikle, KKKA hastalarında hidrojen peroksitin bir kısmının hidroksil radikallerine dönüşerek doku ve hücre hasarına neden olduğu düşünülebilir. KKKA hastalarında SOD/CAT oranının daha geniş hasta gruplarında (yaş, cinsiyet, tedavi öncesi/ sonrası, tedavi sonrasında iyileşen ve hayatını kaybeden) araştırılmasının, hastalığın daha iyi anlaşılmasına ve tedavi sürecine katkıda bulunacağı açıktır.

KKKA hastalarında E vitamini düzeyinin kontrol grubuna göre düşük olduğu belirlendi (kontrol grubu $1,092 \pm 0,233$ mg/dl, hasta grubu $0,931 \pm 0,122$ mg/dl). İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,000$) (Tablo 9). Jordao ve arkadaşları AIDS'li hastalarda plazma E vitamini düzeyini, kontrol grubuna göre düşük, öte yandan idrar E vitamin metabolit düzeyinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir (106). Pacht ve arkadaşları önceden herhangi bir akciğer problemi olmayan 121 HIV pozitif hastada, bir yıl boyunca serum E vitamini düzeyini incelemişlerdir. İnsanlarda E vitamini düzeyi normalde $9,0 \pm 0,5$ µg/ml olmasına rağmen, bu hastaların %22,3'de 5 µg/ml'den daha düşük olduğu tespit edilmiştir. HIV pozitif 42 bireyde hastalığın başlangıcında ve 12 ay sonra serum E vitamini düzeyine bakılmış, 12 ayın sonunda önemli miktarda bir azalma olduğu tespit edilmiştir (98). Pacht, Jordao ve arkadaşlarının ADIS'li hastalarda elde ettikleri plazma E vitamini düzeyi ile KKKA hastalarından elde edilen E vitamini düzeyi birbiriyle uyumludur. KKKA hastalığına bağlı olarak E vitamini düzeyinde azalma olabileceği gibi, diyet ile alınması gerektiği göz önüne alınırsa, bu azalma yeteri kadar vitaminin alınıp alınmamasına da bağlı olabilir. Ayrıca Jordao ve

arkadaşlarının belirttiği gibi idrar yoluyla metabolit E vitamininin atılımına da bağlı olabilir. Pacht ve arkadaşlarının bildirdiği gibi serum E vitamin düzeyi viral enfeksiyona bağlı olarak azalmış da olabilir. KKKA hastalarında idrar ve plazma E vitamin düzeyinin araştırılmasının yararlı olacağı ileri sürülebilir. Meliva ve arkadaşları influenza virüsü enjekte ettikleri farelerde, lipid peroksidasyonunu ve E vitamini düzeyini belirlemişlerdir. Virüsün fareye enjeksiyonunu izleyen 5. ve 7. gün sonunda lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyinin arttığı ve E vitamini düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. Virüs enjekte edilmeden önce E vitamini verilmiş farelerde, aynı zaman periyodu sonunda lipid peroksidasyon ürünlerinin azaldığı ve E vitamin düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. Antioksidanlardan özellikle E vitamininin influenza virüs enfeksiyonuna karşı kanda ve akciğerde önemli bir koruyucu olduğu bilinmektedir (107). KKKA hastalarına tedavi esnasında E vitamini verilmesi faydalı olabilir. E vitamininin oral yolla verilmesi genellikle güvenlidir, ancak yüksek dozları nadir de olsa toksik olabilir ve parenteral tatbiki toksisite oluşturmaktadır. Yetişkinlere aşırı E vitamin verilmesinin çok sayıda yan etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Kanama eğilimini ve enfeksiyonu arttırdığından dolayı immün fonksiyonu bozar. Gereğinden az ya da fazla miktarları lökositlerin fonksiyonunu bozabilir (108).

