

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**YOĞUN BAKIMDA MEKANİK VENTİLASYON
UYGULANAN HASTALARDA OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİ İLE PROLİDAZ ENZİM DÜZEYİ
DEĞİŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Erdoğan DURAN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Zeynep BAYSAL

Yrd. Doç. Dr. Şaban YALÇIN

ŞANLIURFA
2010

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**YOĞUN BAKIMDA MEKANİK VENTİLASYON
UYGULANAN HASTALARDA OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİ İLE PROLİDAZ ENZİM DÜZEYİ
DEĞİŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Erdoğan DURAN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Zeynep BAYSAL

Yrd. Doç. Dr. Şaban YALÇIN

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Kurulu (HÜBAK) tarafından 867 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA
2010

TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başlamamda beni teşvik edip yönlendiren, bilgi ve deneyimleriyle eğitimime yaptıkları katkılarından dolayı hocam Doç. Dr. Mustafa CENGİZ'e, uzmanlık eğitimim süresince samimiyetini esirgemeyen, tezimin konusunun seçimine ve hazırlanmasına yardımcı olan tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Zeynep BAYSAL'a, tezimin her aşamasında emeği ve katkısı olan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi hocamız Prof. Dr. Nurten AKSOY'a içtenlikle teşekkür ederim. Bölümden ayrılıncaya kadar gerek mesleki tecrübeme gerekse hayata bakış açımın katkılarında dolayı hocam Yrd. Doç. Dr. Cengiz MORDENİZ'e teşekkür ederim.

Yrd. Doç. Dr. Zeynep BAYSAL ve Yrd. Doç. Dr. Cengiz MORDENİZ hocalarımızın Anabilim Dalı'ndan ayrılması sonrası uzmanlık tezimi bitirmeme yardımcı olan, mesleki tecrübeleriyle eğitimime yaptığı katkılarında ve desteklerinden dolayı başta Anabilim Dalı Başkanımız Yrd. Doç. Dr. Şaban YALÇIN'a ve Yrd. Doç. Dr. Harun AYDOĞAN'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez numunelerimin hazırlanması ve depolanmasında emeği geçen yoğun bakım sorumlu hemşireleri Fatma KAYAOĞLU ve Zühal RÜZGAR'a, Biyokimya laboratuvarı çalışanları Necla ÇELİK, Tevhide ARABACI'ya, tezimin hazırlanması ve istatistiksel analizinde değerli katkıları olan Öğr. Gör. Hakim ÇELİK'e ve Biyolog kardeşim Abdullah TAŞKIN'a ve güler yüzlerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli biyokimya laboratuvarı çalışanlarına; araştırma görevliliğimin her aşamasında resmi yazışmalar ve daha bir çok konuda, engin bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bizlere yardımcı olan, değerli personel şubesi çalışanlarından abimiz Murad ALKAN'a, Tevrat ZERAY'a ve Mehmet YÜKSEKYAYLA'ya şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim ve hayatım boyunca fedakarlıkları, anlayışları ve sabırları için başta annem ve babam olmak üzere, ailemin tüm fertleri, değerli eşim ve uzun nöbetlerimde şevkatimi ve ilgimi esirgemek zorunda kaldığım biricik kızıma da minnet ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Erdoğan DURAN

Haziran 2010

ŞANLIURFA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
KISALTMALAR	vii
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Yoğun Bakımın Tanımı, Tarihçesi ve Özellikleri	2
2.1. 1. Tanım	2
2.1. 2. Tarihçe	2
2.1. 3. Yoğun Bakım Ünitelerinin Özellikleri	3
2.2. Mekanik ventilasyon	3
2.2.1. Tanım	3
2.2.2. Tarihçe	3
2.2.3. Mekanik ventilasyon tedavisi gereken durumlar	5
2.2.4. Ventilatör seçimi ve kullanımı	8
2.2.4.1. Negatif basınçlı ventilatörler	8
2.2.4.2. Pozitif basınçlı ventilatörler	8
2.2.5. Mod seçimi ve ventilasyon modları	9
2.2.5.1. Kontrollü ventilasyon (KMV)	9
2.2.5.2. Asiste ventilasyon (ASV) veya asiste kontrollü ventilasyon	10
2.2.5.3. Senkronize aralıklı zorunlu ventilasyon (SIMV)	10

2.2.5.4. Basınç kontrollü ventilasyon (PCV)	10
2.2.6. Mekanik ventilasyon komplikasyonları	11
2.3. Serbest radikaller	13
2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri	13
2.3.1.1. Süperoksit Radikalleri (O_2^-)	14
2.3.1.2. Hidroksil Radikalleri (HO^\cdot)	15
2.3.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	17
2.3.1.4. Hipoklorik Asit (HOCl)	17
2.3.1.5. Singlet O_2 ($O_2^{\uparrow\downarrow}$)	18
2.3.2. Reaktif Nitrojen Türleri (NO , NO_2 , NO^+ , NO^-)	18
2.3.3. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları	19
2.3.4. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri	23
2.3.4.1. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri	24
2.3.4.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	25
2.3.4.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri	25
2.3.4.4. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri	25
2.3.5. Antioksidan Savunma Sistemleri	27
2.3.6. Total Oksidatif Stres (TOS)	35
2.3.7. Total Antioksidan Status (TAS)	35
2.3.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)	36
2.4. Prolidaz	36
2.4.1. Prolidazın Tanımı	36
2.4.2. Prolin	36
2.4.3. Prolidazın Yapısı	38
2.4.4. İnsan Prolidazının Primer Yapısı ve Gen Lokalizasyonu	39
2.4.5. Prolidazın İzoenzimleri	39
2.4.6. Prolidaz İnhibitörleri ve Aktivatörleri	40
2.4.7. Prolidazın Kollajen Yapım ve Yıkımında Önemi	41
3. MATERYAL METOD	44
3.1. Hasta Seçimi	44
3.2. Çalışma Dışı Bırakma Kriterleri	44
3.3. Demografik Veriler	44

3.4. Yoğun Bakımda Hasta ve Mekanik Ventilator Hazırlığı	45
3.5. Kullanılan Araç ve Gereçler	46
3.6. Kullanılan Kimyasal Maddeler	47
3.7. Prolidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	48
3.7.1. Serum Prolidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	
(Modifiye(Optimize)Chinard Metodu)	49
3.7.1.1. Prolidaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Ayraçlar	49
3.8. Prolidaz Aktivitesinin Hesaplanması	50
3.9. Total Antioksidan Kapasite (TAK)	51
3.10. Total Oksidant Seviye (TOS)	52
3.11. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	52
3.12. Yapılan İstatistiksel Analizler	52
4. BULGULAR	53
4.1. Demografik Veriler	53
4.2. Hastaların Yoğun Bakımdaki 1, 3, 5, 7. Gün BAL ve Serumlarındaki TAS, TOS, OSİ ve Prolidaz Seviyelerindeki Değişiklikler	56
4.2.1. Serum TAS Değerleri	56
4.2.2. Serum TOS Değerleri	57
4.2.3. Serum OSİ Değerleri	58
4.2.4. Serum Prolidaz Değerleri	59
4.2.5. BAL TAS Değerleri	60
4.2.6. BAL TOS Değerleri	61
4.2.7. BAL OSİ Değerleri	62
4.2.8. BAL Prolidaz Değerleri	63
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ	73
7. KAYNAKLAR	75

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. MV endikasyonu koyabilmek için kullanılan ölçümler	7
Tablo 2. Oksijen türevi bileşikler	14
Tablo 3. Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler	21
Tablo 4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
Tablo 5. Hastaların serum prolidaz ve serum Oksidan/Antioksidan parametreleri	54
Tablo 6. Hastaların BAL prolidaz ve BAL Oksidan/Antioksidan parametreleri	55

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kontrollü mekanik ventilasyon	9
Şekil 2. Basınç kontrollü ventilasyon	11
Şekil 3. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS ve RNS) vücuttaki etkileri	23
Şekil 4. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum TAS'ları arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları	56
Şekil 5. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum TOS'ları arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları	57
Şekil 6. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum OSİ'leri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları	58
Şekil 7. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum prolidaz aktiviteleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları	59
Şekil 8. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL TAS'ları arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları	60
Şekil 9. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL TOS'ları arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları	61
Şekil 10. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL OSİ'leri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları	62
Şekil 11. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL prolidaz aktiviteleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları	63

KISALTMALAR

Ag	Gümüş
ARDS	Akut respiratuar distres sendromu
ARY	Akut respiratuar yetmezlik
ASV	Asiste ventilasyon
ATP	Adenozin tri fosfat
BAL	Bronko alveolar lavaj
b -FGF	Fibroblast büyüme faktörü
Cd	Kadmiyum
cGMP	Siklik guanozin mono fosfat
Co	Kobalt
CO	Kardiak out-put
Cu	Bakır
CVP	Santral venöz basınç
DEAE	Dietil aminetik selüloz
DNA	Deoksi ribonükleik asit
ETS	Elektron transport sistemi
ETZ	Elektron transport zinciri
Fe	Demir
GAG	Glikozaminoglikan
Gly-pro	Glisil-Prolin
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutation peroksidaz
GSH-Rd	Glutation redüktaz

HCl	Hidroklorik asit
Hg	Civa
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HNO₃	Nitrik asit
HO·	Hidroksil radikali
HOCl	Hipoklorik asit
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	İnterlökin
kDa	Kilo Dalton
KMV	Kontrollü mekanik ventilasyon
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
M.Ö.	Milattan önce
MIP	Maksimum inspiratuar basınç
MMP	Matriks metalloproteinaz
Mn	Mangan
MnCl₂	Mangan klorür
Mrna	Haberci ribonükleikasit
MV	Mekanik Ventilasyon
NAD	Nikotinamid dinükleotid
NADH	Nikotinamid dehidrogenaz
Ni	Nikel
NO	Nitroz oksit
NOS	Nitrik oksit sentetaz
N₂O₃	Dinitrojen trioksit
ONOOH	Oksidan peroksinitrit

OSI	Oksidatif stres indeksi
O²	Dioksijen
O^{2·}	Süperoksit radikali
PaO₂	Parsiyel oksijen basıncı
PaCO₂	Parsiyel karbondioksit basıncı
Pb	Kurşun
PCV	Basıncı kontrollü ventilasyon
PEP	Pik ekspiratuar basınç
PEEP	Ekspiryum sonu pozitif basınç
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PG	Prosto glandin
PLGSH-Px	Fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaz
PML	Polimorfonükleer lökosit
PO₂	Oksijen basıncı
RNA	Ribonükleik asit
RO·	Alkoksil radikali
ROO·	Peroksil radikali
RNS	Reaktif nitrojen türevleri
ROS	Reaktif oksijen türevleri
RSO₂·	Oksi-sülfür radikali
RS·	Tiol radikali
SIMV	Synchronized intermittent mandatory ventilation
SOD	Süperoksit dismutaz
SVO- İ	Serebro vasküler olay-iskemi
SVO- K	Serebro vasküler olay- kanama

TAK	Total antioksidan kapasite
TAS	Total antioksidan seviye
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TMPI	Doku metallo proteinaz inhibitörü
TNF	Tümör nekrotizan faktör
Toc-OH	Tokoferol
TOS	Total oksidan seviye
VT	Tidal volüm
XDH	Ksantin dehidrogenaz
XOD	Ksantin oksidaz
Zn	Çinko

ÖZET

Yoğun Bakımda Mekanik Ventilasyon Uygulanan Hastalarda Oksidatif Stres Parametreleri ile Prolidaz Enzim Düzeyi Değişiminin Araştırılması

Dr.Erdoğan DURAN

Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

Mekanik ventilasyon (MV) tedavisi, akciğerlerin o anki durumu ve ventilatördeki kalış süresi ile korele olarak akciğerlerde oksidatif stresi artırabilir. Ortaya çıkan oksidatif stres, akciğerlerde ekstraselüler matriksin önemli komponenti olan kollajeni etkileyerek kollajen hasarına neden olabilir. Bu çalışmada, MV uygulanan hastalarda, serum ve bronkoalveolar lavaj (BAL)‘da total oksidatif ve antioksidatif durumu tesbit ederek, oksidatif hasarın MV’ye bağlı olarak akciğer dokusunda bir kollajen hasarı yapıp yapmadığı, akciğerlerde bir kollajen hasarı varsa bunun biyokimyasal göstergelerinden biri olan prolidaz enzim düzeyini nasıl etkilediği araştırıldı.

Çalışmaya yoğun bakımda yatmakta olup 30 – 70 yaş arası primer akciğer patolojisi düşünülmeyen, serebrovasküler olay - iskemi (SVO – İ) ve serebrovasküler olay - kanama (SVO – K)’ya bağlı solunum yetmezliği tanısı alıp MV tedavisi gören 26 erişkin hasta dahil edildi. Hastalardan 1- 3- 5- 7. günlerde alınan kan ve BAL örneklerinde, oksidatif stres seviyelerinin belirlenmesi için total oksidan seviye (TOS), antioksidan kapasitenin belirlenmesi için total antioksidan seviye (TAS) tam otomatik kolorimetrik yöntemle sonuç veren REL[®] Assay ticari kitleriyle ve prolidaz enzim aktivitesi fotometrik bir metod olan Modifiye Chinard Yöntemi ile çalışıldı. TOS/TAS oranı hesaplanarak oksidatif stres indeksi (OSI) bulundu.

Hastaların yoğun bakımda kalış süreleri ve MV’ye bağlı kaldıkları süre uzadıkça serum TAS değerlerinin anlamlı olarak ($p < 0,001$) düştüğü (1. gün değeri: $1,02 \pm 0,31$ mmol Troloks Eqv./L, 7. gün değeri: $0,72 \pm 0,16$ mmol Troloks Eqv./L), serum TOS ve OSI değerlerinin anlamlı şekilde ($p < 0,01$) arttığı (1. gün TOS değeri: $17,26 \pm 3,87$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L, 7. gün TOS değeri: $26,91 \pm 7,01$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L, 1. gün OSI değeri: $1,81 \pm 0,60$ AU, 7. gün OSI değeri: $3,87 \pm 1,22$ AU), serum prolidaz seviyesinin anlamlı olarak ($p < 0,001$) arttığı (1. gün değeri: $682,31 \pm 11,73$ U/L, 7. gün değeri: $699,95 \pm 10,48$ U/L), BAL TAS değerlerinin anlamlı olarak ($p < 0,001$) azaldığı (1. gün değeri: $1,14 \pm 0,34$ mmol Troloks Eqv./L, 7. gün değeri: $0,86 \pm 0,19$ mmol Troloks Eqv./L), BAL TOS ve OSI değerlerinin anlamlı olarak (p

<0,001) arttığı (1. gün TOS değeri: 45,84±15,79 µmol H₂O₂ Eqv./L, 7. gün TOS değeri: 60,62±14,93 µmol H₂O₂ Eqv./L, 1. gün OSİ değeri: 4,25±1,60 AU, 7. gün OSİ değeri: 7,17±1,55 AU), BAL prolidaz seviyesin anlamlı olarak (p <0,001) azaldığı (1. gün değeri: 2560±434 U/L, 7. gün değeri: 2122±260 U/L) tesbit edildi.

Sonuç olarak, yoğun bakım hastalarında MV'ye bağlı oksidatif hasarlanma sonucu, MV süresi ile doğru orantılı olarak hem serum hem de BAL'da TOS ve OSİ değerlerinin yükselmesi, TAS değerlerinin düşmesi MV uygulamasının şiddetli oksidatif stres oluşturduğunu ve ayrıca prolidaz enzim aktivitesinin anlamlı ölçüde değişikliğe uğramasında bu uygulamanın kollajen metabolizmasını da değiştirdiğini göstermiş oldu. Fakat daha yoğun ve detaylı ileri çalışmalarda hem doku hem de kanda oksidatif stresin azaltılması ve antioksidan savunma mekanizmalarının güçlendirilmesi ile MV'ye bağlı patolojilerin azaltılmasını hedefleyen daha kapsamlı ve yoğun çalışmalarla bu hipotezimizin güçlendirilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mekanik ventilasyon, yoğun bakım, reaktif oksijen türevleri, oksidatif stres, antioksidanlar, prolidaz.

ABSTRACT

Investigation of Oxidative Stress Parameters and Prolidase Enzyme Activity Changes in Mechanically Ventilated Intensive Care Patients

Dr. Erdoğan DURAN

Anesthesiology and Reamination Expertise Thesis

Mechanical ventilation may increase oxidative stress of the lung as correlated with the lung's present state and mechanical ventilated period. The occurred oxidative stress may cause collagen damage, that protein is a significant constituent of extracellular matrix in the lung. In this study, we aimed to show total oxidative and anti-oxidative status, and prolidase enzyme activity which represents the alterations of collagen metabolism caused by the oxidative stress in blood and bronchoalveolar lavage (BAL) of mechanically ventilated intensive care patients.

26 adult patient with (mean age $64,3 \pm 14,1$) respiratory failure who was followed in intensive care unit with the diagnosis of cerebrovascular event- ischemia, cerebrovascular-event hemorrhage without primary lung pathology were included in the study. Total oksidative status (TOS) and total antioksidative status (TAS) with a full automatic colorometric method (REL[®] Assay Diagnostics) and prolidase enzyme activity with a photometric Chinard method manually were studied in blood and bronchoalveolar lavage samples taking in 1.- 3. 5.- 7. days of intensive care. Taking the ratio of TOS to TAS oksidative stress index (OSI) were found.

Serum TAS results were significantly ($p < 0,001$) decreased (1. day: $1,02 \pm 0,31$ mmol Troloks Eqv./L, 7. day: $0,72 \pm 0,16$ mmol Troloks Eqv./L), TOS and OSI and prolidase enzyme activity were significantly ($p < 0,01$ - $p < 0,001$) increased (1. day TOS: $17,26 \pm 3,87$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L, 7.day TOS: $26,91 \pm 7$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L, 01, 1. day OSI: $1,81 \pm 0,60$ AU, 7. day OSI: $3,87 \pm 1,22$ AU, 1. day prolidase: $682,31 \pm 11,73$ U/L, 7. day prolidase: $699,95 \pm 10,48$ U/L) ,BAL TAS results were significantly ($p < 0,001$) decreased (1. day: $1,14 \pm 0,34$ mmol Troloks Eqv./L, 7. day: $0,86 \pm 0,19$ mmol Troloks Eqv./L), BAL TOS and OSI levels were significantly ($p < 0,001$) increased (1. day TOS: $45,84 \pm 15,79$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L, 7. day TOS: $60,62 \pm 14,93$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv./L, 1. day OSI: $4,25 \pm 1,60$ AU, 7. day OSI: $7,17 \pm 1,55$ AU), and

BAL prolidase activity results were significantly ($p < 0,001$) decreased (1. day: 2560 ± 434 U/L, 7. day: 2122 ± 260 U/L) with intensive care and mechanical ventilation duration.

As a result, in intensive care unit patient oxidative damage due to mechanical ventilation occurs and serum and bronchoalveolar lavage results for TAS, TOS, OSI and prolidase activity changed significantly as correlated with mechanical ventilation duration which shows that this application also causes alterations in collagen metabolism. However, our hypothesis should be modified with the investigation of this issue in detailed and more comprehensive future studies targetting to decrease mechanical ventilation-associated pathologies by reducing oxidative stres in both blood and tissue and enhancing antioxidant defense mechanisms.

Key Words: Mechanical ventilation, intensive care, reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidants, prolidase.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Mekanik ventilasyon (MV), yaşamsal bir fonksiyon olan solunum işleminin yapay olarak ventilatör adı verilen cihaz yardımı ile sürdürülmesidir. MV'nin temel hedefi hastaya zarar vermeden dokulara oksijen sunumunun ve dokuların oksijen kullanımının en iyi düzeye getirilmesidir (1, 2). Gerekli durumlarda uygulanması kaçınılmaz olan MV tedavisi, hastanın akciğerlerinin o anki durumu ve ventilatördeki kalış süresi ile korele olarak akciğerlerde barotavma ve oksijen toksisitesine neden olabilmektedir.

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller, normal metabolik olayların seyri sırasında meydana gelebildiği gibi, bazı yabancı maddelerin metabolize edilmesi, organizmanın radyasyon gibi dış etkenlere maruz kalmasıyla da oluşabilmektedir. Serbest radikaller insan vücudunda proteinler, polisakkaritler, nükleik asitler ve doymamış yağ asitleri gibi tüm biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilirler. Serbest radikallerin akut inflamatuvar durumlarda, ciddi sepsis, akut akciğer yaralanması, amfizem, bronkopulmoner displazi, pnömokonyozis, erişkinin sıkıntılı solunum sendromu ve multi organ yetmezliğinin patofizyolojilerinde rol oynadığı bilinmektedir (3).

Vücudumuzda önemli birçok dokunun yapısında yer alan kollajenin metabolik döngüsünde, prolidaz spesifik bir enzim olduğu için önemi büyüktür. Prolidaz, kollajenin yıkımında ve prolinin kollajen yapımı döngüsüne yeniden katılımında aktif görev almaktadır (4). Kollajen sadece pek çok organ ve dokunun değil aynı zamanda ekstrasellüler matriksin de yapısal bir bileşeni olduğundan, bu yapıların patolojisinden etkilenmektedir (5).

Bu çalışmada MV uygulanan yoğun bakım hastalarında, serum ve bronkoalveolar lavaj (BAL)'da oksidatif stres parametreleri ile prolidaz enzim düzeyi değişiminin araştırılması amaçlandı (6).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yoğun Bakımın Tanımı, Tarihçesi ve Özellikleri

2.1. 1.Tanım

Yoğun Bakım Üniteleri kritik hastalara hizmet vermek üzere düzenlenen özel ünitelerdir. Yerleşim biçimi, çalışanları ve teknik donanım açısından son derece özellikli multidisipliner ünitelerdir. İleri teknolojiye sahip cihazlarla donatılmış olup kritik hasta bakımı üzerine eğitilmiş hekim ve hemşire grupları tarafından idare edilirler. Yoğun bakımlarda tıbbi bakım yanında eğitim ve araştırma alanlarında çalışmalar yapılır.

2.1. 2. Tarihçe

Danimarka'da 1950'li yıllarda ortaya çıkan Polio salgını sırasında Bjorg Ibsen, Bulber polio nedeni ile tank respiratör ile ventile edilen bir hastaya solunumsal asidoz tanısı koyup tank respiratörün yetersiz kaldığını söyler. Hastayı entübe eder ve ambu tipi bir alet ile ventile eder. Hasta düzelir. Bu salgındaki mortalite oranı % 87 den % 25 'e iner. Bu dönemde Ibsen 1953 yılında Kopenhagen Kummere Hastanesinde ilk "Intensive Therapy Unit" i açar. Bu çalışmaları nedeni ile Ibsen dünyada ilk yoğun bakım uzmanı olarak kabul edilebilir. Bu gelişmeler süratle Avrupa'ya yayılır. Paris'te 1954 yılında Pierre Mollare Claude Bernard Hast.'de ve Nede Foch Hast.'de ilk Reanimasyon üniteleri açılır. Avrupa'da 1953–60 lardan sonra Yoğun Bakım Servisleri kurulmaya başlanmıştır. Yapay solunum yöntemleri, Hemodinamik destek yöntemleri, CPR (Kardiyo Pulmoner Resüsitasyon) tedaviye girmiştir (7).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ilk yoğun bakım üniteleri 60'lardan sonra Oxford Baltimor ve Toronto Üniversitelerinde kurulmuştur. Bundan sonra yoğun bakım dünyada Avrupa modeli ve ABD modeli olarak iki yönde gelişir (7).

Türkiye'de reanimasyon bilim dalının temeli Dr. Cemalettin Öner ve Sadi Sun'un önderliğindeki çalışmalarla başlamış olup, yoğun bakım bilimsel çalışmaları 1978'de Prof.

Dr. Cemalettin Öner tarafından anestezi kökenli uzmanların dışında, konu ile ilgili uzmanlık dallarının önde gelen temsilcilerinin de katılımı ile multidisipliner bir anlayışla günümüze kadar sürdürülmüştür (7).

2.1. 3. Yoğun Bakım Ünitelerinin Özellikleri

Günümüzde yoğun bakım hastası olarak tarif edilen kritik hasta grubu son derece geniş hastalık grubunu içermekle birlikte bu patolojilerin çoğunda vital fonksiyonların düzenlenmesi ile iyileşme sağlanabilmektedir. Vital fonksiyonların düzenlenmesinin uygun monitörizasyon, standart tedavi ve dikkatli veri organizasyonu ile mümkün olabileceği de kaçınılmaz bir gerçektir. Bu açıdan yoğun bakım üniteleri tıbbi aktivite ve hasta bakımı açısından hastane hizmetlerinde ayrıcalık taşıyan kliniklerdir ve yerleşim biçimleri, teknik donanımları, insan gücü ve profesyonel beceriler açısından son derece özellik taşımaktadırlar. Günümüzde ideal bir yoğun bakım ünitesinde medikal ve paramedikal personel özellikleri ile teknik donanım ve ile hasta bakım kriterlerinin kesinlikle tanımlanması gerekmektedir (8).

Günümüzde yoğun/kritik hasta tanımlamasında tek bir kriter yetersiz kalmakta olup hastaları mevcut patoloji, monitörizasyon ve tedavi gereksinimlerine göre sınıflandırma yolu tercih edilmektedir.

2.2. Mekanik Ventilasyon (MV)

2.2.1. Tanım

Mekanik ventilasyon yaşamsal bir fonksiyon olan solunum işlevinin yapay olarak ventilatör adı verilen cihaz yardımı ile sürdürülmesidir. Günümüzde özellikle yoğun bakım hekimliğindeki hızlı gelişmeler mekanik ventilasyon uygulamasını tedavinin ayrılmaz bir parçası yapmıştır (9, 10).

2.2.2. Tarihçe

Yaşam için gerekli iki fonksiyondan biri olan solunum ile ilgili ilk bilgiler Mısır, Çin ve Yunan kaynaklarında dikkat çekmektedir.

Milattan önce (MÖ) 380 yıllarında Aristo hayvanların havasız odalarda öldüğünü gözlemlemiş ve yaşamın sürdürülmesi için taze havanın şart olduğunu belirlemiş, ilk kez Hipokrat MÖ. 460 yılında havayı bilimsel olarak değerlendirmiş ve suda boğulma vakalarında nefes borusuna yerleştirilecek bir kanül vasıtasıyla hastaya hava gönderilmesi gerektiğini bildirmiştir (10 - 12).

Paracelcus 1493'de yangın körüğü kullanarak bir hastada asiste ventilasyonu denemiştir. MV uygulamasının ilk örneği ise 1541'de Vesalius tarafından gerçekleştirilmiştir. Vesalius ölmek üzere olan bir köpeği trakeasına yerleştirdiği kanülle havalandırmış ve kalp atışlarındaki düzelmeyi saptamış, Hook 1635'de toraks hareketi olmasa da akciğerlere temiz hava ulaştırılması halinde yaşamın devam ettiğini ortaya koymuştur. 1763'de Smellie bir hastada trakeaya yerleştirdiği metal bir tüple solunum havasını akciğerlere yollamayı başarmıştır (11, 12).

Courtois 1790'da ilk kez körük yerine piston silindir kullanarak yapay ventilasyonu gerçekleştirmiştir. 1864'de Alfred Jones "spiropore" adı verilen ve vücudu içine alan ilk tank ventilatörü yani negatif basınçlı ventilatörü tanıtmıştır. 1880'de Mac Evven'in endotrakeal tüpü geliştirmesi mekanik ventilasyon uygulamasında bir dönüm noktasıdır. 1886'da Tuffer ve Hallion kafli endotrakeal tüp ve geri solumasız valf ile ilk parsiyel akciğer rezeksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. 1893'de Fell ve O'Dwyer, operasyon sırasında hastanın ventilasyonunu bir laringeal kanül ve ayakla idare edilen körük yardımıyla sağlamaya başlamışlardır. 1896'da Matas bu sisteme kompresörü de eklemiştir. 1909'da Janeway ve Green cerrahi kullanım için ilk intermittent (aralıklı) zorunlu pozitif basınçlı ventilatörü geliştirmişlerdir (11, 12).

Modern anlamda pozitif basınçlı MV ilk olarak, 1952 Danimarka ve 1953'de İsveç'te ortaya çıkan polio epidemilerinde Engström tarafından uygulanmıştır. "Erişkinin sıkıntılı solunum sendromu (Adult Respiratory Distress = ARDS)" tedavisinde sürekli pozitif havayolu basıncı uygulanması 1971 yılında gündeme gelmiştir. Aynı yıl Oberg ve Sjöstrand yüksek frekanslı pozitif basınçlı ventilasyonu takdim etmişlerdir. 1973 yılında MV'nin sonlandırılmasında "aralıklı zorunlu ventilasyon uygulaması" ileri bir teknik olarak gündeme gelmiştir. 1980'den itibaren mikroişlemci ventilatörler hızla yaygınlaşırken "basınç kontrollü" ve "basınç destekli" ventilasyon gibi yeni modlarla günümüze kadar gelinmiştir (12, 13).

2.2.3. Mekanik Ventilasyon Tedavisi Gereken Durumlar

Akut solunum yetmezliği veya akut respiratuar yetmezlik (ARY), solunum fonksiyonunun veya akciğerde oksijen/ karbondioksit gaz değişiminin yetersiz olması olarak tanımlanır (14). Bir diğer anlamda akut solunum yetmezliği, arteriyel kanda parsiyel oksijen basıncı (PaO₂) ve parsiyel karbondioksit basıncı (PaCO₂) değerlerinin fizyolojik sınırlarda sürdürülememesidir. Bu durum basitçe;

Hipoksi: Arteriyel kanda çevre havası ve hastanın yaşına göre olması gerekenden daha düşük bir PaO₂ değerinin saptanması (PaO₂ < 70 mmHg, FiO₂:0.21 iken),

Hiperkarbi: Arter kanında PaCO₂ değerinin fizyolojik sınırlarının üzerinde olması (PaCO₂ > 45 mmHg) ve yükselmeye devam etmesi,

Respiratuar asidoz: Arteriyel kanda pH değerinin 7.25 veya daha düşük değere inmesi olarak ifade edilebilir.

Akut solunum yetmezliğine neden olan patolojiler;

Ventilasyonda yetersizlik: Akciğer dışı nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan solunum yetmezlikleri,

Respirasyonda yetersizlik: Akciğere ait patolojilerle ortaya çıkan solunum yetmezlikleri; olarak iki ana başlık altında toplanabilir.

Ventilasyonu etkileyerek solunum yetmezliğine sebep olan patolojiler:

Burada temel patoloji solunum mekaniğinin bozulmasıdır. Nitekim primer olarak akciğere ait patoloji olmasa da ventilasyon fonksiyonunun yetersizliği ile akciğerlerde oksijen/karbondioksit gaz değişimi bozulmakta ve akut solunum yetmezliği ortaya çıkmaktadır. Buna göre ventilasyonu etkileyen patolojiler;

1. Santral sinir sistemine ait patolojiler,

2. Nöromusküler fonksiyon bozuklukları olarak iki başlık altında ele alınabilir.

Akut solunum yetmezliğine sebep olan santral sinir sistemi patolojileri arasında, santral sinir sistemi üzerine depressan ilaçların kullanımı (barbitüratlar, trankilizanlar, narkotikler, inhalasyon anesteziikleri), beyin ve beyin sapı lezyonları ("Stroke", kafa ve boyun travmaları, serebral hemoraji / infarkt, beyin tümörleri, spinal kord tümörleri ve travması,

santral nedenlere bağlı Pickwick veya Uyku -Apne Sendromu, uygunsuz oksijen tedavisi) yer alır (15).

Akut solunum yetmezliğine sebep olan nöromusküler patolojiler; genellikle motor sinir hasarı, nöromusküler kavşakta impuls iletim bozukluğu veya kas disfonksiyonu sonucu yetersiz ventilasyon ile solunum yetmezliğine sebep olurlar. Bunlar özellikle sinir kas kavşağına etkili ilaçlar, virüsler, bakteriler, toksinler veya otoimmühastalıklar sonucu ortaya çıkan patolojiler olup, Myastenia Gravis, tetanus, Gullian-Barre Sendromu, Polio, botilismus, musküler distrofi, ilaçlar (kürar, süksinil kolin, organofosfatlar başta olmak üzere insektisitler ve sinir gazı) örnek verilebilir.

Solunum yetmezliğine sebep olan akciğer patolojileri arasında, plevral effüzyon, pulmoner kontüzyon, hemotoraks/pnömotoraks, yelken göğüs, kifoskolyoz, göğüs duvarı deformitesi, obezite, interstisyel pulmoner fibrotik hastalıklar, havayolu rezistansında artış (astım, amfizem, kronik bronşitis, krup, epiglottitis, akut bronşit), aspirasyon pnömonisi, havayolunda yabancı cisim, ARDS, kardiyojenik pulmoner ödem, pulmoner emboli, postoperatif pulmoner komplikasyonlar yer alır.

Akut solunum yetmezliği düşünölen bir hastada, MV endikasyonu koyabilmek için birtakım fizyolojik ölçümler kullanılır (16).

Bunlar 3 kategoride incelenir:

- Solunum mekaniğine ait parametreler
- Ventilasyona ait parametreler
- Oksijenasyona ait parametreler

Bu parametreler Tablo 1 de özetlenmiştir.

Tablo 1. MV endikasyonu koyabilmek için kullanılan ölçümler (16)

Akut solunum yetmezliği	Normal Sınırlar	Kritik değerler
1. Solunum mekaniğine ait		
Maksimum inspiratuar Basınç (MIP: cmH ₂ O)	- 50, - 100	< - 20
Pik ekspiratuar Basınç (PEP: cmH ₂ O)	+100	< + 40
VC (ml/kg)	65 – 75	< 15
VT (ml/kg)	5 – 8	< 5
Solunum Frekansı (solunum sayısı/dak)	12 – 20	> 35
FEV ₁ (ml/kg)	50 – 60	< 10
2. Ventilasyona ait		
PH	7,35 - 7,45	< 7,25
PaCO ₂ (mmHg)	35- 45	> 55
VD/VT	0,3 - 0,4	> 0,6
3. Oksijenasyona ait		
PaO ₂ (mmHg) (FiO ₂ :0.21 iken)	80 – 100	< 70
P(A-a) O ₂ (mmHg)	25 – 65	>450 (FiO ₂ :1,0)
PO ₂ (Arteriel/Alveolar)	0,75	< 0,15

2.2.4. Ventilatör Seçimi ve Kullanımı

Uygun tip ventilatör seçiminde öncelikle hastaya uygulayacağımız ventilasyonun türünün belirlenmesi gerekir (17 - 19).

2.2.4. 1 Negatif Basıncı Ventilatörler

Bu amaçla kullanılan negatif basınçlı ventilatörler respiratuar kasların fonksiyonlarını taklit etmekte ve hastanın fizyolojik mekanizmalara göre solunumuna izin vermektedirler (20).

Avantajları: Bu ventilatörler sağlamlık, kullanım kolaylığı ve güvenlik açısından avantajlara sahiptir. Bu yöntemde hastayı ventile etmek için yapay solunum yollarına da ihtiyaç duyulmaz. Hastalar konuşabilir, rahatlıkla beslenebilir.

Dezavantajları: Tank ventilatörlerin büyük ve hantal oluşu, bronşial drenaj ve intravenöz tedavindeki zorluklar dezavantajlardır. Bazı hastalarda toraksla birlikte abdominal bölgeye de negatif basınç uygulanması, karın içi organların kanlanması azalmayla sonuçlanır. Bu durumda kalbe venöz dönüş azalır ve kardiyak out-put (CO) düşer. Bir de aşırı sekresyon veya epiglottik refleksin depresyonu durumunda havayolu açıklığının korunması zorlaşacaktır (19).

2.2.4. 2 Pozitif Basıncı Ventilatörler

Üst solunum yolunda pozitif basınç oluşturarak inspirasyonu sağlayan ventilatörlerdir. Bunlar ventilatör seçiminde büyük çoğunluğu oluştururlar ve temelde 2 tiptirler:

1. Volüm ayarlı ventilatörler.

2. Basınç ayarlı ventilatörler.

Volüm ayarlı ventilatörler akım jeneratörleri tarafından oluşturulan sabit veya değişken akım modelleri ile hasta akciğerindeki değişikliklerden bağımsız olarak sabit tidal volüm sağlayabilme gibi bir avantaja sahiptirler. Bu tip ventilatörler genellikle volüm ya da zaman siklusedirler. Volüm kontrollü ventilatörlerle ventilasyon, oksijenasyon ve kompliyans, basınç sikluslu ventilatörlerle karşılaştırıldığında çok daha iyi sağlanmaktadır.

Akım jeneratörlü ventilatörler genelde elektrik enerjisi ile çalışırlar, son derece kompleks yapıdadırlar ve kapsamlı alarm sistemlerine sahiptirler (21).