KKKA hasta Oksidatif stresin neden olduğu lipid peroksidasyonunun son ürünü olan ve biyobelirteç olarak kullanılan plazma ve eritrosit MDA düzeylerinin hasta grubunda daha yüksek olduğu belirlendi (kontrol grubu plazma MDA düzeyi $0,4568 \pm 0,164 \mu\text{mol/L}$, hasta grubu $0,7837 \pm 0,196 \mu\text{mol/L}$; kontrol grubu eritrosit MDA düzeyi $0,2098 \pm 0,049 \mu\text{mol/gHb}$, hasta grubu $0,2940 \pm 0,044 \mu\text{mol/gHb}$). İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,000$) (Tablo 9). Kronik hepatit C'li hastalarda eritrosit MDA, HIV pozitif çocuklarda serum MDA, HIV/AIDS hastalarında plazma MDA, hepatit B pozitif hastalarda serum MDA'sının ve sepsis oluşturulan farelerin kolon, uterus ve karaciğer MDA düzeylerinin, kontrol grubuna göre, yüksek olduğu rapor edilmiştir (103, 109, 110, 111, 112). Yukarıda bahsedilen araştırmacıların viral ve sepsisli hastalarda yapmış oldukları çalışmalarda, oksidatif strese bağlı olarak meydana gelen ve lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeyinin, kontrol gruplarına göre yüksek olduğu görülmektedir. Bu araştırmacıların viral ve sepsisli hastalarda belirledikleri MDA düzeyi ile KKKA

hastalarının plazma ve eritrositlerinde tespit edilen MDA düzeyi birbiriyle uyumludur. Bu sonuçlardan yola çıkılarak oksidatif stresin KKKA hastalarında arttığı ileri sürülebilir. KKKA hastalarında yüksek ateş ve viral enfeksiyonun kendisi de oksidatif stresin artmasının nedeni olabilir.

Fagositik lökositlerde bol miktarda bulunan MPO enzimi en önemli oksidan kaynaklarından biridir. MPO enzimi tarafından oluşturulan hipoklorik asit klorinasyon/oksidasyonla çok sayıda biyomolekülleri etkileyebilir (113). KKKA hastalarında lökosit ve plazma MPO aktivitesi hasta grubunda, kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. Kontrol grubu lökosit MPO aktivitesi $0,486 \pm 0,114$ ng/ml/Lökosit, hasta grubu $0,790 \pm 0,290$ ng/ml/Lökosit bulundu. Kontrol grubu plazma MPO aktivitesi $44,836 \pm 9,711$ ng/ml, hasta grubu $57,623 \pm 8,846$ ng/ml. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 9). İşeri ve arkadaşları sepsis oluşturulan farelerin kolon, uterus ve karaciğer MDA düzeyinin kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğunu ($p < 0,01$), kolon ve karaciğer MPO enzim aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir ($p < 0,05$ - $p < 0,01$) (112). Altınyazar ve arkadaşları RAS hastalığında nötrofil MPO enzim aktivitesinde, kontrol grubuna göre önemli bir fark olmadığını rapor etmişlerdir (97). MPO'nun aktivite seviyesi fagositik lökositlerin aktive olmasıyla doğrudan ilişkilidir. İmmün sistem bakteri veya virüs tarafından uyarıldığında lökositlerin hem kemotaktik hem de fagositik aktiviteleri artar. Fagositoz sonrasında lökositler MPO ve NADPH oksidaz aracılığıyla büyük miktarda ROT artışına neden olur (97). Nötrofillerden toksik ajanların sızıntısı veya sekresyonu, yakın hücrelere ve solubl sistemlere zarar verir. Fagosit kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünosupresif ve mutajenik etkiler gösterirler.