Basınç jeneratörler tarafından oluşturulan basınç sikluslu ventilasyonda her solunumda hastaya ulaşan volüm miktarı akciğer özelliklerine ve inspiratuar efora bağlıdır. Bu nedenle hastaya verilen volüm her solukta değişmektedir. Uzun süreli kullanımlarda bu özelliğin unutulmaması gerekir (22).

Basınç sikluslu ventilasyon sağlayan basınç jeneratörlerin avantajları küçük ve taşınabilir olmaları, elektrik enerjisi gerektirmemeleri olarak sıralanabilir. Bu ventilatörler özellikle ventilasyon desteğine ihtiyaç gösteren hastaların transportunda, acil durumlarda, anesteziyenin uyanmanın geç olduğu postoperatif hastaların kısa süreli ventilasyonunda uygun ventilatörlerdir (19, 23).

2.2.5 Mod Seçimi ve Ventilasyon Modları

2.2.5.1 Kontrollü Mekanik Ventilasyon (KMV): Kontrollü ventilasyon kullanımı hastanın solunum eforunun olmadığı durumlarda en uygun seçimdir. Burada hastaya kullanıcı tarafından belirlenen solunum hızı ve tidal volümde pozitif basınçlı solunum uygulanır (Şekil 1).



Şekil 1. Kontrollü mekanik ventilasyon

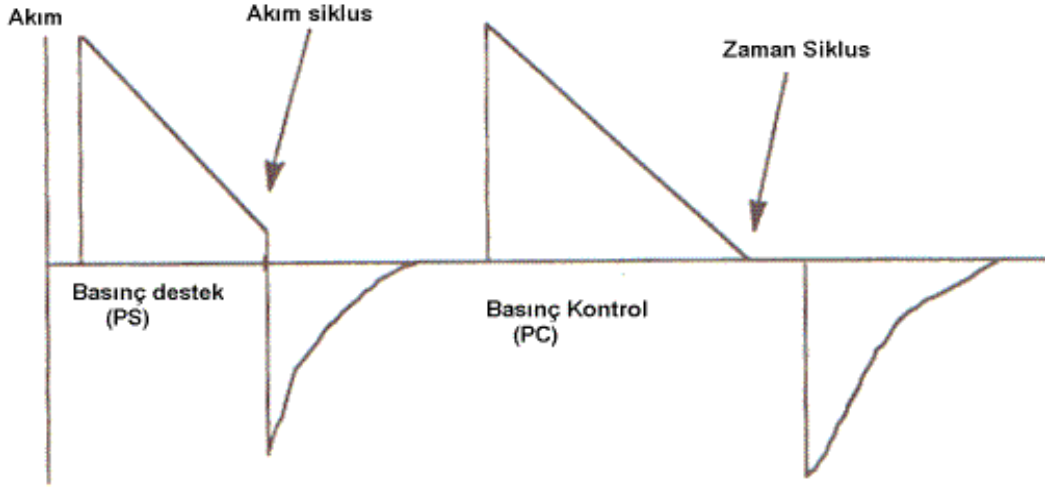
İlaçlara bağlı (örn.anestezi altında), serebral fonksiyon bozukluğu, spinal kord veya periferik sinir hasarlanması, veya motor sinir paralizi nedeniyle ventilasyon yapamayan hastalarda KMV endikedir. Tetanus, status epileptikus gibi önlenemeyen nöbetlerin veya

devamlı kontraksiyonların meydana geldiği durumlarda da sedasyon ve paralizi sağlanarak KMV uygulaması, uygun olabilir. Kafa travmalı veya nöro-cerrahi sonrası intrakranial basıncı yüksek hastalarda da kontrollü mekanik ventilasyonla hiperventilasyon sağlanarak kafa içi basınç azaltılabilir. Spontan solunumu olan bir hastada paralizi ve sedasyon sağlanmadıkça KMV uygulaması güçtür. Aksi takdirde karşımıza “hastanın ventilatörle uyumsuzluğu, savaşıması” gibi hiç istenmeyen bir durum çıkacak ve mekanik solutma yarardan çok hastaya zarar verecektir (19, 24).

2.2.5.2 Asiste Ventilasyon (ASV) veya Asiste Kontrollü Ventilasyon: Eğer hastanın solunum eforu var fakat yetersiz ise bu mod kullanılabilir. Hastanın soluk alma gayreti sırasında meydana gelen basınç değişikliği ventilatör tarafından saptanır. Burada tetikleme mekanizması söz konusudur yani ventilatör belli bir negatif basınca duyarlı kılınır. Ventilatör basınç değişikliğini tespit edildiğinde inspiratuar siklusu başlatır. Bu modda tidal volüm ventilatör tarafından, solunum hızı hasta tarafından belirlenir (19, 25).

2.2.5.3 Senkronize Aralıklı Zorunlu Ventilasyon (Synchronized İntermittant Mandatory Ventilation=SIMV): SIMV, spontan ve asiste ventilasyonun bir kombinasyonudur. Bu modda da hasta pozitif basınçlı ventilasyonlar arasında spontan solur. Önceden belirlenen bir zaman aralığı geçtikten sonra makina hastanın inspiratuar eforuna duyarlı hale gelir (basınç tetiklemeli). Bu intervalde oluşan ve ventilatörün duyarlı olduğu değerlerde oluşan ilk inspiratuar efor zorunlu mekanik solunumunu (basınç veya volüm kontrollü) tetikler. Eğer makinanın duyarlı olduğu zaman aralığında inspiratuar efor oluşmazsa ventilatör IMV moduna geçer. SIMV hastanın solunum işinin arttığı durumlarda endikedir, sıklıkla mekanik ventilasyonun sonlandırılması periyodunda kullanılır (19, 26).

2.2.5.4 Basınç Kontrollü Ventilasyon (PCV) : PCV’da inspiryum süresince havayollarına sabit bir basınç uygulanır ve genellikle, kullanıcı tarafından önceden ayarlanan hız ve inspirasyon zamanı nedeniyle zaman tetiklemeli bir kontrollü moddur (Şekil 2). Bu mod hastanın spontan solunumuna izin verildiğinde ve duyarlılık ayarlandığında asist ventilasyon da sağlayabilir. PCV basınç limitli olduğundan, belirlenen basınç seviyesine göre tidal volümün miktarı, dağılımı hasta akciğerinin kompliyansı, rezistansı, basınç limiti, inspirasyon zamanı ve oto PEEP seviyeleriyle değişir. Bu nedenle PCV sırasında basınç ve ekshale edilen tidal volümün dikkatle monitörize edilmesi gerekir. Klinik kullanımda PCV’da yapılacak siklus ayarı (İ/E) normal veya ters orantılı olabilir (19, 27, 28).



Şekil 2. Basınç kontrollü ventilasyon (19)

2.2.6 Mekanik Ventilasyon Komplikasyonları

MV'nin kardiyovasküler sisteme etkileri:

Primer komplikasyon kalp debisinde azalmadır. Pozitif basınçlı ventilasyon ve PEEP sırasında kardiyak debiyi azaltan sebepler arasında; venöz dönüşte azalma, afterload'da artma, kontraktilitede azalma, sağ ventrikül volümünde artış, pulmoner perfüzyon azalması ve vasküler resistans artması yer alır.

MV'nin intrakranial basınç ve serebral perfüzyona etkisi

Kardiak output ve ortalama arter basıncı düşeceğinden kardiyopulmoner basınçta azalma beklenir. Santral venöz basınç artarken serebral venöz dönüş de azalmaktadır. Bu da intrakranial basınç artışı ve kardiyopulmoner basınçta azalmayla sonuçlanacaktır. Kardiyopulmoner basınçtaki azalma ile serebral hipoksemi, intrakranial basınç artışı sonucunda da serebral ödem ortaya çıkabilir.

MV'nin renal etkileri:

Azalan kardiyak output nedeniyle idrar output'unda azalma beklenir. Renal kan akımı iç korteks ve dış medüller dokuda artarken, dış kortekste azalır. İdrar çıkışı, kreatinin ve sodyum atılımı azalır. Anti diüretik hormon (ADH) salınımında artma sonuçta oligoanüri görülür. ANP (atrial natriüretik peptid) sekresyonu azalır.

MV'nin gastrointestinal sisteme etkileri:

Karaciğer hastalığı olmasa bile serum bilirubininde yükselme ve karaciğer fonksiyonlarında bozukluk gözlenebilir. Portal venöz akımda azalma veya splanknik rezistansta artma olabilir. Yukardaki sebeplerden gastrik mukozada iskemi, ülser ve kanamalar ortaya çıkabilir. Akciğerden 'plazminojen aktive eden faktör' salınımı artar. Sonuçta fibrinolitik aktivitede artış gözlenir.

MV'nin barotravma yapıcı etkisi:

Barotravmaya yol açan başlıca nedenler; yüksek pik hava yolu basıncı, büllöz akciğer hastalığı, yüksek PEEP seviyesi, gastrik asit aspirasyonu, nekrotizan pnömoniler ve ARDS dir. MV hücresel düzeyde akciğer sıvı retansiyonu ödem, alveoler hemoraji, interstisyel amfizem ve kompliansta azalma ile karakterize akciğer hasarı yapabilir.

MV esnasındaki oksijen tedavisi komplikasyonları:

Absorbsiyon atelektazisi: Yüksek konsantrasyonda O₂ (FiO₂>0.70) hipoventile olan bölgelerde bu duruma yol açar. İntrapulmoner şant artar (19).

Oksijen toksitesi: FiO₂>0.60 değerinde 48 saatten uzun uygulanırsa risk artar. Yenidoğan ve prematüre infantlarda PaO₂>80 mmHg değerleri potansiyel tehlikedir. Pulmoner doku ve göz komplikasyonları riski artar. 6 saat süreyle FiO₂ = 1.0 düzeyinde O₂ tedavisinin başlattığı patolojiler arasında:

Sekresyonlarda artma, makrofajlarda azalma, vital kapasitede azalma, akciğer sıvısında artma, sürfaktan üretiminde azalma, kompliansta azalma, PO₂'de artma, kapiller hasarlanma, ARDS yer alır.

MV esnasındaki enfeksiyon riski:

Nazokomiyal enfeksiyon ve pnömoni açısından yüksek risk vardır. İnvaziv yaklaşımlar bu riski artırır. Nazokomiyal pnömoni insidansı %20, mortalite %50-70 arasındadır. En yaygın mikroorganizmalar; *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacteroides fragilis* ve *Candida*'dır (19).

MV esnasındaki asit - baz dengesi bozuklukları:

Metabolik asidoz: Bikarbonat kaybına sebep olan diyare, böbrek yetmezliğine veya hiperventilasyona bağlı gelişebilir.

Metabolik alkaloz: Normal pH'yı sağlamak için kompensatris hipoventilasyona yol açar. Sebepleri arasında; diüretik, volüm azlığı, laktat kullanımı, gastrik aspirasyon kusma ve kronik CO₂ retansiyonuna kompensatuar yanıt olarak sayılabilir. En sık rastlanan bozukluktur.

Respiratuar alkaloz: Spontan solunum dakika sayısının yüksek olduğu hastalarda ACMV sırasında sık gözlenir. Dakika ventilasyonunun azaltılması alkalozu düzeltebilir (19).

2.3. Serbest Radikaller

Bilindiği gibi atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar, belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya eğilimlidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momenti dengelenmemiş bu tek elektron; atoma (ya da moleküle) büyük bir aktiflik kazandırır. En dış yörüngede eşlenmemiş bir elektronu bulunan molekül ya da molekül gruplarına "radikal" adı verilmektedir ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle gösterilir (R[•], R[•]) (29, 30).

2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri

Oksijen, 8 atom numaralı, doğada dioksijen (O₂) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu, enerji düzeylerinde bulunan elektronlarının yapısıyla ilişkilidir. Oksijen molekülündeki, aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali

önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde “singlet oksijen” oluşur. Orbitallerden birine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse “oksijen radikali” elde edilir (Tablo 2).

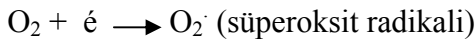
Tablo 2. Oksijen türevi bileşikler

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil (HO [·])	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)
Alkoksil (RO [·])	Singlet Oksijen (O ₂ ^{↑↓})
Peroksil (ROO [·])	Ozon (O ₃)
Superoksit (O ₂ [·])	Hipoklorid (HOCl)
Nitrik oksit (NO [·])	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Azot dioksit (NO ₂ [·])	Peroksinitrit (ONOO [·])

Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdan kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Sonuçta nonradikal yapıyı radikal şekle dönüştürebilirler (29, 31).

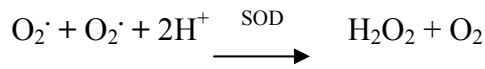
2.3.1.1. Süperoksit Radikalleri (O₂[·])

Süperoksit radikalleri (O₂[·]), hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu ile üretilmektedirler. Süperoksit oluşumu; a) elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve b) ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır. Zayıf bir oksidan olan süperoksit radikalinin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak süperoksit radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir (32). Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda O₂ ve H₂O₂ demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan HO[·] radikalleri oluşmaktadır.



Üretilen bu OH[·] radikalleri oldukça reaktif olup DNA gibi yapılarla reaksiyonlara girerek önemli hasarlara yol açabilmektedir (33).

O₂[·] radikalleri, hücre içi demir depolarından demiri serbest hale getirir. Serbest hale geçen demir iyonu Haber-Weiss gibi radikal üreten reaksiyonlarda veya diğer serbest radikal aracılıklı hücre hasarında rol oynayabilir. Süperoksit radikalleri çok kısa bir yarı ömre sahip olup dismutasyon reaksiyonu ile H₂O₂ ve oksijen üretirler. Dismutasyon reaksiyonu spontan olarak meydana gelmekte ve reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile katalizlenmektedir.

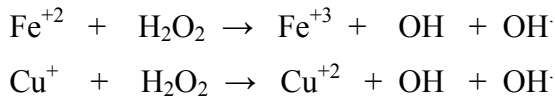


2.3.1.2. Hidroksil Radikalleri (HO[·])

Hidroksil radikali (HO[·]), biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldir. Dokular radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorblanır ve radyasyon oksijen-hidrojen arasında kovalent bağa neden olur. Sonuçta şekilde görüldüğü gibi iki radikal meydana gelir. Bu radikallerden biri hidrojen (H[·]) ve diğeri ise hidroksil radikalidir (OH[·]).



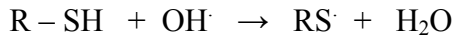
Hidrojen peroksitin (H₂O₂) Fe⁺² veya Cu⁺² ile reaksiyona girmesiyle de OH[·] oluşmaktadır. H₂O₂ toksisitesinin büyük çoğunluğunun temelinde bu oluşan OH[·] olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyon ilk defa 1894 yılında Fenton tarafından gözlenmiş ve günümüzde de Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.



OH[·] radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. OH[·] DNA da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve bu oluşan

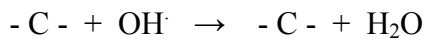
ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları görülmüştür. Yine OH[•] aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiklerinden DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşumuna neden olurlar. Örneğin: Timine katılarak timin-radikalini oluşturur ve bu radikal oksijenle reaksiyona girerek son derece reaktif olan timin peroksil-radikaline dönüşmektedir. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen OH[•] DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik kırılmalarına neden olurlar. Hasar çok kapsamlı olursa hücre koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir (32, 34).

DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşmenin yanısıra tiol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu da koparabilmektedir.

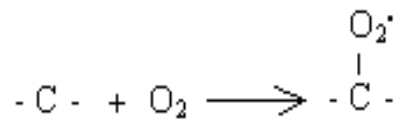


Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O₂ ile kombine olabilir ve oksisülfür radikallerini oluşturur. RSO₂[•] ve RSO[•] gibi bunların bir çoğu da biyolojik moleküllerde hasara neden olurlar.

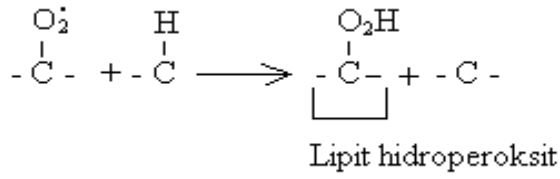
OH[•]'ın sebep olduğu en iyi karakterize edilmiş olan biyolojik hasar lipid peroksidasyon olayıdır. OH[•] membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle araşidonik asit gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinden -C atomunun birinden H atomunun çıkartılması ve su oluşumu şeklinde gerçekleşir.



Bu reaksiyon sonunda membranda -C[•]- radikali kalır. Bu -C[•]- radikali oksijen ile kombine olarak peroksil radikalini oluşturur.



Peroksil radikaller reaktiftir ve yakınındaki doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerine saldırır;

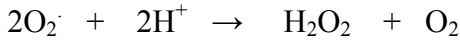


Böylece OH[·], yüzlerce yağ asitlerinin yan zincirlerini lipit hidroperoksitlere dönüştürür. Membranda lipit hidroperoksitlerinin birikimi membran fonksiyonunu bozar. Peroksil radikaller ve sitotoksik aldehitler, membran proteinlerinde ciddi bir hasara neden olurlar ve membrana bağlı bazı enzimleri ve reseptörleri inaktive ederler (31, 35, 36).

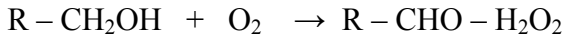
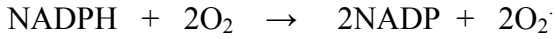
2.3.1.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından aslında bir radikal değildir. Süperoksit anyonunun (O₂^{·-}) hidrojenle yaptığı reaksiyona dismutasyon reaksiyonu adı verilir ve dismutasyon hızı asidik pH değerlerinde hızlanır (31, 37).

Reaksiyon şu şekilde ifade edilir;

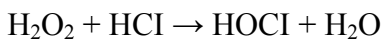


Bazı enzimler ya tekli (NADPH oksidaz) ya da çiftli (Glukoz oksidaz) elektron eklenmesini katalize ederek O₂^{·-} veya H₂O₂ oluşmasını sağlarlar.



2.3.1.4. Hipoklorik Asit (HOCl)

Hipokloröz asit de radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) içinde yer almaktadır. Fagositik hücrelerin bakterileri öldürülmesinde önemli rol oynarlar. Aktive olan nötrofiller, monositler makrofajlar ve eozinofiller süperoksit radikallerini (O₂^{·-}) üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz etmektedir. Özellikle nötrofiller miyeloperoksidaz enzimleri aracılığıyla önce O₂^{·-}'ni oluştururlar ve daha sonra dismutasyonu ile hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'i meydana getirirler.



2.3.1.5. Singlet O₂ (O₂^{↑↓})

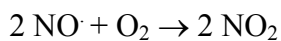
Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmadığından serbest radikal değil ancak serbest radikal reaksiyonlarını başlattıklarından serbest radikal sınıfına dahil edilmiştir. Singlet O₂, oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksidin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça olduğu tespit edilmiştir.

Serbest oksijen radikallerinin etkisiyle peroksil radikalleri (ROO[·]), alkoksil radikalleri (RO[·]) karbon merkezli radikaller (R[·]) veya tiol radikalleri (RS[·]) oluşur. Bu radikaller oksijenle tekrar reaksiyona girerek yeni serbest radikaller üretirler (38).

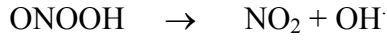
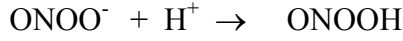
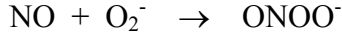
2.3.2. Reaktif Nitrojen Türleri (NO, NO₂, NO⁺, NO⁻)

Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir (39). Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO, bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücreleri sekresyon ürünüdür (40,41). Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir (39). NO[·]; bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır (42). Bu lipofilik serbest radikal damar endotel hücrelerinde Nitrik Oksid Sintaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. NOS'ın birçok izoformu tanımlanmıştır. NO[·]'in yarı ömrü 10–20 saniyedir. Kolayca düz kasa geçerek Guanilat Siklaz (GC) enziminin “hem” demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır. Sentezlenen NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO, Fe-S kümelerine afinite gösterdiği için bu grupları içeren akonitaz enzimine de bağlanır. Bu enzim hücre içi demir trafiğini kontrol eder. NO, akonitaz enzimine mRNA bağlanmasını artırır ve enzimin aktivitesini düşürür.

NO[·] metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp nitrojen dioksidi (NO₂) oluşturur:



NO'nin ROS'leri ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla OH⁻ radikalinin oluşumuna yol açtığı ifade edilmektedir:



OH⁻ ise biyolojik olarak yıkıcı bir moleküldür. Ayrıca, peroksinitrit de tirozin gibi fenolik amino asitleri nitrolayarak toksik nitro- türevlerini (nitrotirozin) oluşturmaktadır. Sonuç olarak NO, endotel hücre disfonksiyonu ve buna bağlı ateroskleroz, hipertansiyon ve diabetes mellitus gibi bazı önemli hastalıklarda rol oynayabilmektedir.

2.3.3. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluştuğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkilerle de oluşabilir. Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanı sıra radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırmaları. Sitokrom P-450, sitokrom b5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, oksidatif stress yapan iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumlar, mitokondrial elektron transport sistemi (ETZ), moleküler otooksidasyon yapan tiol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrel serbest radikalleri oluştururlar (39, 43). Serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

A. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Normal olarak metabolizmada, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Her ne kadar serbest radikal yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri varsa da, bazı metabolik olayların ilerleyebilmesi için bunların oluşması kaçınılmazdır.

1. Mitokondriyal Elektron Transport Sistemi

Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni

NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır. Fizyolojik olarak reaktif oksijen türlerinin temel kaynağı normal oksijen metabolizmasıdır. Dolayısıyla fizyolojik koşullar altında mitokondriyal elektron transport sistemi serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır (44).

2. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P-450 moleküler oksijeni kullanarak birçok substratı oksitler. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturur. Bu reaksiyon monooksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu olarak adlandırılır.

Kimyasal ajanların serbest radikal oluşturmadaki en önemli mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur. Bu sistem, molekülleri indirgeyerek veya oksitleyerek serbest radikal oluşturur. Son durumda bir elektron eksikliği vardır ve elektrofilik bileşik oluşur. Oluşan bu elektrofilik ürün bir nükleofil ile reaksiyona girer. Bu elektrofilik bileşiği çeken en önemli bileşik sistein kalıntıları üzerindeki tiyol (-SH) grubudur. Tiyol grubu ise pek çok endojen makromolekülde (DNA, RNA, enzimler gibi) bulunduğu için reaktif ara ürünler bu moleküllerle kovalent bağlanarak toksisite gösterebilirler (45).

3. Redoks Döngüsü

Ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal reaksiyonlarla olmamaktadır. Menadion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin, gibi bileşikler alternatif bir redoks siklusuna girerler. Bu bileşikler, ilave bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikaller, tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir süperoksit radikalini oluştururlar (46). Oluşan ksenobiyotik ve süperoksit radikalleri intrasellüler ferritin depolarından demiri serbest hale getirirler. Sitozole salınan demir, serbest radikaller arasında en reaktif olan ve dolayısıyla daha yıkıcı olan hidroksil radikali gibi ikincil radikallerin oluştuğu Fenton reaksiyonunda katalitik rol oynar (32).

4. Araşidonik Asit Metabolizması

Hücre membranlarında prostaglandin için en önemli doymamış yağ asidi prekürsörü araşidonik asittir. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonu, plazma membranlarında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin siklooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu prostaglandinleri, lipooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu ise lökotrienleri verir ve bu tepkimeler sırasında serbest radikaller oluşur .

Araşidonik asid oksidasyonu başlatılmış bir serbest radikal reaksiyonudur. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerinin her ikisi de aktiviteleri için peroksitlere ihtiyaç duyarlar. Siklooksijenaz aktivitesi daha sonra prostaglandinlerin sentezi için de gerekli olan endoperoksitlerin oluşumuyla sonuçlanır. Öte yandan lipooksijenaz, lipid peroksitleri üzerinden lökotrienlerin oluşumunu katalize eder (47). Aynı zamanda bazı ksenobiyotiklerden bu esnada reaktif ara ürünler oluşmaktadır. Bu ara ürünler hedef yapılarla etkileşerek toksisite gösterirler.

5. Fagositoz

Radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırmalar. Aktive fagositler intrasellüler radikal oluşumuna neden olurlar (Tablo 3). Aktive olmuş fagositlerde üretilen serbest radikaller patojenlerle savaşta önemli rol oynar.

Tablo 3. Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler

Trombositler	Hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil
Nötrofiller	Hidrojen peroksit, süperoksit, hipoklorid
Eozinofiller	Hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil, hipoklorid
Makrofajlar	Hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil, hipoklorid, nitrik oksit

Monositler, makrofajlar (kupfer hücreleri, alveolar makrofajlar) gibi fagositik hücreler, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller gibi granülositler, immunojenik veya özel bir uyarı ile uyarıldıktan sonra lizozomlarını dışarı vermeye başlarlar. Reaktif oksijen oluşumu yanısıra, mitokondri dışındaki oksijen üretiminde bir patlama (respiratory burst) olur. Fagosite edilmiş patojenler oksidan ajanlar tarafından öldürülür. Solunum yolu ile patlamanın (respiratory burst) amacı oksidan ajanlar sağlamaktır. Oluşan oksidan ajanlar patojenleri öldürmenin yanısıra myeloperoksidaz sistemine de etki eder. Hidrojen peroksit ve hipoklorit kombinasyonu myeloperoksidaz sistemine etkiyerek de güçlü bir antimikrobiyal aktivite

gösterir. Bu radikaller memeli bakteri ve parazitlerine karşı sitotoksik etkiye sahip oksidan ajanlardır. Membran peroksidasyonu, membran proteinlerinin dekarboksilasyonu ve/veya oksidasyonuna yol açıp membran bütünlüğünü bozabilir ve DNA'yı okside ederek parçalayabilir. Fagositik kaynaklı oksidan ajanlar; oto-toksik, immunosupresif ve mutajenik etki oluşturabilirler (47).

6. Oto-oksidasyon

Doku bileşenlerinin çoğu moleküler oksijenin varlığında kimyasal olarak stabil değildirler ve metabolik şartlar altında az ya da çok oto-okside olurlar. Kolayca oto-okside olabilen bu bileşenler doku ve hücrelerin son derece önemli komponentleridirler (48, 49). Bunlar arasında, hemoglobin, hormonlar, tiyoller, doymamış membran lipitleri sayılabilir.

Bütün oto-oksidasyonlar sırasında serbest radikal intermediyerleri kadar aktive oksijen türleri de üretilir. Böylece oto-oksidasyonlar vücudun radikal kaynaklarına katkıda bulunurlar.

7. Oksidan Enzimlerin Reaksiyonları

Aerobik organizmalarda oksijenin katıldığı birçok reaksiyonda oksijenin tek değerlikli indirgenmesiyle süperoksid anyonu meydana gelebilir. Glikojen oksidaz, XOD, NADPH oksidaz, NADH oksidaz, diamin oksidaz, urat oksidaz gibi enzimler bunlardan bazılarıdır.

Üzerinde en çok çalışılan ksantin oksidaz (XOD) aslında ksantin dehidrogenaz (XDH) olarak sentezlenmekte ve dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enzim elektronlarını moleküler oksijene değil NAD'ye verir ve süperoksid anyon radikali oluşturmaz. Fakat XOD sülfidril oksidasyonu ya da sınırlı proteolizis ile dehidrogenaz formunda oksidaz formuna dönüşebilir. XOD moleküler oksijeni kullanarak H_2O_2 ve O_2^- oluşturmaktadır (50).

B. Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

1-Hava kirliliği: Havadaki azot dioksit ve kükürt dioksit gazları

2-Sigara dumanı: Sigara içenlerde veya dumanına maruz kalanlarda düşük dansiteli lipoprotein (LDL)'lerin oksidasyona duyarlılığının arttığı buna mukabil antioksidan kapasitenin azaldığı görülmüştür.

3-Kimyasal maddeler: Çözücüler, pestisitler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar, asbest

4-Antineoplastik ilaçlar: Nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin

5-Glutation tüketen ilaçlar: Asetaminofen, kokain

6-Radyasyon: Radyasyon su molekülüne etki ederek hidroksil radikali oluşturmaktadır.

7-Stres: Stres sonrası lipid peroksit düzeyleri artar, protein ve DNA hasarı oluşur.

8-Alkol: Alkol hepatotoksik etkisi nedeniyle karaciğerde serbest radikal oluşumunu arttırarak lipid peroksidasyonuna neden olur.

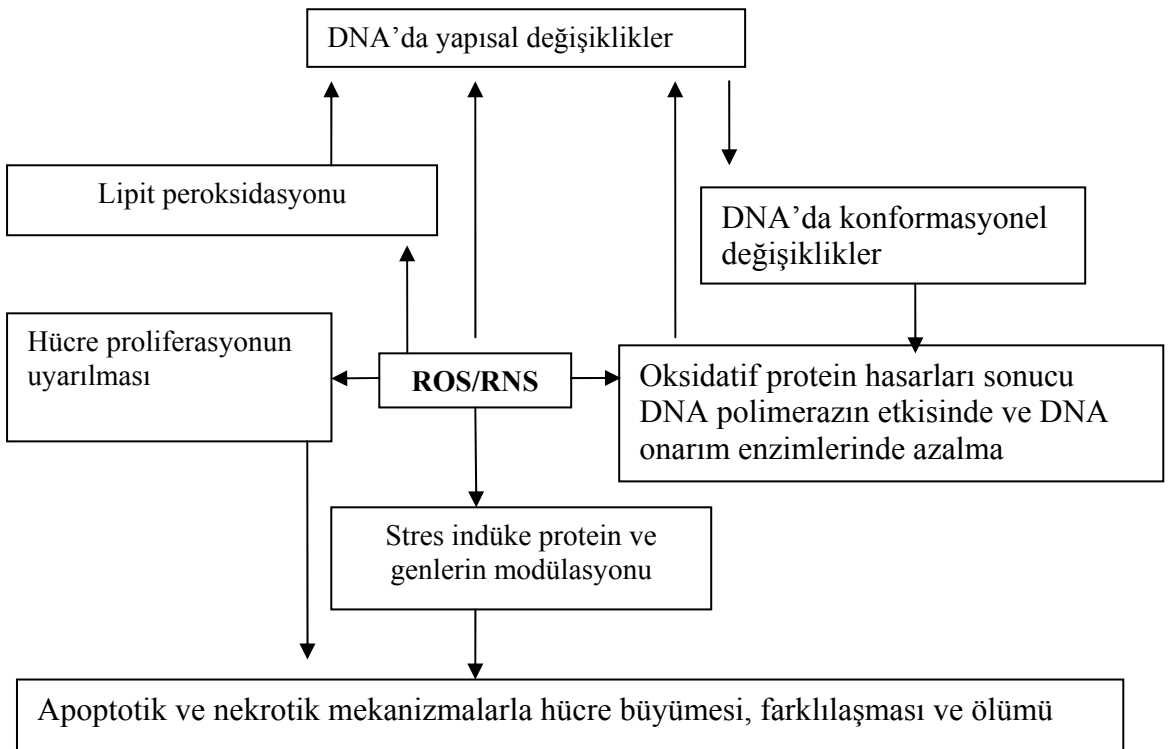
9-Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA): Yapılarındaki çift bağlardan dolayı kolayca otooksidasyona uğramaktadırlar. Bundan dolayı çoklu doymamış yağ asitlerini fazla tüketen canlılarda lipid peroksidasyonu artmakta ve antioksidan rezervleri azalmaktadır

10-Yüksek kalorili diyet: Yüksek kalorili gıdaların biyolojik moleküllerde daha fazla oksidatif hasar oluşturduğu gözlenmiştir.

11-Aşırı demir ve bakır alınması: Metal iyonları biyolojik sistemlerde serbest radikal ve metal-oksijen kompleksleri üretmek için süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girmektedir. Sonuçta oksidatif DNA hasarı oluşmaktadır (51).

2.3.4. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri

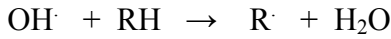
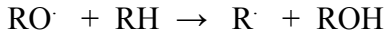
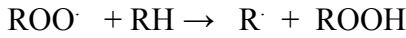
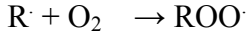
Serbest radikaller DNA, lipidler, proteinler ve enzimler gibi pek çok biyomolekül üzerinde etkilidirler (Şekil 3).



Şekil 3. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS ve RNS) vücuttaki etkileri (52)

2.3.4.1. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

Serbest radikallerin en önemli etkisi lipitler üzerine yaptığı etkidir ki bu lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır. Lipit peroksidasyonu doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşmesi sonucu doymamış yağ asidindeki metilen grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalin süperoksit anyon radikali ile hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Süperoksit anyon radikali hidroksil radikaline dönüşmektedir. Benzer şekilde hidrojen peroksidin de hidroksil radikaline dönüştüğü bilinmektedir. Bu nedenle lipit peroksidasyonunu başlıca hidroksil radikali başlatmaktadır. Hidrojen atomunun koparılmasıyla oluşan serbest yağ asidi radikali moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksit radikalini oluşturur. Oluşan peroksit radikali yüksek reaksiyon yeteneğine sahip olup başka bir yağ asidi molekülü ile yeni bir hidroperoksit ve yeni bir yağ asidi radikali oluşturacak şekilde reaksiyona girer. Oluşan bu yağ asidi radikali yeniden oksijen ile birleşir ve RH'dan yeniden bir hidrojen atomunun ayrılmasını sağlar. Bu başlayan zincir reaksiyonu oluşan yeni radikallerin etkisiyle devamlı olarak artan bir hızda devam eder.



Bir çok olayda bu şekilde oluşan lipit peroksiti $RO\cdot$ ve $OH\cdot$ verecek şekilde parçalanır ve bu oluşan radikaller hemen substrat ile reaksiyona girerek yeni zincir reaksiyonlarını başlatacak olan $R\cdot$ radikallerini oluştururlar. Böylece oluşan bir radikal sürekli olarak yeni radikallerin oluşmasına neden olur (53 - 55).

Lipit peroksitleri hücre zarlarının önemli bir komponentidir ve Fe, Cu gibi geçiş metallerinin varlığında alkoksi ve peroksi radikallerini verirler. Bu nedenle Fe veya Cu tuzları lipit peroksidasyonunun hızını arttırırlar. Sonuçta hücre zarının akışkanlığını ve permabilitesini azaltarak zar bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Lizozomal membranların tahribi hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olur. Biriken hidroperoksitler direkt olarak toksik etki göstermenin yanısıra duyarlı aminoasit kalıntıları (methionin, histin, stein, lizin) okside eder veya zincir polimerizasyon reaksiyonlarıyla enzimleri inaktive edebilirler (47, 54, 56).

2.3.4.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit içeriğine göre değişir. Protein molekülleri üzerindeki sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır:

- 1) Amino asitlerin modifikasyonu,
- 2) Proteinlerin fragmentasyonu,
- 3) Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalarıdır (57).

Aromatik aminoasitlerde (fenilalanin, tirozin, triptofan) doymamış yapılar olduğundan oksidatif ataklara çok hassastırlar. Sülfürlü amino asitler olan sistein ve sistin de serbest radikal atağına hassas amino asitlerdir. Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler (58).

2.3.4.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar (58).

Enflamatuvar eklem hastalıklarında synovial sıvıya geçen PML'lerden extrasellüler sıvıya salınan H_2O_2 ve O_2 buradaki mukopolisakkarit olan hyalüranoik asidi parçalarlar. Gözün vitröz sıvısında bol miktarda hyalüronik asit bulunur. Bununda oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunur (59).

2.3.4.4. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

Serbest radikallerin, DNA atakları mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçebileceğinden hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne yol açar. Bu nedenle DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür. ROS ve RNS ile DNA hasarlarının çok az bir kısmı doğal olarak meydana gelmektedir (46).

DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır. Nitrik oksid veya nitrojen dioksit (NO_2),

peroksinitrit (ONOO^-), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve nitrik asit (HNO_3) gibi reaktif ürünleri, nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler. Farklı ROS farklı yollardan DNA hasarlarına neden olurlar (47, 48). Örneğin O_2^- ve H_2O_2 hiçbir zaman bazlarla reaksiyona girmezken OH^\cdot DNA'daki dört bazdan herhangi birine bağlanarak farklı reaktif ürünlerin oluşmasına yol açmaktadır (49). Singlet oksijen ise guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur (29, 30).