In vitro yapılan bir çalışmada MPO tarafından üretilen oksidan türevlerinin doku ve hücre hasarına neden olduğu kanıtlanmıştır. Fagositler tarafından üretilen oksidan ürünleri iskemik reperfüzyon hasarı, solunum bozukluğu sendromu, glomerulonefrit, artrit peptik ülser oluşumu ve gastrik kanseri de içeren birçok inflamatuvar hastalıklarla ilişkilidir. Ancak miyeloperoksidazın bu hastalıkların patolojisine dolaylı bir katkısı olduğu sanılmaktadır (114). KKKA hastalarında elde edilen sonuçlarla İşeri ve arkadaşlarının sonuçları paralellik göstermektedir. Öte yandan, Altınyazar ve arkadaşlarının belirlemiş olduğu MPO enzim aktivitesi

sonuçlarıyla uyumlu değildir. MPO aktivitesi fagositik lökositlerin aktivasyonu ile doğrudan ilişkilidir. İmmün sistem bakteri veya virüs tarafından uyarıldığında hem kemotaktik hem de fagositik aktif lökositler artar. Altınyazar ve arkadaşlarının bildirdiğine göre; “RAS vakalarının nötrofillerinde MPO aktivitesinin normal düzeyde olmasının sebebi; fagositik aktif lökosit sayısının normal düzeyde olmasıdır.”(97).

Kaya ve arkadaşları koroner anjiyografide, koroner arter hastalığının yaygınlığı ile plazma MPO enzim aktivite düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Plazma MPO'su yüksek olan hastaların %50'sinde damar hastalığı saptanırken, plazma MPO'su normal olan hastaların hiç birinde damar hastalığı tespit edilmemiştir (115). KKKA hastalarında yapılan çalışmada plazma MPO enzim aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek bulundu. KKKA hastalarında plazma MPO aktivitesiyle, damar yapısı arasındaki ilişkinin nasıl olduğunun araştırılması önemli bir çalışma konusu olabilir.

Sonuç olarak; daha önce de belirtildiği gibi, oksidatif stresin doku ve hücre hasarına neden olması için; ya oksidanların üretiminin antioksidan kapasiteyi aşması ya da antioksidan sistemlerinin yetersiz kalması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında KKKA hastalarında SOD enziminin aktivitesinin arttığı, öte yandan CAT, GSH-Px ve GR enzim aktivitelerinin istatistiksel önemde değişmediği görüldü. E vitamini düzeyinin ise kontrol örneklerinden daha düşük olduğu tespit edildi. Öte yandan, oksidatif stresin artmasına neden olan MPO aktivitesinde kontrol grubuna göre bir artış olduğu saptandı. Bu çalışmada, KKKA hastalarında MPO, SOD aktiviteleri ve MDA düzeyinin anlamlı derecede yüksek bulunması, KKKA hastalarında serbest oksijen radikalleri, lipit peroksidasyonu ve nötrofil infiltrasyonundaki artışın bir yansıması olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, KKKA hastalarında viral yük ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi kesin olarak belirlemek için daha büyük örneklerden oluşan hasta grupları ile araştırmaların yapılması gerekmektedir.

KKKA hastalığının tedavisinde kullanılan yöntemlerden biri de destek tedavidir. Bu tedavi süresince hastalara kan transfüzyonu yapılmaktadır. Dolayısıyla yapılacak çalışmada tedavi öncesinde alınan kan örnekleri ile tedavi sonrasında alınan kan örneklerine bakılmasının daha ayrıntılı bilgi vereceği düşünülebilir. Tedavi sonrasında iyileşen hastalarla, iyileşmeyerek hayatını kaybeden hastaların

sonuçları karşılaştırılabilir. Bu çalışmada hasta grubunda sadece iki birey hayatını kaybettiğinden, elde edilen sonuçlar istatistiksel bir değerlendirme için yetersiz kaldı. Tedaviye cevap veren hastaların ancak uzun dönemli takipleriyle, ya da daha heterojen hasta gruplarını çalışmak suretiyle daha tutarlı sonuçlara ulaşılabilir. Ayrıca, oksidatif stresin KKKA patogenezindeki rolünü daha kapsamlı olarak değerlendirebilmek için, kullanılan tedavi yöntemleri sırasında antioksidan maddeler hastaya tatbik edilerek kontrollü çalışmalar yapılabilir.