Hidroksil radikali pürin bazları ile C4, C5 ve C8 pozisyonlarından reaksiyona girerek sırasıyla C4-OH-, C5-OH-, ve C8-OH- pürin radikalleri oluşmaktadır (31). C4-OH- ve C5-OH-pürin radikalleri dehidrasyona uğrayarak okside pürin radikallerini oluştururlar. C8-OH-pürin radikallerinin bir elektronlarının oksidasyonu ve bir elektronlarının redüksiyonu ile sırasıyla 8-hidroksipürinler (7,8-dihidroksi-8-oxo-pürinler) ve formamidopirimidinler oluşur (30). Her ikisi de hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda meydana gelebilmektedir. İndirgeyici ajanlar formamido- pirimidinlerin oluşumunu artırırken 8-OH-pirimidinlerin oluşması için oksijenli ortam uygun görülmektedir. 8-OH-guanin çok yaygın olarak meydana gelen bir baz hasar ürünü olduğundan oksidatif DNA hasarlarının ölçülmesinde hasar indeksi olarak ölçülmektedir. Çoğu zaman 8-hidroksideoksiguanozin (8-OH-dGua) nükleoziti şeklinde ölçülmektedir (32).

Timinin alil radikalının oksidasyonu ile 5-hidroksimetilurasil ve 5-formilurasil oluşmaktadır. Dehidrasyon ve deaminasyon reaksiyonlarına yalnızca sitozin katılabilmektedir. Böylece sitozin; glikol dehidrasyonla urasil, glikol deaminasyon ile 5-hidroksi urasil (5-OH-Ura), dehidrasyon ve deaminasyon ile de 5-hidroksisitozini (5-OH-Cyt) vermektedir.

Hidroksil radikali fraksiyonunun DNA'daki şeker grubu ile etkileşmesi, beş karbon atomunun herhangi birinden bir H atomunun çıkarılmasıyla olmaktadır (29). Şeker radikalleri birçok farklı reaksiyonla meydana gelmektedir. Oksijensiz sistemlerde C4' merkezli radikaller parçalanmaya uğrarlar ve DNA zincirleri kırılarak sağlam baz ve değişikliğe uğramış şeker serbest kalır. C1 merkezli radikallerin oksidasyonu ile şeker laktonu oluşumu ve sağlam bazın salınımı gerçekleşir. Oksijen yokluğunda, baz radikalleri kendilerine komşu olan şeker grubundan H atomu alarak şeker radikallerini oluştururlar ve sonuçta zincir kırılmalarına neden olurlar. Oksijenli sistemlerde karbon merkezli şeker radikale moleküler oksijenin eklenmesi sonucu peroksil radikalleri oluşmaktadır. Şeker peroksil radikallerinin en karakteristik özelliği karbon-karbon bağını kırarak alkali bölge oluşturmalarıdır. C5' merkezli peroksil radikali oksil radikale dönüştürülerek parçalanma ile DNA zincirinin kırılmasına,

sağlam bazın ve değişmiş şekerin serbest kalmasına yol açmaktadır (33). DNA'daki değişikliğe uğramış şeker grupları DNA zincirinden salınabilir ya da fosfat bağlarıyla DNA'ya bağlı kalabilir.

Baz ve şeker radikallerinin reaksiyonları; değişik modifiye baz ve şekerler, kontrolsüz baz dizilimi, zincir kırılmaları ve DNA-protein çapraz bağlarını meydana getirirler. Oksidatif DNA hasarları da denilen bu tip hasarlar mutagenezise, kanserogenezise ve yaşlanmaya yol açmaktadır (34).

2.3.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta "antioksidan savunma sistemleri veya antioksidanlar" adı verilen birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bütün hücreler, güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidatif strese karşı savaşılmaktadır. Savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi ve serbest radikal tutucuları etkili olmaktadır. Eğer serbest radikaller nötrale edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler. Bu hasarlar genel olarak şöyle sıralanabilir;

- 1.Hücre membran bütünlüğünün bozulması,
- 2.Membran lipit ve proteinlerinin denatürasyonu,
- 3.Nükleik asitlerin (DNA/RNA) mutasyonu
- 4.İmmün sistemin supresyonu.

Organizmada oksidan ürünlere karşı savunma üç şekilde gerçekleşmektedir;

- 1.Serbest radikal reaksiyonlarının sonlandırılması,
- 2.Serbest radikal reaksiyonlarının sınırlandırılması,
- 3.Oluşan serbest radikallerin detoksifikasyonu.

Antioksidanların başlıca etki mekanizmaları ise şöyledir;

1.Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler bu tip etki gösterirler.

2.Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif hale dönüştürme işlemidir. A vitamini ve flavanoidler bu tip etki gösterirler.

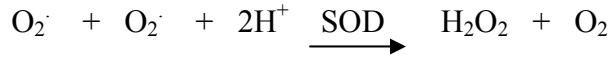
3.Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleme işlemidir. Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller bu tip etki gösterirler.

4.Onarıcı etki: Serbest oksijen radikallerinin yapmış olduğu hasarı tamir etme işlemidir (60).

I. Enzimatik Antioksidanlar

1. Süperoksit Dismutaz (E.C.1.15.1.1)

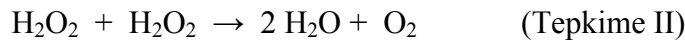
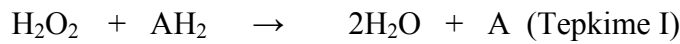
SOD süperoksit anyonunun hidrojen perokside dismutasyonunu katalizler.



SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı başlıca enzimatik savunma mekanizmalarıdır. SOD ile $O_2^{\cdot -}$ 'nin dismutasyonu ile H_2O_2 çıkarılması hücre için biyolojik avantaj sağlar. Hücreden H_2O_2 çıkarılması için SOD; katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile birlikte çalışır (61, 62).

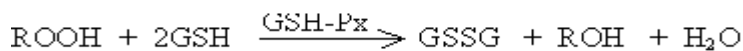
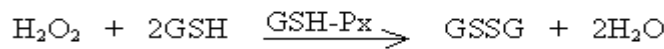
2. Katalaz (E.C. 1.11.1.16)

Katalaz yapısında hem grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir (63). Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve müköz membranda yüksek miktarda bulunmaktadır. H_2O_2 oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle (tepkime I) veya H_2O_2 oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle (tepkime II) hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır.

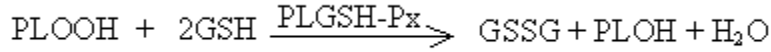
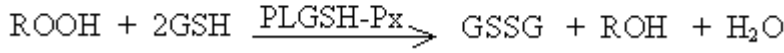


3. Glutatyon Peroksidaz (E.C 1.11.1.9)

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), hidrojen peroksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik ve 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Birbirine kenetli enzim sistemi GSH-Px ve GSH-Rd glutatyon harcayarak H_2O_2 'nin redüksiyonunu katalizler (63).

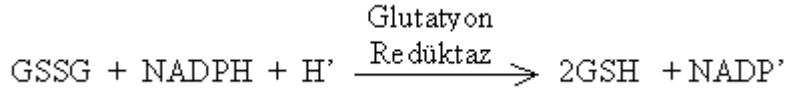


Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) da molekül ağırlığı 20.000 dalton olan, monomerik selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksidlerini, alkollere indirger.



Membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğu zaman PLGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar.

Hidroperoksidlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür.

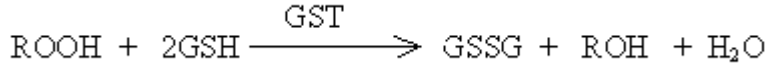


GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller.

Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar.

4. Glutation-S-Transferaz (E.C.2.5.1.18)

Glutation-S-Transferaz (GST)'lar antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Son zamanlara kadar GST'lar katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılmaktaydılar. Daha sonra yapılan çalışmalar bu enzimlerin söz konusu reaksiyonların herhangi birine özgül olmadığını, iç içe geçmiş substrat özgüllüğüne sahip olduğunu ortaya koymuş ve bunlar 'glutatyon-S-transferaz' lar adı altında toplanmıştır. Günümüzde ise türe bağımsız bir sınıflama yapıldığında GST'lar geleneksel olarak üç sitozolik bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar. Başta araşidonik asid ve lineolat hidroperoksidleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı GST'lar Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar.

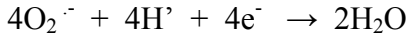


Homodimerik veya heterodimerik enzimler olan GST'lerin, araştırılan tüm canlı türlerinde bulunması bunların hayati öneminin göstergesidir. Bu enzimler katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; yabancı maddeleri glutatyon (GSH)'daki sisteine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar. Bu yol, GST'lerin kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu gösterir.

Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimler için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir. Birçok pigment (bilirubin, hematin, bromsülfattalein, indosiyanın gren gibi), kolik asitler, steroid hormonlar, polisilik aromatik hidrokarbonlar bu proteinler tarafından bağlanıp taşınabilmektedirler.

5. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir.



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak, süperoksid üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar.

II. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

1. C Vitamini (Askorbik Asit)

C vitamini, Suda çözünme özelliği gösterir; ancak lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur.

C vitamini, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. E vitaminin rejenerasyonunda görev alarak tokoferoksil radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte LDL oksidasyonunu etkili bir şekilde engellemiş olur.

C vitamini, fagositoz için de gereklidir. Bu vitaminin kemotaktik cevabı artırdığı görülmüş; oksidatif patlama sırasında çevreye yayılan reaktif bakterisidal moleküllerin bakterisidal etkisini sağlayan intrasellüler konsantrasyonlarında bir azalma yapmadan, oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini önlediği gözlemlenmiştir.

C vitamini, organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgen (redüktan) olarak görev yapmaktadır. Prokollajenin yapısında yer alan lizin ve prolinin hidroksilasyonundan sorumlu enzim olan protokollajen hidroksilazın yapısında C vitamini kofaktör olarak görev yapar. Bu hidroksilasyon reaksiyonu olmaz ise kollajen fibrilleri arasında çapraz bağlantılar oluşmayacak ve kollajen dokunun bütünlüğü bozulacaktır. Benzer şekilde C vitamini, γ -bütirobetainin hidroksilasyonu ile karnitin oluşumunda rol oynar. Tirozin metabolizmasında, mikrozomal ilaç metabolizmasında, adrenallerde epinefrin ve antiinflamatuvar steroidlerin sentezinde, folik asit metabolizmasında ve lökosit fonksiyonlarında C vitamini etkili olmaktadır. C vitaminin bu işlevleri özellikle Fe^{+2} enzim sistemleri üzerindeki indirgen etkisine bağlıdır.

Askorbik asit güçlü bir indirgeyicidir. Dehidroaskorbik asit ile bir redoks sistem oluşturur. Standart şartlarda oksidan ve redüktan kapasitesi eşittir. Ancak fizyolojik şartlarda bu eşitlik sağlanamadığı için askorbik asit elektron vericisi olarak görev yapar. Bu özelliğinden dolayı biyolojik sistemlerde askorbik asitin en önemli fonksiyonu hidrojen taşıyıcısı olarak rol oynamasıdır. Askorbik asit suda çözünen süperoksit (O_2^-), single oksijen ($O_2^{\uparrow\downarrow}$) ve hidroksil radikalleri ($OH\cdot$) ile direkt olarak reaksiyona giren zincir kıran bir antioksidandır.

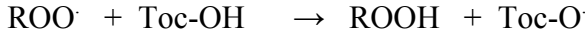
Askorbik asitin diğer bir özelliği, antioksidan etkisinin yanında pro-oksidan etki de göstermesidir. Askorbik asit metal iyonlarının varlığında pro-oksidan gibi rol oynar. Askorbik asit ferri demiri (Fe^{+3}) ferro demire (Fe^{+2}) indirgeyen süperoksit radikali (O_2^-) dışındaki tek hücreli ajandır. Bu yolla askorbat, proteine bağlı olan ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek fenton reaksiyonunda hidrojen peroksitle (H_2O_2) etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani hidroksil radikalleri ($OH\cdot$) üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı askorbik asit serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir pro-oksidan olarak değerlendirilir. Fakat bu etkisi sadece düşük konsantrasyonlarda görülmekte olup daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki göstermektedir (64).

2. AVitamini (Beta Karoten)

β -karoten yağda çözünen bir antioksidan olarak serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksyonuna girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu önler (62, 63).

3. E Vitamini (α -Tokoferol)

α -Tokoferol yağda çözünen ve zincir-kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi serbest oksijen radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki yağ asitlerini korumaktır. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membran fosfolipitlerinin α - tokoferole karşı çok yüksek affinitesi vardır. Tokoferoller fenolik bir hidrojeni, peroksidasyona uğramış bir doymamış yağ asidindeki serbest peroksit radikaline aktarırlar (46). Bunun sonucunda serbest radikal zincir reaksiyonları kırılır.



Oluşan serbest α -tokoferol radikali bundan sonra yeni bir serbest peroksit radikaliyle reaksiyona girer. Böylece α -tokoferol kolay reversible oksidasyona uğramaz. Kroman halkası ve yan zincir şeklindeki serbest olmayan radikal ürününe okside olur. Bu oksidasyon ürünü ikinci konumundaki hidroksil grubu üzerinden glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yoluyla atılır (64).

Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. Bundan dolayı en yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipid yapılarında örneğin eritrosit ve solunum sistemi membranlarında etkileri belirgindir (54, 65).

4. Polifenoller/Flavanoidler

Fenoller, aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren etkili antioksidanlardır, çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir. Bu nedenle diğer radikallere göre etkin olmayan radikallerdir.

5. Transferin ve Laktoferrin

Demiri bağlayarak lipid peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır.

6. Seruloplazmin

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmı akut faz proteini olan seruloplazminden kaynaklanır. Plazmada bakır taşıyan seruloplazmin, demir metabolizmasında da rol oynamaktadır. Seruloplazmin ferro-oksidad aktivitesine sahiptir. Ferro demiri (Fe^{+2}) ferri demire (Fe^{+3}) okside ederek fenton reaksiyonunu, hidroksil radikali oluşumunu ve bu şekilde demir iyonuna bağlı lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Daha az önemli olmakla birlikte süperoksit radikali ile reaksiyona da girer.

7. Albümin

Albümin kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Yüksek konsantrasyonlarda (40 - 60 mg/ml) bulunur. Albumine bağlı bakır, Fenton reaksiyonuna katılabilir fakat albumin yüzeyinde oluşacak olan OH radikali albumin tarafından temizlenir ve radikalın serbest solüsyona kaçmasına izin vermez. Aynı zamanda myeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl'i hızlı bir şekilde temizler.

8. Ürik Asit

Kuvvetli olarak demir ve bakır bağlar. Pek çok serbest radikali plazmadan temizler. C vitaminin oksidasyonunu engeller.

9. Bilirubin

Hem katabolizması ile meydana gelen ve albumine bağlı olarak taşınan bir safra pigmentidir. Süperoksit ve hidroksil radikallerini toplama görevine sahiptir.

10. Melatonin

Kan-beyin bariyerini geçebilen lipofilik etkili güçlü bir antioksidandır. Serbest OH radikalini ortadan kaldıran bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir. Antioksidan etkisi ile kanserin ilerleme ve gelişme safhalarını geciktirir.

11. Glutation (GSH)

Karaciğerde glutamikasit, sistein ve glisinden sentezlenen, suda çözünen antioksidandır. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur.

12. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)

HDL kolesterol, süperoksit ve hidroksil radikallerinin üretimini önleyerek koroner kalp hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterir.

13. Ferritin

Demiri depolayan antioksidan etkili bir plazma proteindir.

14. Mannitol

Ortamdaki OH radikalini toplayarak temizleyen antioksidan etkili bir maddedir. Beyin ödeminin tedavisinde sık kullanılır.

15. Ubikinon (Koenzim Q)

Mitokondriyal ETZ'nde elektron taşınmasında görev alan benzokinon türevi bir koenzimdir.

16. Allopurinol/Oksipurinol

Ksantin oksidaz enzimini inhibe edip, doğrudan hidroksil radikali ve hipoklorit radikalini azaltıcı olarak etki eder.

17. Sistein/Asetilsistein

Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

18. Haptoglobin

Plazmadaki serbest hemoglobini bağlayan bir akut faz reaktanıdır.

19. Adenozin

Adenozin trifosfat (ATP)'in bileşiminde yer alan bir pürin nükleozitidir.

20. Hemopeksin

Hemoglobin hem ve globine parçalandıktan sonra sadece hem grubunu bağlayan bir proteindir.

21. Lipoik asit

Vitamin benzeri antioksidan etkili bir bileşiktir. Diyabetik nöropatide ve Alzheimer hastalığında beyin fonksiyonlarının korunmasında faydalı olduğu belirtilmektedir.

22. Histidin

Bazik etkili yarı esansiyel bir amino asittir.

23. Selenyum

Antioksidan etkili bir enzim olan glutation peroksidazın yapısında yer alan bir eser elementtir.

24. Sitokinler

Hücreler arası iletişimde rol oynayan, immün sistem hücreleri tarafından salınan, enflamasyon ve immünitinin hemen her fazında etkili olan protein yapısında maddelerdir. Sitokinler, başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler. Ancak proteolitik enzimleri de aktive ettikleri için zararlı da olabilirler.

2.3.6. Total Oksidan Seviye (TOS)

Oksidatif stres; vücudumuzda mevcut oksidative-antioksidative dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu meydana gelen patolojik durumdur. Oksidatif stresin toplam değeri; total oksidatif stres veya total oksidan status/seviye (TOS) olarak ifade edilir. Bu fenomen, aşırı reaktif oksijen ve/veya nitrojen türlerinin üretimi veya antioksidan tampon mekanizmasının eksikliği sonucu oluşur. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri toksiktir ve hücrenin lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerine zarar verir. Damar endoteli de bu durumdan kısmen etkilenmektedir.

2.3.7. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Total antioksidan kapasite (TAK)'yi gösterir. Normal koşullarda organizma, endojen ve eksojen serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Vücutta oluşan oksidan durumların tamponize edilmesinde kan çok önemli bir rol oynamaktadır. Kan, antioksidanların tüm vücuda dağıtılmasını sağlar (66).

TAS'a en büyük katkı plazmada bulunan antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi proteinler yanında serbest radikalleri kapan zincir kırıcı antioksidanlar da bulunmaktadır. Albümin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin % 85'inden fazlasını oluşturur. Bu fark kanda bilirubin, indirgenmiş glutation (GSH), flavanoidler, alfa-tokoferol ve beta-karoten gibi antioksidan maddelerin miktarının albümin, ürik asit ve askorbik asit miktarından az olmasından kaynaklanmaktadır. Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir antioksidan etki oluşmaktadır. Bu sinerjik etkiye örnek olarak; glutationun askorbatı, askorbatın da tokoferolü yeniden aktifleştirmesi verilebilir. Total antioksidan seviyesinin ölçümü, antioksidanların tek tek seviyelerinin ölçümünden daha değerli bilgiler verir. Bu yüzden kanın antioksidan düzeyi durumunu saptamada bireysel antioksidanlardan ziyade bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır (67, 68).

2.3.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Total peroksitlerin, total antioksidanlara bölünmesiyle elde edilen oransal bir indekstir. OSI'nin yüksek olması oksidatif stresin arttığını gösterir (69, 70).

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi (OSI)} = \frac{\text{Total Oksidan Seviye (TOS)}}{\text{Total Antioksidan Seviye (TAS)}}$$

2. 4. Prolidaz

2. 4. 1. Prolidazın Tanımı

Prolidaz hidrolazlar sınıfına ait, Mn^{+2} ile aktive olan bir metalloenzimdir (71, 72). Uluslararası sınıflandırmaya göre; EC 3.4.13.9 sınıfında yer alır. Hidrolazlar çeşitli bağların hidrolizini kataliz ederler. Bu bağlar; C-O, C-N, C-C ve fosforik anhidrit bağını da içeren bazı bazlardır. Prolidaz enzimi karboksil terminal pozisyonundaki prolin veya hidroksiprolin içeren dipeptitlerin hidrolizini katalizler.

Prolidaz, domuz intestinal mukoza artıklarında aminopeptidaz ve karboksipeptidaz aktivitelerinin araştırılması sırasında keşfedilmiştir. Prolidaz, bir alt grup olarak saflaştırılmış, domuz böbreği ve domuz, sığır ince bağırsağından elde edilmiştir. 1937 yılında Bergmann ve Fruton glisil-prolin'in önceden bilinen peptidazlardan farklı, intestinal mukozal bir enzim tarafından hidroliz edildiğini saptamışlardır. O tarihten itibaren prolidaz adı verilen bu enzimin pek çok memeli dokusunda varlığı gösterilmiştir (73, 74). Enzim yaklaşık 70 yıl önce bulunmasına rağmen önemi 35 yıl önce eksikliği ile ilgili çalışmaları yapıldığında anlaşılmıştır (75).

2. 4. 2. Prolin

Prolin esansiyel olmayan bir imino asittir. Glutamatın halka yapısındaki bir türevidir. Prolin sentezinde glutamatın γ -karboksi grubunun ATP ile tepkimeye katılması sonucu γ -glutamilfosfat oluşmaktadır. Bunun NADPH ile indirgenmesi sonucu oluşan glutamat γ -semialdehit sonra kendiliğinden Δ -prolin-5-karboksilat oluşturmak üzere halkalaşmakta ve bu

yapı indirgenerek prolini oluşturmaktadır. Prolin katabolizmasında prolin oksidaz ile prolinden oluşan Δ -prolin 5-karboksilat, glutamat γ -semialdehit ile ornitine transamine olabilmekte veya glutamata oksitlenmektedir.

Prolinin diğer amino asitlerden farkı R grubunun hem amino grubu hemde α karbon grubuna bağlı olarak siklik bir yapıya yol açmasıdır.

Benzersiz yapısal özellikten dolayı prolin bir peptit sekansına girdiği zaman önemli konfarmasyonel özellikler gösterir. Bu aminoasidin siklik yapısı polipeptit omurganın yapısal yönlerine temel sınırlamalar getirmektedir. Prolin siklik yapısının sonucu olarak hiçbir fonksiyonel grup içermez ki bu durumda hidrojen bağına veya peptit bir bağı rezonans stabilizasyonuna katılmayı engeller bu nedenle prolin α helix veya β tabakalı sekonder yapılarına uyumlu olmayan tek amino asittir. Kemik, tendon ve destekleyici membran dokularını ana bileşeni olan kollejen, prolinin yapısal özelliklerine belirgin bir şekilde bağlıdır.

Prolinin siklik yapısı α karbon ve nitrojenin bir peptit bağındaki rotasyon açısını sınırlamaktadır ki normal olarak bitişik amino asitlerin reel grupları arasındaki siterik engelleme veya elektrostatik repulsiyona bağlıdır. Prolin potansiyel bir yapı kırıcı olan ve peptit zincirlerinin yönünü değiştirme eğilimine sahip, peptit zincir içine sabit bir eğim takdim eder. Proteinlerin yüzeyindeki ters bir dönüş veya saç tokası eğimi şeklinde önemli yapısal olayın proteinler içindeki en önemli sonucu prolin tarafından oluşturulmasıdır.

Prolin ve hidroksiprolin, kollajen yapısında yer alan en önemli amino asitlerdir. Prolin türevleri olan 3-hidroksiprolin ve 4-hidroksiprolin karışık fonksiyonlu oksijenazlar kullanılarak polipeptit zincirinde bulunan prolin kalıntılarından elde edilmektedir. Hidroksiprolinin hidroksiprolin oksidaz ile parçalanması sonucunda glioksalat ve pirüvat oluşmaktadır.

Prolin, biyolojik olarak aktif peptitlerin enzimatik degradasyonuna karşı korunmasını sağlamaktadır. Bu durum peptit veya protein prekürsörlerinin post translasyonel modifikasyonlarının regülasyonunda açıkça bellidir. Polipeptit zincirinin içinde yerleşik olan prolin amino asitleri, zincirlerin enzimatik süreci öncesinde modifikasyon bölümünde bulunur ve polipeptit zincirinin hassasiyetini proteolizle sınırlayan yapısal unsurlar olarak hareket eder. Bu durum peptitlerin post-translasyonel modifikasyonunda görev alan ekzoepdidazların özelliği ile ilişkili araştırmalarda gösterilmiştir. Pek çok biyolojik olarak

aktif peptitlerin amino ucuna yakın yerlerde ortaya çıkan prolin gözlemiyle desteklenmektedir .

Prolin ve hidroksiprolin prolidino halkasındaki azot atomuna bir hidrojen atomunun girmesi ile oluşmaktadır. Bunlar genelde imino asit ismiyle adlandırılır. L-prolin amino asitlerin hücre dışı havuzunun temel bileşenidir. Bunu sadece glutamin ve alanin amino asitleri takip eder. Hidroksiprolin öncelikle vücut sıvılarında oligopeptitlerde bulunmaktadır. İnsanlarda hidroksiprolinin yapısı 4-hidroksi –L-prolin şeklindedir ve vücut sıvılarında daha az bulunur. Protein yapısında bulunan hidroksiprolin peptide bağlı prolinin hidroksillenmesi ile oluşmaktadır (76)

Prolin ayrıca Krebs ve üre döngüleriyle metabolik olarak bağlantılıdır. Δ -prolin-5-karboksilik asit prolin metabolizmasında iki döngüyü birbirine bağlayan bir pozisyondadır. Prolinin karbon zincirinden Krebs döngüsüne geçişi, tüm dokularda bilinen klasik yoldan 2-oksaglutarik asit metabolizması ile olur (77).

2.4.3. Prolidazın Yapısı

Prolidaz enzimi birçok memeli dokusunda ve mikroorganizmalarda dağılım gösterir. Doğal, sitoplazmik, homodimerik bir metalloenzimdir. Mn^{+2} prolidaz enzimi aktivitesini 5-10 kat arttırmaktadır. Mn^{+2} 'a ek olarak enzimin maksimum aktivitesi için aktif merkezinde arjinin ve anyonik amino asit artıklarının olması gerekir (76).

Proteazlar hep monomer yapıda olmasına rağmen tüm prolidazlar dimer yapı gösterirler ve ancak bu şekilde katalitik aktivite gösterirler (78). Prolidaz glikoprotein yapısındadır ve ağırlık olarak %5 karbonhidrat içermektedir. Prolidazın saptanan sekonder yapısında α -heliks (%33), β -tabakalı (%41) ve 30 potansiyel beta bağlantı bölgelerine eşit bir şekilde dağılmış hidrofobik ve hidrofilik alanlar bulunmaktadır. Enzimin primer sırası bilinen proteinlere benzemez fakat bazı sıraları (%29'dan fazlası) F_1 -ATP az'ın α ve β subünitelerinin sırasına benzerlik göstermektedir (76, 79).

Prolidaz enziminin aktif merkezinde tiyol grubu yer alır ve bu grup bloke edilirse aktivite düşer. Bu da sisteinin enzimin aktivitesi için gerekli olduğunu gösterir. Doğal enzim için optimum pH: 7.6-7.8'dir ve izoelektirik nokta pH:4.4-4.5 olarak saptanmış olup bu değer yapıdaki asidik amino asitlerin varlığını belirtmektedir (76). Enzimin karakteristiği

araştırıldığında DEAE (Dietilaminetil) selüloz dizi kromatografisinde prolidazın iki pik verdiği görülür (78).

Bai Hu 1992 yılında yapmış olduğu çalışmada prolidazda her monomer için iki aktif bölgenin olduğunu saptamış ve enzimin duruma bağlı olarak bu iki aktif bölgenin substrat spesifikliğı ve Mn^{+2} ile preinkübasyon ortamındaki aktivasyon bakımından da farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur (78).

2.4.4. İnsan Prolidazının Primer Yapısı ve Gen Lokalizasyonu

Prolidaz geni sembolü PEPD'dir ve insanda 19 numaralı kromozomun kısa kolunda lokalizedir (19p 13,2 bölgesi). İnsan cDNA 'sı 1482 baz çiftinin okunmasıyla oluşur bu da 493 amino aside karşılık gelmektedir (79). Enzimin komplementer DNA klonları insan karaciğeri ve plesental cDNA bankalarında izole edilmiştir.

Prolidazın nükleotit sırası saptanmıştır. Enzim amino asit olarak X-Ala-Ala-Ala sırası ile başlamaktadır (80). Prolidaz geni (PEPD) polimorfik allelleri içerir, bu aktiviteyi engellemez ve nadir alleller prolidaz eksikliğine neden olmaktadır (76). Amino asit sırasının saptanması ve gen lokalizasyonu, enzimin eksikliğinin sebep olduğu kalıtsal hastalığın temelini anlaşılması bakımından önemlidir. Prolidazın genomik sırası oldukça geniştir. En az 130 kb ve 15 ekson içermektedir. Ekson intron bağlantılarındaki tüm konformasyonlar GT/AG kuralına uymaktadır. Kodlama sırası genomik sıranın % 2 'sinden oluşur.

2.4.5. Prolidazın İzoenzimleri

Dietilaminoetil selüloz dizi kromatografisi (DEAE) ile deri fibroblast kültürüleri ve normal insan eritrositlerinden ayrıştırılan prolidazın 2 formunun olduğu görülmüştür (81). Bunlar prolidaz I ve prolidaz II olarak isimlendirilmiştir. Bu iki izoenzim substrat spesifitesi ile bazı kimyasal özellikler bakımından farklılıklar gösterirler (82). Bu iki izoenzimi ilk izole eden Butterworth ve Priestman olmuştur (1985). Sonra Myara ve arkadaşları 1987 ve 1989 yılında (83, 84), Ohhashi ve arkadaşları ise 1990 yılında izoenzimleri izole etmeyi başarmışlardır.

İzoenzimlerin molekül ağılıkları saptanmış ve prolidaz I'in molekül ağırlığının 112 kDa olduğu ve birbirini tamamlayan eşit molekül ağırlığında 2 subüniteden oluştuğu (56kDa)

bulunmuştur (82). Prolidaz II'nin ise molekül ağırlığının 185 kDa olduğu ve birbirine eş iki subünitenden (95 kDa) oluştuğu gözlenmiştir (85, 86).

Prolidaz I tüm insan dokularında bulunur. Yapılan çalışmalarda prolidaz I'in tüm iminodipeptitlerle reaksiyona girmesine rağmen gly-pro dipeptitini tercih ettiği bulunmuştur. Cosson ve arkadaşları 1992'de prolidaz II'nin gly-pro dipeptidine karşı düşük bir aktivite gösterdiğini ve bu izoenzimin plazmada bulunmadığını kaydederek preinkübasyonun uzaması ile aktivitenin önemli ölçüde düştüğünü göstermişlerdir. Prolidaz II'nin en yüksek aktiviteyi gly-pro yerine met-pro'ya karşı gösterdiği saptanmıştır (82).

Prolidaz I'i *in vitro* tespit etmek için optimum şartlar; 1Mm $MnCl_2$ konsantrasyonunda 24 saat $37^\circ C$ 'de preinkübasyon olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Mn^{+2} konsantrasyonunun yükseltilecek zamanın azaltılabileceğini ya da yüksek preinkübasyon ısısı, düşük $MnCl_2$ konsantrasyonu ve düşük preinkübasyon zamanı kullanılabileceği kaydedilmiştir (87). Cosson ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda prolidaz I ve prolidaz II'yi kromatografik olarak ayırdıktan sonra izoenzimlerin farklı doku dağılımları gösterdiklerini bulmuşlardır (82).

Araştırmacılar karaciğer kaynaklı prolidaz II'nin karaciğerde inhibe edildiğini saptamışlardır. Bu inhibisyona ise plazma proteinlerinin sebep olduğunu belirtmişlerdir. Haptoglobulin, α_2 makroglobulin ve α_1 antitripsinin prolidaz II'nin aktivitesinde etkili olmadığı, fakat saf albuminin altı saatlik inkübasyondan sonra aktiviteyi ortadan kaldırdığı görülmüştür. Albuminin bu inhibitör etkisine dayanarak insan plazmasında prolidaz II'nin aktivitesinin olmadığı açıklanmıştır (82, 87).

2.4.6. Prolidaz İnhibitörleri ve Aktivatörleri

Yapılan çalışmalarda enzimin aktivasyonu için gerekli olan Mn^{+2} iyonu yerine başka metal iyonlarının ilavesi ile inhibisyon olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalar domuz böbrek prolidazı üzerinde 1957 yılında yapılmıştır. Fe^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Ag^{+1} , Hg^{+2} , Pb^{+2} ve Pt^{+4} iyonlarının prolidazı inhibe ettiği bulunmuştur. Ortalama 0,001-0,0004M aralığındaki konsantrasyonlarda glutatyon kullanıldığında optimal stabilizasyon ve aktivite sağlandığı ancak glutatyonun yüksek konsantrasyonunun inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur. Aynı araştırmacılar iyodoasetamin ve p-kloromerküri benzoatın da enzimi inhibe ettiğine değinmişlerdir (74).

Prolidazın substrat analogu olan asetilprolin ve trans-1,2 siklopentadikarboksilikasit tarafından kompetatif inhibisyonunda K_1 'in pH'ya bağılı olarak izledikleri yolu araştırdıklarında enzimin fonksiyonel grubu ile substratın pKa: 6,6'da bağılandığını bununla birlikte bu maddelerin inhibisyonunun farklı yollar izlediğini görmüşlerdir (88).

2.4.7. Prolidazın Kollajen Yapım ve Yıkımında Önemi

Kollajenler, hayvansal bağı dokunun temel bileşeni olup vücutta en fazla bulunan proteinlerdir. Bağı doku iskeletinin yapısını oluşturan kollajen, inflamasyon ve yara iyileşmesinde temel rol oynar. Kollajenin aminoasit kompozisyonu %33 glisin, %20 - 25 prolin ve hidroksiprolin, %5 - 11 lizin ve hidroksilizinden oluşur. Farklı genler tarafından kodlanan en az 15 tip kollajen vardır. Tip I, II, III, V ve XI fibriller kollajen olarak isimlendirilir. Kollajenler birçok dokuda fibroblastlar tarafından sentezlenirler. Ribozomlarda preprokollajen olarak başlayan sentez sitozolde prokollajen şeklinde devam eder ve hücre dışı alanda tropokollajen ve kollajen oluşumu ile sonlanır. Kollajen molekülleri alfa zincirleri adı verilen, birbiri etrafında üçlü heliks halinde sarılarak ip benzeri yapı oluşturan üç polipeptitten meydana gelir. Polipeptit yapılarının her üç pozisyondan birinde en küçük aminoasit olan glisin bulunur. Glisin heliksin üç zincirinin bir araya geldiğı kısıtlı alana sığmaktadır. Glisin kalıntıları, Gly-X-Y olarak tekrarlayan, X'in genelde prolin ve Y'nin hidroksiprolin veya hidroksilizin olduğı zincirin bir parçasıdır. Kollajen diğer birçok proteinde bulunmayan hidroksiprolin ve hidroksilizin içerir. Hidroksiprolin kollajenin üçlü heliks yapısının dayanıklılığını sağlamada önemlidir. Kollajenin yarı ömrü 50 - 300 gündür. Bu ömür; gelişme, büyüme, doku yapımı ve yara iyileşmesi gibi durumlarda uzar. Kollajenlerin yıkımı genellikle nötral pH'da aktif olan pek çok matriks metalloproteinazlarının (kollajenazlar) sinerjistik aktivitesinin bir sonucudur. Bununla birlikte jelatinaz, stromelizinler, polimorf elastaz ve katepsin gibi nonspesifik proteinazlar da bu yıkıma katılırlar. Kollajenazlar; fibroblast, kondrosit, osteoblast ve endotelial hücrelerden latent proenzim formunda salınırlar ve plazminle aktivasyonu takiben çapraz bağı kollajeni parçalayarak dipeptitlere ayırırlar. Bu dipeptitler de prolidaz, prolinaz ve diğer dipeptidazlar tarafından serbest aminoasitlere parçalanırlar.

Prolidazın bütün biyolojik fonksiyonunun prolin döngüsüyle beraber kollajen dejenerasyon ürünleri ve diğer Xaa-Pro dipeptidlerin metabolizması olduğına

inanılmaktadır. Prolidaz, C-terminalinde aminoasidi prolin veya hidroksiprolin olan dipeptidleri hücre içinde hidroliz eder. Prolin yeniden döngüye girer ve yeni protein sentezinde kullanılırken hidroksiprolin idrarla atılmaktadır (71, 89). Kollajen yapısındaki aminoasitlerin yaklaşık %25'ini prolin ve hidroksiprolin oluşturduğundan, prolidaz kollajen yıkımında önemli rol oynamaktadır (90). Prolidaz, hücre içi protein yıkımının son basamağında, özellikle yüksek miktarda prolin içeren prekollajenin yıkımı aşamasında rol oynamaktadır (82, 87). Enzim için substrat kaynağı kollajen olup iminopeptidler kollajenin yıkımının son basamağında ortaya çıkmaktadır. Prolidaz, beslenme ile alınan proteinlerden ve vücuttaki depo kollajeninden imino asitlerin geri kazanılmasında önemli rol oynar (91). Prolidaz, C-ucunda prolin veya hidroksiprolinin imino azotunu içeren peptid bağı bulunduran bileşiklerin hızla hidrolizini katalizleyen tek enzim olduğu için spesifitesi yüksektir (78). Prolidaz eksikliği prolinin normal döngüsündeki bozulmayla sonuçlanır. Prolidaz eksikliğinde büyük miktarda hidroksiprolin üre ile dışarı atılır. Prolidaz enzim aktivitesi eritrosit, lökosit ve fibroblastlarda çok düşüktür. Etkilenen hasta bireylerde prolidaz enzim aktivitesi saptanamaz. İminopeptidüri, aynı zamanda raşitizm, hiperparatiroidizm ve Paget Hastalığı gibi durumlarda da tanımlanır. Fakat İminopeptidüri prolidaz eksikliğinde çok daha yüksektir.