Bu alışmada; Sivas ve evre illerde yaygın olarak görülen ve zamanla artış eğilimi gösteren KKKA vakalarında oksidan/antioksidan metabolizmasını inceledik. Oksidan-antioksidan denge KKKA hastalığında önemli rol oynayabilir. KKKA hastalarının prognozunu iyileştirmede antioksidan içeren diyetlerle beslemenin veya vücudun antioksidan içeren preparatlarla desteklenmesinin önemi ortaya çıkmaktadır. Özellikle E vitamini bu hastalarda düşük bulunduğundan diyetlerine eklenmesi tedaviye yardımcı olabilir.

6. KAYNAKLAR

- 1-Gürdöl F, Ademoğlu E. Biyokimya. Nobel kitapevleri 2006; (36) 829-835.
- 2-Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? Crit Care 2006; 10(1):208. Review
- 3- Özgöçmen S. Romatizmal Hastalıklarda Oksidatif Stresin Rolü. Türk Fiz Tıp Rehab Derg 2007; 53(2): 33-5
- 4- Altan N, Dinçel A. S, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem] 2006; 31 (2); 51-56.
- 5- Salim AS. Role of free radicals in gastrointestinal cancer. Singapore Med J. 1996; 37(3):295-8. Review
- 6- Günaydın B, Çelebi H. Genel anesteziğin serbest radikaller ve antioksidanlarla ilişkileri. Anestezi Dergisi 2003;11(2): 87-98
- 7- Cerne D, Lukac-Bajalo J. Oxidative stress assays for disease risk stratification. Acta Pharm 2006; 56(1): 1-17 (Review).
- 8- Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007; 292(5): 2023-31 (Review).
- 9- Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species and hypertension. Clinical implications and therapeutic possibilities. Diabetes Care (Suppl 2) 2008; 31: 170-80 (Review).
- 10- Bakır M. Kırım-Kongo hemorajik ateşi. Ankem Derg 2004; 18: 90-93
- 11- www.saglik.gov.tr
- 12- Ergönül O. Crimean-Congo hemorrhagic fever. Lancet Infect Dis 2006;(4):203-214
- 13- Chris A. Whitehouse Crimean-Congo hemorrhagic fever. Antiviral Research 2004; 64(3): 145-160
- 14- Mardani M, Keshtkar-Jahromi M. Crimean-Congo hemorrhagic fever. Arch Iran Med 2007; 10(2): 204-14

- 15- Karti SS, Odabasi Z, Korten V, Yilmaz M, Sonmez M, Caylan R, Akdogan E, Eren N, Koksali I, Ovali E, Erickson BR, Vincent MJ, Nichol ST, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(8): 1379-84
- 16- Acar A. Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni* 2006; 5(4): 287-295 (derleme).
- 17- Simon M, Falk K.I, Lundkvist A, Mirazimi A. Exogenous nitric oxide inhibits Crimean ongo hemorrhagic fever virus. *Virus Research* 2006; (120): 184–190
- 18- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs208/en/>
- 19- vatansev@veterinary.ankara.edu.tr
- 20- Ergönül O. Kırım Kongo kanamalı ateşi. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 2006; 15(6): 98
- 21- Elaldı N. Kırım-Kongo hemorajik ateş epidemiyolojisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2004; 26(4): 185–190
- 22- Ergonul O, Zeller H, Kilic S, Kutlu S, Kutlu M, Cavusoglu S, Esen B, Dokuzoguz B. Zoonotic infections among veterinarians in Turkey: Crimean-Congo hemorrhagic fever and beyond. *Int J Infect Dis* 2006; 10(6): 465-9
- 23- Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Possible Horizontal Transmission of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus from a Mother to Her Child. *Jpn. J. Infect. Dis* 2004;57: 55-57
- 24- Mehrabi-Tavana A, Chinikar S, Mazaheri V. The seroepidemiological aspects of Crimean-Congo hemorrhagic fever in three health workers: A report from Iran. *Arch Iranian Med* 2002; 5(4): 255–258
- 25- Kara A. Kırım Kongo hemorajik ateşi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2006; 49: 175–184
- 26- Lupi O, Tyring SK. Tropical dermatology: viral tropical diseases. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49(6): 979-1000

- 27- Bakır M, Elaldı N. Kırım-Kongo hemorajik ateşi. *Ankem Derg* 2006; 20(Ek 2): 227-231
- 28- Ergonul O. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:203-14
- 29- Ozkurt Z, Kiki İ, Erol S, Erdem F, Yılmaz N, Parlak M, Gundogdu M, Tasyara MA. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Eastern Turkey: clinical features, risk factors and efficacy of ribavirin therapy. *Journal of infection* 2006; 52: 207-215
- 30- Ergönül O, Çelikbaş A, Dokuzoğuz B, Eren S, Baykam N, Esener H. Characteristics of patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in a recent outbreak in Turkey and impact of oral ribavirin therapy. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39: 284-7
- 31- Karti SS, Odabasi Z, Kortten V, Yılmaz M, Sonmez M, Caylan R, Akdogan E, Eren N, Koksall I, Ovali E, Erickson BR, Vincent MJ, Nichol ST, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG. Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey. *Emerging Infectious Diseases* 2004; 10(8): 1379-84
- 32- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95 (Review).
- 33- Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem]* 2006; 31(2); 51-56 (Review).
- 34- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza yayınları* 1995; 13-14
- 35- Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stres. *Med Sci Monit* 2004; 10(6): 141-147 (Review).
- 36- Smith C, Mark AD, Lieberman M, çeviri editörleri; İnal ME, Atik U, Aksoy N, Haşimi A. *Temel Tıbbi Biyokimya. Güneş Tıp Kitapevleri* 2007; 439-449
- 37- Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33(2): 110-18

- 38- Ungvári Z, Gupte SA, Recchia FA, Bátkai S, Pacher P. Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3(3): 221-9 (Review).
- 39- Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi (Office Journal of the Turkish Nephrology, Association)* 1997; 3(4): 92-95
- 40- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; (338): 668–676 (Review).
- 41- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. *Ann Bot (Lond)* 2003; (91): 179-94 (Review).
- 42- Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta* 2007; (380): 50–58.
- 43- Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, Evans TW. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J.* 1998;11(3): 745-57 (Review).
- 44- Yazıcı C, Köse K. Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (E.Ü. Journal of Health Sciences)* 2004; 13(2): 56-65.
- 45-102- Igor N, Zelko I. N, Mariani T. J, Folz R. J. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), AND EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 33(3) :337–349 (Review).
- 46- Stefan I, Liochev SI, Fridovich I. The effects of super oxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radical Biology & Medicine* 2007; (42): 1465–1469 (Review).
- 47- Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Nov 1;89(21):10405-9.
- 48- Ricard A, Fridovich W I. Superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry* 1973; (248) 3582-3592

- 49- Hayakawa T, Kanematsu S, Asada K. Purification and characterization of thylakoid-bound Mn-superoxide dismutase in spinach chloroplasts. *Planta* 1985; (166) 111-116
- 50- Ścibior D, Czczot H. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw* 2006; 60: 170-180 (Review).
- 51- Chelikani P, Ramana T, Radhakrishnan T. M. Catalase: A repertoire of unusual features. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2005; 20 (2): 131-135
- 52- Menteş G, Ersöz B. Harper'ın Biyokimyası. Barış kitap evi. 1993 : (13) 142
- 53- Çimen Ç, Öter Ç, Demir H, Savran A. Rat eritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi. *YYÜ Vet. Fak. Derg* 2005; 16 (1): 15-20
- 54- Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR. Seleno-independent glutathione peroxidases More than simple antioxidant scavengers. *FEBS Journal* 274 2007; 2163–2180 (Review).
- 55- Jose M, Mates J.M, Perez-Gomez C, Blanca M. Chemical and biological activity of free radical 'scavengers' in allergic diseases. *Clinica Chimica Acta* 2000; (296): 1–15 (Review).
- 56- Rahman Q, Abidi P, Afaq F, Schiffmann D, Mossman BT, Kamp DW, Athar M. Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Critical Reviews in Toxicology* 1999; 29(6):543–568
- 57- Regina BF, Maret GT. Vitamin E: function and metabolism. *The Faseb Journal* 1999; (13): 1145-1155
- 58- Liu Q, Lanari MC, Schaefer DM. A review of dietary vitamin E supplementation for Improvement of beef quality. *J. Anim. Sci* 1995; (73): 3131–3140
- 59- Bjørneboe A, Bjørneboe GE, Drevon CA. Absorption, transport and distribution of, vitamin E. *J Nutr* 1990; 120(3): 233-42 (Review).
- 60- Olsson I, Bulow E, Hansson M. Biosynthesis and sorting of myeloperoxidase in hematopoietic cells. *Jpn J Infect Dis* 2004; 57(5): 13-4.