Prolidaz eksikliği cilt ve diğer kollajen dokularda anormalliklerle karakterize bir sendromla sonuçlanır. Bu nadir görülen genetik prolidaz eksikliği otozomal resesif olarak geçmektedir. Prolidaz geni başka bir kalıtsal rahatsızlık olan miyotonik distrofi ile ilgili olması açısından önemlidir.

Prolidaz enzimi uzun zamandan beri bilinmesine rağmen önemi, son yıllarda eksikliği ile ilgili çalışmalarla iyice anlaşılmıştır (92 - 94). Bu yüzden bu konuda az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğu da eritrosit prolidazı ile ilgili olup serum prolidazı hakkında çok şey bilinmemektedir. Prolidaz enziminin genetik eksikliğinin sonucunda mental gerilik, tekrarlayan infeksiyonlar ve deri lezyonları ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıktığı bildirilmiştir (91, 95). Prolidaz eksikliği olan kişilerde prolidaz I aktivitesinin deri fibroblast kültüründe ve kan hücrelerinde azaldığı da gösterilmiştir (96).

Fetal büyüme sırasında kollajen turnoverinin yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Dismatür bebeklerde prolidaz aktivitesi (amniyotik sıvıda) anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu nedenle prolidaz aktivitesinin fetal matürasyonun derecesini gösterdiği

düşünülmektedir. Amniyon sıvısında ölçülen prolidaz aktivitesinin fetal matürasyonun ve gelişme geriliğinin bir indikatörü olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir. Ayrıca kollajen metabolizmasında bozuklukla seyreden silikozis hastalığının tedavisinde de prolidaz enziminin kullanılması hedeflenmektedir. Böylece hızla kollajen yıkımı ile seyreden silikozis hastalarında prolidaz enzim aktivitesinin artırılması tedavide faydalı bir yaklaşım olarak düşünülmektedir (97).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hasta Seçimi

Bu çalışmaya; Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Genel Yoğun Bakım Ünitesinde, 2008 Ocak ve 2009 Ocak tarihleri arasında, primer akciğer patolojisi düşünülmeyen, serebrovasküler olay - iskemi (SVO – İ) ve serebrovasküler olay - kanama (SVO – K)'ya bağlı solunum yetmezliği olan ve MV tedavisi uygulanan 30 – 70 yaş arası, araştırma dışı kriterleri bulunmayan 26 erişkin hasta dahil edildi.

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 24. 04. 2008 tarih, 03 nolu oturum, 12 nolu kararındaki onayı ve bilinci kapalı olan hastaların veli veya vasisinin yapılacak işlemler hakkında bilgilendirilip yazılı onayı alındıktan sonra, çalışmaya dahil edilen tüm hastaların mekanik ventilatör tedavisi görmeye başladıkları gün fizik muayeneleri yapıp hemogramları ve biyokimyasal parametreleri kaydedildi.

Hastalara MV endikasyonu Tablo 1'deki parametrelere göre konuldu.

3.2. Çalışma Dışı Bırakma Kriterleri

Kardiak hastalık anamnezi, akciğer hastalığı anamnezi (Kronik obstrüktif ve restriktif akciğer hastalığı, akciğer kanseri, kollagen doku hastalığı) ve sigara içme öyküsü olan, pnömotoraks bulunan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

3.3. Demografik Veriler

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların mekanik ventilatör tedavisi görmeye başladıkları gün, adı, soyadı, yaşı, kilosu, ideal vücut ağırlığı, boyu, cinsiyeti, sigara içip içmediği, tanısı, mevcut tanısı dışında ek patolojisi olup olmadığı, SOFA ve APACHE II

koma skorları, beslenme durumları, entübasyon sonrası 3. saatteki kan gazı, hemogram ve biyokimya parametreleri kaydedildi. 3- 5- 7. günlerde ise, SOFA ve APACHE II koma skorları, beslenme durumları, kan gazı, hemogram ve biyokimya parametreleri yeniden değerlendirilip kaydedildi.

3.4. Yoğun Bakımda Hasta ve Mekanik Ventilatör Hazırlığı

Çalışmaya dahil edilen hastalara EKG monitörizasyonu için elektrodlar D II derivasyonu olacak şekilde yerleştirildi. Periferik puls oksimetri monitörizasyonundan (Viridia CMS M1166A, Hewlett Packard, Almanya) sonra hastaların beslenebilmesi ve oral ilaçlarını alabilmesi amacıyla nazogastrik sonda, idrar takibi için foley sonda takıldı. Hastalara invaziv hemodinamik monitörizasyon ve arteriyel kan gazı takipleri için, el arteriyel dolaşımını değerlendiren Allen Testi yapıldıktan sonra serum takılmayan koldaki radyal artere lokal anestezi sonrası, 18G arteriyel kanül yerleştirildi. Arteriyel kan gazı analizi için kan alındı. Arteriyel monitörizasyon yapıldı. CVP (Santral venöz basınç) takibi ve parenteral beslenme amacıyla, Seldinger Tekniği kullanılarak lokal anestezi sonrası sağ subklavyen ven den santral ven kanülasyonu yapıldı. Kanülyasyondan altı saat sonra pnömotoraks kontrolü için PA Akciğer Grafi çekildi. Monitörizasyon sonrası, hastaların ventilatör ayarları yapıldı. Ventilatör, SIMV modunda, FiO₂ hasta mekanik ventilatöre bağlandığında %100 ile başlanıp kangazı sonuçlarına göre tedricen düşülerek, mümkün olduğunca kısa sürede (en geç ilk üç saat içinde) % 40'a sabitlenip, VT 0,6 ml/kg, PEEP 5, f: 10-12, İ:E 1:2 olacak şekilde standardize edildi. Ventilatör ayarları kangazı sonuçlarına göre, pH: 7.35 – 7.45, PCO₂: 35-45 mmHg, PO₂: 80-100 mmHg, cHCO₃: 22-26 mmol/L olacak şekilde sabah ve akşam olmak üzere tekrar düzenlendi.

Hastaların ilk günlük SOFA ve APACHEE II skorları hesaplanıp kaydedildi.

Tüm hastalara 1. gün, günlük kalori ihtiyacı, ideal vücut ağırlığına ve Haris-Benedict Formülüne göre kilo kalori cinsinden bazal enerji tüketimi (kilo kalori /24 saat), kilogram olarak ağırlık, santimetre olarak boy ve yıl olarak yaş kullanılarak;
Erkeklerde: $666 + (13.7 \times \text{ağırlık kg}) + (5 \times \text{boy cm}) - (6.8 \times \text{yaş})$
Kadınlarda: $655 + (9.6 \times \text{ağırlık kg}) + (1.8 \times \text{boy cm}) - (4.7 \times \text{yaş})$
şeklinde hesaplandı. Enteral nutrisyon desteği 25 ml/saatlik bir hızla başlatılıp 36. saatte yeterli kaloriye ulaşıldı.

Günlük sıvı dengesi hesaplamaları yapılarak sıvı tedavisi tekrar düzenlendi. Rutin biyokimya sonuçlarına göre glikoz 70 – 105 mg/dl olacak şekilde ayarlandı. Albumin düzeyi 2,5 g/dl' nin altına düşen hastalara 3x100 ml Human Albumin verildi. Na: 135 - 150 mEq/L, K: 3.5 - 5.1 mEq/L, Ca: 8.4 - 10.6 mEq/L olacak şekilde gerekli elektrolit eklemeleri yapılarak elektrolit dengesi sağlandı. Hemogloblin düzeyi 8 g/dl'nin altına düşen hastalara eritrosit süspansiyonu verilip hemogloblin düzeyi 8-12 g/dl arasında tutulmaya çalışıldı. Mekanik ventilatöre bağlı hastalardan 1- 3- 5- 7. günlerde non bronkoskopik teleskopik yöntemle bronkoalveoler lavaj (BAL) örnekleri ve kan örnekleri alındı. Hastaların hemodinamik ve ventilatör parametreleri, arteryel kan gazı değerleri kaydedildi. BAL örnekleri, endotrakeal tüp içinden 20 mL steril salin verildikten sonra, non bronkoskopik teleskopik bronkoalveoler lavaj kateteri (Combicath, Plastimed, France) yardımı ile elde edildi. Kan örnekleri 5 cc lik biyokimya tüpünde biyokimya laboratuarına gönderildi. Elde edilen örnekler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip -80°C derin dondurucuda çalışma zamanına kadar muhafaza edildi. Çalışma günü serum ve BAL örnekleri, özet olarak, prolidaz enzim aktivitesi, total antioksidan seviye ve total oksidan seviye durumlarını değerlendirmek üzere çözdürüldü. Prolidaz enzim aktivitesi için kolorimetrik ölçüm yöntemi olan yeni geliştirilen optimize modifiye Chinard Metodu (98, 99), total antioksidan seviye ve total oksidan seviye durumlarını ölçmek üzere Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntem (Rel- Assay marka ticari kitler) kullanıldı (68 – 70).

3.5. Kullanılan Araç ve Gereçler

- 1- Mekanik Ventilatör (Galileo Hamilton Medical, Drager Evita XL)
- 2- Non bronkoskopik teleskopik bronkoalveoler lavaj kateteri (Combicath, Plastimed, France)
- 3- Perfüzör (Ascor, Braun Melsungen AG)
- 4- Flocare 800 Enteral feeding pump
- 5- AMS PM- 9000 Express monitör
- 6- Santrifüj (Hettich® Universal 30 RF)
- 7- Spektroflorometre (Shimadzu® RF-1501 MODEL, Japon)

- 8- Derin dondurucu (New Brunswick Scientific® , C54285 model)
- 9- Hassas terazi (Sartorius® marka 0,0001 g'a duyarlı)
- 10- Dijital pH-metre (Hanna® , pH 211 model Japon)
- 11- Otomatik biyokimya analizörü (Aeroset® , USA)
- 12- Vorteks (DCA-VF®-2)
- 13- Visible spektrofotometre (Jasco® V-530 UV/Vİ3 Spektrofotometre)
- 14- Su banyosu (Nüve® BM 402)

3.6. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4: Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde Adı	Firma ve Katalog no
Glisil-Prolin	Sigma® G-3002
Magnezyum klorür	Riedel® (IV) hidrat
Glasiyel asetik asit	Merck® 541
Ortofosforik asit	Merck® 564
Trizma HCl	Sigma® T-3253
Trizma BASE	Sigma® 93349
Ninhidrin	Sigma® N4876
Manganklorür (II)hidrat	Merck® 5917
Glutatyon	Merck®
Sülfürik asit	Merck®
Sodyum klorür	Merck®
O-Dianisidine dihydrochloride	Sigma®
Hidroklorik asit	Merck®
Ferroz amonyum sülfat	Merck®
Hidrojen peroksit	Merck®
Xylenol orange	Sigma®
Glycerol	Merck®

3.7. Prolidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Bu konuda yapılan birçok çalışmada prolidaz enzim aktivitesi ölçümü yöntemi için en sık olarak Chinard tarafından tanımlanan ninhidrin tepkimesi kullanılmıştır (98, 99). Bu

tepkime daha sonradan Myara ve arkadaşları tarafından bazı değişiklikler yapılarak optimize edilmiştir (100). Bu yöntemde $MnCl_2$ (Mangan klorür) ile 24 saat ön inkübasyon yapıp aktive edilen enzim, Gly-pro (Glisil-prolin) substratı ile ($K_m=2,9$ mM) 30 dakika inkübe edilip, açığa çıkan prolin miktarı ölçülerek enzim aktivitesi hesaplanmıştır (101). Biz kendi çalışmamızda Optimize Modifiye Chinard Metodu'nu kullandık.

3.7.1. Serum Prolidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi (Optimize Chinard Metodu)

Substrat olarak glisil-prolin kullanılarak enzim aracılığı ile oluşan prolinin asidik ortamda ısı etkisiyle ninhidrin ile renkli bir bileşik (pembe renk) oluşturma ilkesine dayanarak serum prolidaz düzeyi ölçülür. Rengin şiddeti prolin konsantrasyonuna bağlıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülür.



Deney 3 basamaktan oluşur:

1. Enzim aktivasyonu için; Numunenin Tris-HCl ve $MnCl_2$ ile preinkübasyonu
2. Örnek ile glisil - prolinin inkübasyonu
3. Serbestleşen prolinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi

3.7.1.1. Prolidaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar

1. Ön inkübasyon çözeltisi: pH:7'de 50 mmol/L Tris HCl tamponu içerisinde, 1 mmol/L GSH, 50 mmol/L $MnCl_2$ çözdürüldü.

2. Substrat çözeltisi: Öninkübasyon çözeltisi içerisinde 144 mmol/L glisil-prolin dipeptidi çözdürüldü. Ancak substrat çözeltisi için pH: 7,8'lik Tris HCl tampon kullanıldı.

3. Tepkimeyi durdurma çözeltisi: 1 mL glasiyal asetik asit kullanıldı.

4. Ninhidrin çözeltisi (modifiye (optimize) chinard çözeltisi) : 0,5 mol/L'lik ortofosforik asit içerisinde 3 g/dL olacak şekilde ninhidrin manyetik karıştırıcı ve ısı yadımıyla 70 °C'de eritildi.

İşlem

a-) Yöntemde, 100 µL serum ile 100 µL serum fizyolojik karıştırılıp bu karışımdan 25 µL alınıp, 1 mmol/L GSH ve 50 mmol/L MnCl₂ pH 7'de 50 mmol/L Tris HCl tampondan oluşan ön inkübasyon solüsyonundan 75 µL alınarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.

b-) Karışımın üzerine 144 mmol/L Gly-pro içeren substrat çözeltisinden (pH 7,8) 100 µL eklenerek 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi.

c-) Daha sonra inkübasyonsuz (sıfır zaman) tüpleri hazırlandı. İnkübasyonlu tüplere inkübasyonun sonunda 1mL glasiyal asetik asit ilave edilerek reaksiyon durduruldu. İnkübe edilmemiş örnek bulunan sıfır zaman tüplerine de aynı hacimde glasiyal asetik asit ilave edilip reaksiyon durduruldu.

d-) İnkübasyonlu ve inkübasyonsuz (sıfır zaman) tüplerin üzerine 300uL Tris-HCl tamponu (pH:7,8) ve 1 mL Ninhidrin çözeltisi eklendi.

e-) Yukardaki işlemler uygulandıktan sonra tüplerin ağzı kapatılarak 90 °C' de su banyosunda 20 dakika bekletildi. Daha sonra buzlu su banyosunda soğutulup beklenmeden 515 nm'deki absorbanslar substratın katılmadığı örnek körüne karşı okutuldu. Prolidaz enzim aktivitesi birimi olarak, enzimin Gly-Prolin substratını parçalayarak prolin oluşturduğu basamaktaki 1 dakikada oluşan umol/L cinsinden prolin olarak tanımlandı. Ninhidrin tepkimesindeki prolinin molar absorbans katsayısı 27,2'dir (102 - 106).

3.8. Prolidaz Aktivitesinin Hesaplanması

Prolidaz aktivite düzeyi : $\frac{(A-B) \times [S] \times \text{Faktör}}{S}$

S

A: İnkübasyon tüpü absorbans değeri

B: Sıfır zaman tüpü absorbans değeri (inkübasyonsuz)

[S] : Standart konsantrasyonu (mmol/L)

S: Standart absorbans değeri

Prolidaz aktivite düzeyi : $\frac{(A-B) \times [S] \times \text{Faktör}}{S}$:1litrede 1 dakikada oluşan
S mmol prolin miktarı

Prolidaz aktivite düzeyi : $\frac{(A-B) \times [S] \times \text{Faktör} \times 60}{S}$:1litrede 1 saatte oluşan
S mmol prolin miktarı

Serumda aktivite tanımı: 1µmol substratı 1 dakikada değişikliğe uğratan enzim miktarı olarak yapılmıştır. Birim U/L olarak tanımlanmıştır.

3.9. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metottur.

Total Antioksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar

Reaktif 1: 75 mM Clark tamponu (pH:1,8) içerisinde 10 mM o-dianisidine dihydrochloride ve 45 uM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Clark tamponu (pH:1,8) içerisinde 7,5 mM Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözdürülerek hazırlanır.

240 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır.

Prensip

Fe²⁺-o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir (mmol Troloks Eqv./L) (68).

3.10. Total Oksidan Seviye (TOS)

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir.

Total Oksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar

Reaktif 1: 140 mM NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM H₂SO₄ çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında glycerol çözülüp daha sonra 250 uM xilenol orange çözülerek hazırlanır.

Reaktif 2: Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-dianisidine dihydrochloride çözdürülüp sonra 5 mM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanır.

560 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır.

Prensip

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyona oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv./L}$) (107).

3.11. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Oksidatif Stres İndeksi (OSI); Total Oksidan Seviye (TOS)'nin Total Antioksidan Seviye (TAS)'ye bölünmesi ile hesaplandı.

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi (OSI)} = \frac{\text{Total Oksidan Seviye (TOS)}}{\text{Total Antioksidan Seviye (TAS)}} \text{ (AU)}$$

3.12. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 11.5 (SPSS Inc. Chicago USA) programı kullanıldı. Grupların arasındaki çoklu karşılaştırmalar için Tekrarlı Varyans Analizi ve grup içi karşılaştırmalar için ise Bonferroni Testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama±standard deviasyon olarak belirtildi ve p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Veriler

Bu çalışmaya; Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı Genel Yoğun Bakım Ünitesinde, Ocak 2008 ve Ocak 2009 tarihleri arasında, mekanik ventilatör tedavisi gören 30 – 70 yaş arası, araştırma dışı kriterleri bulunmayan, 26 erişkin hasta dahil edildi. Hastaların 19'u erkek (%73,1), 7'si kadın (% 26,9) olup, ort ± SD olarak ortalama yaş $64,3 \pm 14,13$, ortalama kilo $74,46 \pm 14,07$, ortalama boy $167,69 \pm 6,94$ olarak kaydedildi.