- 61- Wright J, Bastian N, Davis TA, Zuo C, Yoshimoto S, Orme-Johnson WH, Tauber AI. Structural characterization of the isoenzymatic forms of human myeloperoxidase. Evaluation of the Iron-Containing Prosthetic Group Blood 1990; (75): 238-241
- 62- Zederbauer M, Furtmüller PG, Ganster B, Mognilevsky N, Obinger C. The vinyl-sulfonium bond in human myeloperoxidase: impact on compound I formation and reduction by halides and thiocyanate. Biochem Biophys Res Commun 2007; 356(2): 450-6.
- 63- Miyasaki KT, Zambon JJ, Jones CA, Wilson ME. Role of high-avidity binding of human neutrophil myeloperoxidase in the killing of actinobacillus citinomycetemcomitans. Infection and Immunity 1987; 55 (5): 1029-1036
- 64- But PG, Fomina VA, Murav'ev RA, Rogovin VV. Myeloperoxidase from neutrophil peroxisomes biology bulletin 2003; (30): 207–211
- 65- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. Leukoc Biol 2005; 77(5): 598–625.
- 66- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. The Journal of The American Society of Hematology 1998; 92(9): 3007-3017
- 67- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. Journal of Bacteriology 1968; 2131-2138
- 68- Louise ED, Nigel BR, Stephen M, Jennifer RA, Gar LO, Panagiotis K, Graham WT, John M. Arginine-specific mono (ADP-ribosyl) transferase activity on the surface of human polymorphonuclear neutrophil leucocytes. Biochem. J 1996; (315); 635-641
- 69- David BW, Robery TM. Stimulation of staphylococcal and micrococcal growth in milk of lysed leukocytes. Journal of Dairy Science 1970; 54(10): 1417-21
- 70- Nybo M, Sørensen O, Leslie R, Wang P Reduced expression of C5a receptors on neutrophils from cord blood. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1998; 78(2): 129-32
- 71- www.caymanchem.com

72- <http://www.nwlifescience.com/>

73- Martinek RG. Method for the determination of vitamin E (total tocopherols) in serum. Clin Chem 1964; (10): 1078–86

74- Jain SK, Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. Biochim. Bioph. Acta 1988; (937): 205-210

75- Tasdelen-Fisgin N, Fisgin T, Tanyel E, Doganci L, Tulek N, Güler N, Duru F. Crimean-Congo hemorrhagic fever: Five patients with hemophagocytic syndrome. Am. J. Hematol 2008; (83): 73–76

76- Connolly-Andersen AM, Magnusson KE, Mirazimi A. Basolateral entry and release of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in polarized MDCK-1 cells. J Virol 2007; 81(5): 2158-64

77- www.abveteriner.org

78- Kaya S, Sütücü R, Sesli-Çetin E, Yılmaz N, Arıkan S, Cicioğlu-Aridoğan B, Delibaş N. Hepatit B virus ile enfekte hastalarda viral yük ile lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzimler arasındaki ilişki. Türk Klinik Biyokimya Derg 2006; 4(2): 77-82

79- Cherian S, Jameson S, Rajarajeswari C, Helena V, Latha L, Anu Rekha MR, Nagamma T, Subba Raju V, Kini PG, Rao A. Oxidative stress in sepsis in children. Indian J Med Res 2007; 125(2): 143-8

80- Durak I, Kavutcu M, Çimen M.Y. B, Avcı A, Elgün S, Öztürk HS. Oxidant/Antioxidant status of erythrocytes from patients with chronic renal failure: Effects of Hemodialysis. Med Principles Pract 2001; (10): 187–190

81- Kapoor K, Basu S, Das BK, Bhatia BD. Lipid peroxidation and antioxidants in neonatal septicemia 2006; 52(5): 372-5

82- Kiriş I, Okutan H, Savaş C, Yonden Z, Delibas N. Deneysel aortik iskemi-reperfüzyon modelinde renal hasara gadolinyum klorürün etkisi. Turkish J Vasc Surg 2005; 14 (2): 13-18

83- Dominguez-Rodriguez A, Samimi-Fard S, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez MJ, Kaski JC. Prognostic value of admission myeloperoxidase levels in patients with

ST-segment elevation myocardial infarction and cardiogenic shock. *The American Journal of Cardiology* 2008;101(11): 1537-1540

84- Bilici M, Efe H, Koroğlu MA, Uydu HA, Bekaroğlu M, Değer O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 2001;64(1): 43-51

85- Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Journal of The American Heart Association* 2003; 41(5): 1096-101

86- Yilmaz S, Ozan S, Benzer F, Canatan H. Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. *Cell Biochem Funct* 2003; 21(4): 325-30

87- Abraham S, Soundararajan CC, Vivekanandhan S, Behari M. Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease. *Indian J Med Res* 2005; (121): 111-115

88- Matés JM, Segura JM, Pérez-Gómez C, Rosado R, Olalla L, Blanca M, Sánchez-Jiménez FM. Antioxidant enzymatic activities in human blood cells after an allergic reaction to pollen or house dust mite. *Blood Cells Mol Dis* 1999; 25(2): 103-9

89- Topdag S, Aslaner A, Tataroglu C, Ilce Z. Evaluation of antioxidant capacity in lung carcinoma. *IJTCVS* 2005; (21): 269–271

90- Kharrazi H, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavilani H, Aminian M, Pourmotabbed T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin Biochem* 2008; 41(12): 932-6

91- Peterhans E. Oxidants and antioxidants in viral diseases: disease mechanisms and metabolic regulation. *J Nutr (5 Suppl)* 1997; 127(5): 962-965 (Review).

92- Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32(8): 595-603 (Review).

93- Andresen HM, Regueira HT, Leighton F. Oxidative stress in critically ill patients. *Rev Med Chil* 2006; 134(5): 649-56 (Review).

- 94- Gil L, Martínez G, Tápanes R, Castro O, González D, Bernardo L, Vázquez S, Kourí G, Guzmán MG. Oxidative stress in adult dengue patients. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71(5): 652-7
- 95- Look MP, Rockstroh JK, Rao GS, Kreuzer KA, Barton S, Lemoch H, Sudhop T, Hoch J, Stockinger K, Spengler U, Sauerbruch T. Serum selenium, plasma glutathione (GSH) and erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px)-levels in asymptomatic versus symptomatic human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infection. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51(4): 266-72
- 96- Czuczejko J, Zachara BA, Staubach-Topczewska E, Halota W, Kedziora J. Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. *Acta Biochim Pol* 2003; 50(4): 1147-54
- 97- Altinyazar HC, Gurel A, Koca R, Armutçu F, Unalacak M. The Status of Oxidants and Antioxidants in the Neutrophils of Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis. *Turk J Med Sci* 2006; (36): 87-91
- 98- Pacht ER, Diaz P, Clanton T, Hart J, Gadek JE. Alveolar fluid glutathione decreases in asymptomatic HIV-seropositive subjects over time. *J Lab Clin Med* 1997; 112(3): 785-8.
- 99- Zablocka A, Janusz M. The two faces of reactive oxygen species. *Postepy Hig Med Dosw* 2008; (62): 118-124 (Review).
- 100- Manfredini V, Lazzaretti LL, Griebeler IH, Santin AP, Brandão VD, Wagner S, Castro SM, Peralba Mdo C, Benfato MS. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *J Natl Med Assoc* 2008; 100(8): 897-902
- 101- Ayar-Kayalı H, Tarhan L. The effect of cultural conditions on the variations of SOD, CAT and GSH-Px activities and LPO Levels in the filamentous fungus *fusarium quiseti*. *Turk J Chem* 2004; (8): 213-22
- 102- Parihar A, Parihar M. S, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns* 2008; 34 (1): 6-17 (Review).

- 103- Ko WS, Guo CH, Yeh MS, Lin LY, Hsu GS, Chen PC, Luo MC, Lin CY. Blood micronutrient, oxidative stress, and viral load in patients with chronic hepatitis C. *World J Gastroenterology* 2005; 11(30): 4697-702
- 104- Karabulut A. B, Sönmez E, Bayındır Y, Gözükara E. A Comparison of Erythrocyte Superoxide Dismutase and Catalase Activity in Patients With Hepatitis C Infection. *Turk Med Sci* 2002; (32): 313-316
- 105- Andrades M, Ritter C, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Oxidative parameters differences during non-lethal and lethal sepsis development. *Journal of Surgical Research* 2005; (125): 68–72
- 106- Jordão AA, Silveira S, De Castro F. J. F, Vannucchi H. Urinary excretion and plasma vitamin E levels in patients with AIDS nutrition. *The International Journal of Applied and Basic Nutritional Sciences* 1998; (14): 423-426
- 107- Mileva M, Bakalova R, Tancheva L, Galabov A, Ribarov S. Effect of vitamin E supplementation on lipid peroxidation in blood and lung of influenza virus infected mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2002; 25(1): 1-11.
- 108- Bell EF. History of vitamin E in infant nutrition. *Am J Clin Nutr (Suppl 1)* 1987; (46): 183-6
- 109- Kılıç N, Kalkan A, Özdemir, Denk A. HBeAg Pozitif Kronik Hepatit B Olgularında Serum Malondialdehit Düzeyinin Karaciğer Histopatolojisi ve İnterferon Tedavisi ile İlişkisi. *İnfeksiyon Dergisi* 2005; 19 (1): 5-9
- 110- Jareño EJ, Bosch-Morell F, Fernández-Delgado R, Donat J, Romero FJ. Serum malondialdehyde in HIV seropositive children. *Free Radic Biol Med* 1998; 24(3): 503-6
- 111- Gil L, Martínez G, González I, Tarinas A, Alvarez A, Giuliani A, Molina R, Tápanes R, Pérez J, León OS. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol Res* 2003; 47(3): 217-24
- 112- İseri SO, Sener G, Saglam B, Gedik N, Ercan F, Yegen BC. Oxytocin Protects Against Sepsis-Induced Multiple Organ Damage: Role of Neutrophils. *Journal of Surgical Research* 2005; (126): 73–81

113- Spickett CM, Jerlich A, Panasenko OM, Arnhold J, Pitt AR, Stelmaszyńska T, Schaur RJ. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol* 2000; 47(4): 889-99 (Review).

114- Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 2000; 7(1): 53-8 (Review).

115- Güngör-Kaya M, Yalçın R, Okyay K, Poyraz F, Bayraktar N, Timurkaynak T, Özdemir M, Cemri M, Abacı A, Boyacı B, Demirkan D, Çengel A. ST Yükselmesi olan akut miyokart infarktüsünde plazma miyeloperoksidaz enzim düzeyleri ile kronik arter hastalığı yaygınlığı ve erken prognoz ilişkisi. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2005; 3(3): 27-31