Hastaların APACHE II değerleri ort ± SD olarak 1.gün $23,7 \pm 4,6$; 3.gün $23,5 \pm 4,8$; 5.gün $24,7 \pm 5,3$; 7.gün $23,7 \pm 6,7$ olarak, SOFA değerleri Ort ± SD olarak 1.gün $6,7 \pm 2,7$; 3.gün $6,9 \pm 2,7$; 5.gün $7,7 \pm 3,2$; 7.gün $7,9 \pm 3,1$ olarak saptandı.

Hastaların 1, 3, ,5, 7. gün BAL ve serumlarına ait total antioksidan kapasite, total oksidan seviye, oksidatif stres index seviyeleri ve prolidaz seviyeleri Tablo 5 ve 6'da verilmektedir.

Tablo 5. Hastaların serum prolidaz ve serum Oksidan/Antioksidan parametreleri

	Serum 1. Gün (n= 26)	Serum 3. Gün (n= 26)	Serum 5. Gün (n= 26)	Serum 7. Gün (n= 26)	P Değeri
Prolidaz (U/L)	682,31±11,73	691,30±12,63 ^{a**}	696,20±18,73 ^{b**}	699,95±10,48 ^{c***,e**}	<0,001
Total Oksidan Seviye (µmol H ₂ O ₂ Eqv./L)	17,26±3,87	22,85±6,45 ^{a**}	20,53±7,29	26,91±7,01 ^{c***,e**,f***}	<0,001
Total Antioksidan Seviye (mmol Troloks Eqv./L)	1,02±0,31	0,85±0,26 ^{a**}	0,76±0,21 ^{b***,d**}	0,72±0,16 ^{c***,e**}	<0,001
Oksidatif Stres İndeksi (AU)	1,81±0,60	2,89±1,06 ^{a***}	2,96±1,50 ^{b**}	3,87±1,22 ^{c***,e**,f***}	<0,001

a: 1 ile 3 arasında anlamlı fark vardır.

b: 1 ile 5 arasında anlamlı fark vardır.

c: 1 ile 7 arasında anlamlı fark vardır.

d: 3 ile 5 arasında anlamlı fark vardır.

e: 3 ile 7 arasında anlamlı fark vardır.

f: 5 ile 7 arasında anlamlı fark vardır.

***: p≤ 0,001

** : p≤0,01

* : p≤0.05

Tablo 6. Hastaların BAL prolidaz ve BAL Oksidan/Antioksidan parametreleri

	BAL 1.Gün (n= 26)	BAL 3. Gün (n= 26)	BAL 5. Gün (n= 26)	BAL 7. Gün (n= 26)	P Değeri
Prolidaz (U/L)	2560±434	2203±410 ^{a*}	2590±481 ^{d*}	2122±260 ^{c***,f***}	0,003
Total Oksidan Seviye (µmol H ₂ O ₂ Eqv./L)	45,84±15,79	32,50±10,99 ^{a***}	57,36±18,08 ^{b**,d***}	60,62±14,93 ^{c***,e***}	<0,001
Total Antioksidan Seviye (mmol Troloks Eqv./L)	1,14±0,34	0,93±0,30 ^{a*}	1,22±0,45 ^{d**}	0,86±0,19 ^{c**,f***}	0,028
Oksidatif Stres İndeksi (AU)	4,25±1,60	3,65±1,04 ^{a*}	5,17±2,06 ^{d**}	7,17±1,55 ^{c***,e***,f***}	<0,001

a: 1 ile 3 arasında anlamlı fark vardır.

b: 1 ile 5 arasında anlamlı fark vardır.

c: 1 ile 7 arasında anlamlı fark vardır.

d: 3 ile 5 arasında anlamlı fark vardır.

e: 3 ile 7 arasında anlamlı fark vardır.

f: 5 ile 7 arasında anlamlı fark vardır.

***: p≤0,001

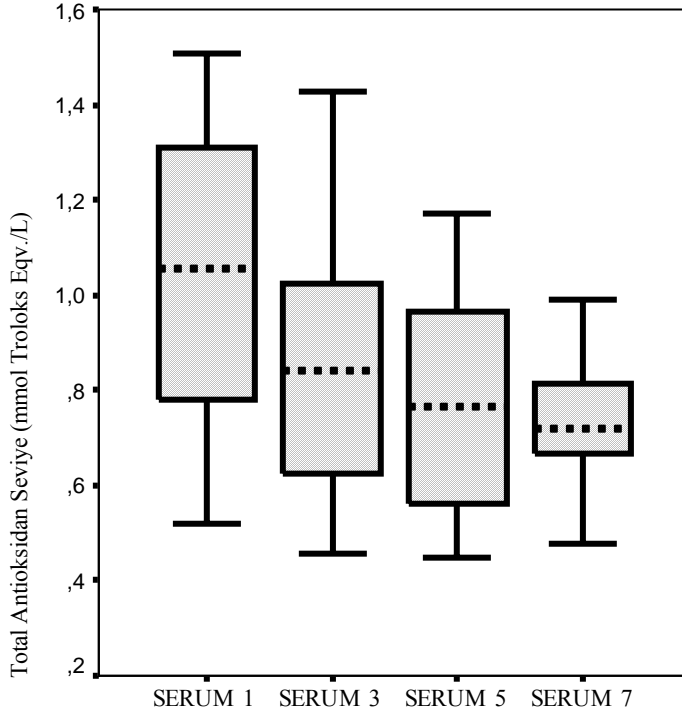
** : p≤0,01

* : p≤0.05

4.2 Hastaların Yoğun Bakımdaki 1, 3, 5, 7. Günlerinde BAL ve Serumlarındaki TAS, TOS, OSİ ve Prolidaz Seviyelerindeki Değişiklikler

4.2.1 Serum TAS Değerleri

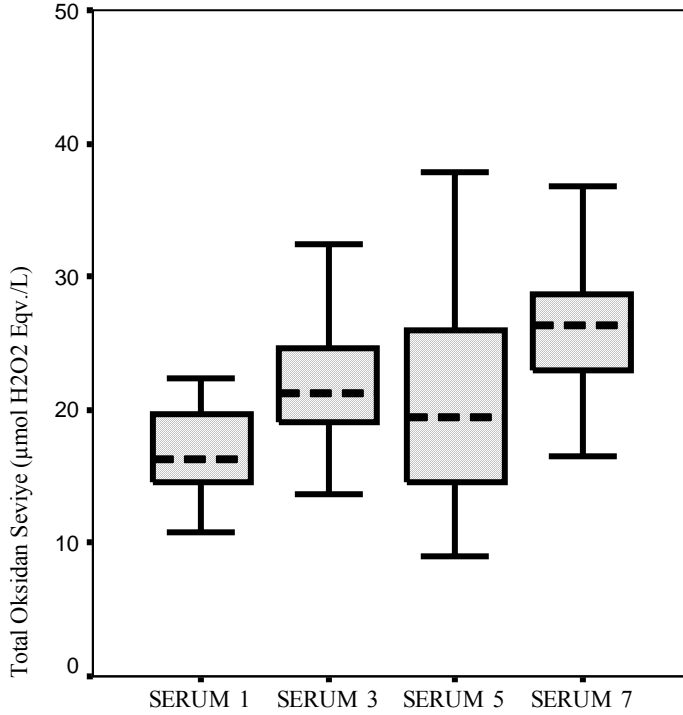
Hastaların serum TAS değerleri karşılaştırıldığında, hastaların yoğun bakım kalış süreleri uzadıkça TAS'ın anlamlı ölçüde düştüğünü tespit ettik ($p < 0,01$), ($p < 0,001$). Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum TAS değerleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları Şekil 4'te gösterilmektedir.



Şekil 4. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum TAS'ları arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

4.2.2 Serum TOS Değerleri

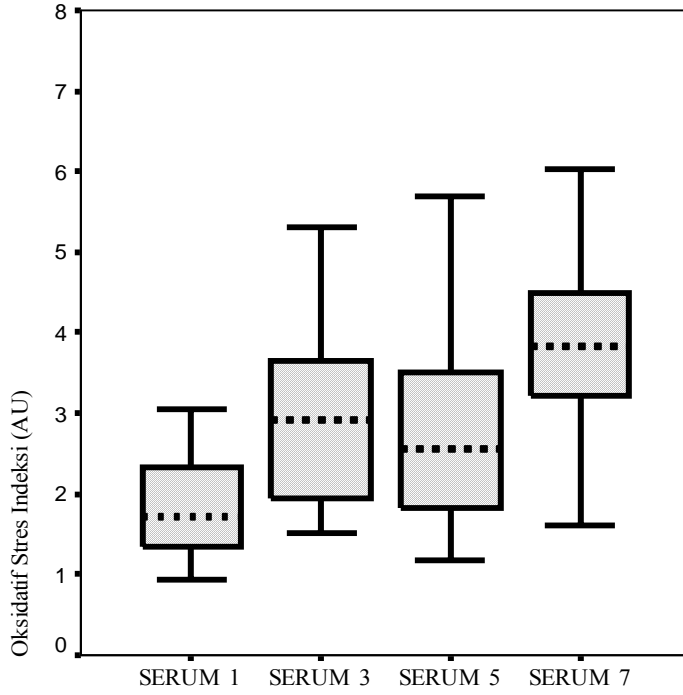
Hastaların serum TOS değerleri karşılaştırıldığında, TOS değerleri 3. gün 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselmiş bulundu ($p < 0,01$). 5. gün 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış ($p > 0,05$), 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşme görüldü ($p > 0,05$). Hastaların serum TOS değerleri 7. günde 1- 3- 5. günlere göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yükselmiş bulundu ($p < 0,01$), ($p < 0,001$). Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum TOS değerleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları Şekil 5'te gösterilmektedir.



Şekil 5. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum TOS'ları arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

4.2.3 Serum OSI Değerleri

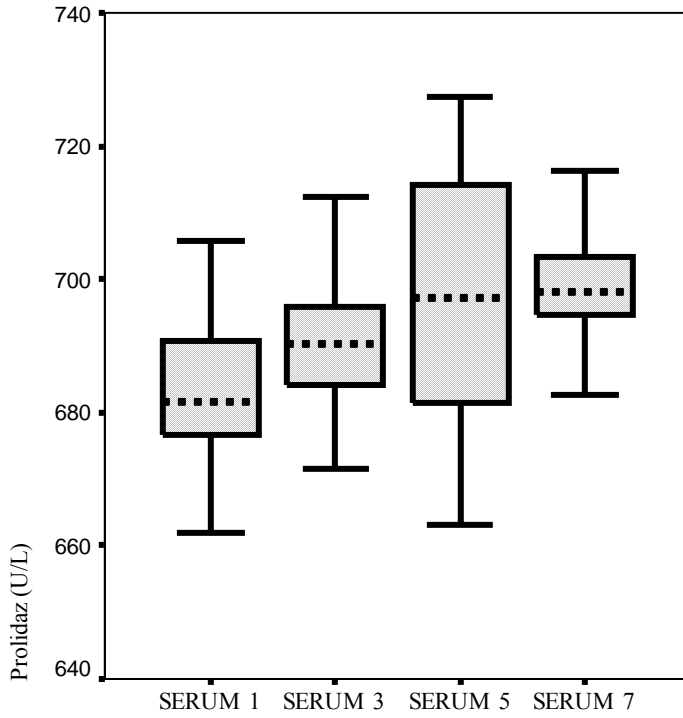
Hastaların serum OSI değerleri karşılaştırıldığında, OSI değerleri TOS değerleri gibi 3. gün 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselmiş bulundu ($p < 0,01$). 5. gün 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış ($p > 0,05$), 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşme görüldü ($p > 0,05$). Hastaların serum OSI değerleri 7. günde 1- 3- 5. günlere göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yükselmiş bulundu ($p < 0,01$), ($p < 0,001$). Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum OSI değerleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları Şekil 6'da gösterilmektedir.



Şekil 6. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum OSI'leri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

4.2.4 Serum Prolidaz Değerleri

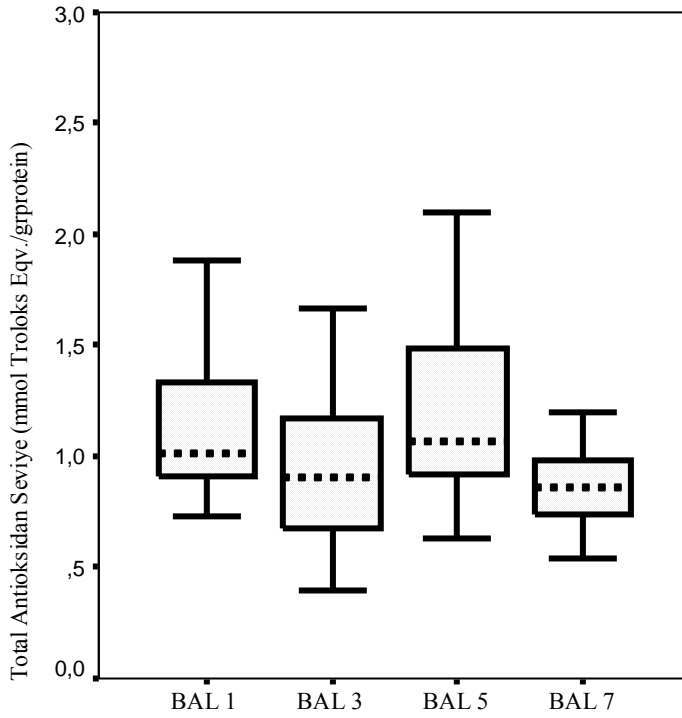
Hastaların serum prolidaz değerleri karşılaştırıldığında, serum prolidaz aktivitesi 3. günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yükselmiş bulundu ($p < 0,01$). 5. gün yapılan serum prolidaz aktivitesi tayininde, prolidaz seviyeleri 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,01$), 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde yüksek bulundu ($p > 0,05$). 7. gün serum prolidaz seviyelerindeki yükselme 5. güne göre istatistiksel olarak anlamlı olmayıp ($p > 0,05$), 1. ve 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$), ($p < 0,01$). Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum prolidaz aktiviteleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları Şekil 7’de gösterilmektedir.



Şekil 7. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün serum prolidaz aktiviteleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

4.2.5 BAL TAS Değerleri

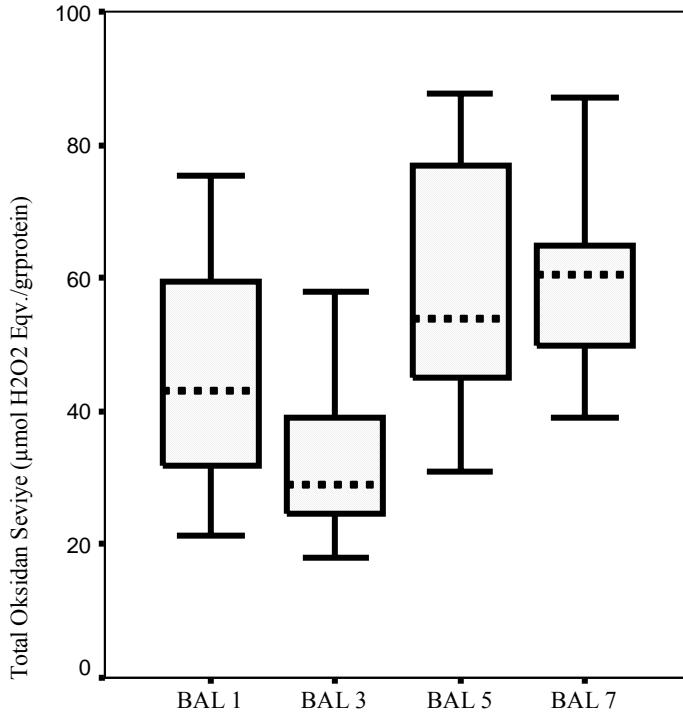
Hastaların BAL TAS değerleri karşılaştırıldığında, BAL TAS değerlerinin 3. günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda ($p < 0,05$) azaldığını tespit ettik. BAL TAS değerleri 5. günde, 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek ($p < 0,01$), 1.güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde ($p > 0,05$) yüksek bulundu. BAL TAS değerleri 7. günde, 1. ve 5. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda ($p < 0,01$), ($p < 0,001$) düşük, 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde ($p > 0,05$) düşük bulundu. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL TAS değerleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları Şekil 8’de gösterilmektedir.



Şekil 8. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL TAS’ları arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

4.2.6 BAL TOS Değerleri

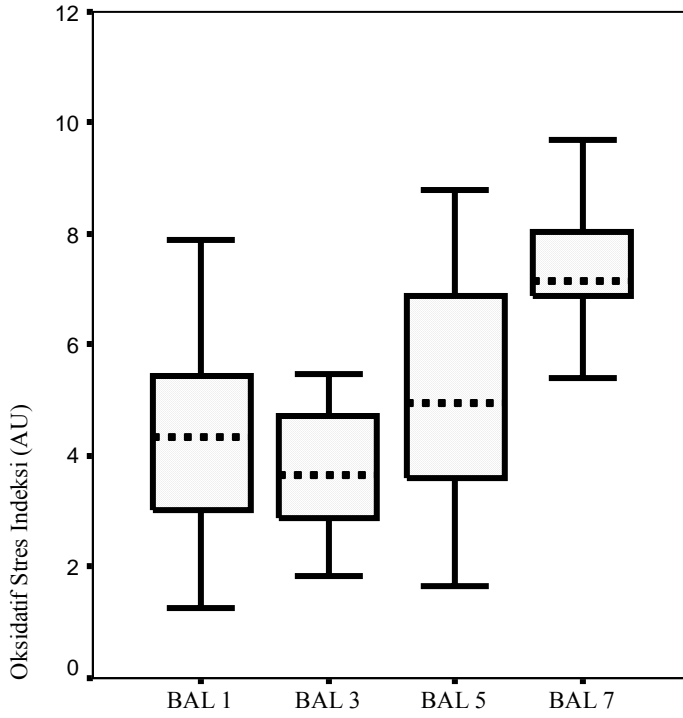
Hastaların BAL TOS değerleri karşılaştırıldığında, BAL TOS değerlerinin 3. günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığını tespit ettik ($p < 0,001$). BAL TOS değerleri 5. günde 1. güne ve 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yükselmiş bulundu ($p < 0,01$), ($p < 0,001$). BAL TOS değerleri 7. günde 1. ve 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$) oranda, 5. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde ($p > 0,05$) yükselmiş bulundu. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL TOS değerleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları Şekil 9’da gösterilmektedir.



Şekil 9. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL TOS’ları arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

4.2.7 BAL OSI Değerleri

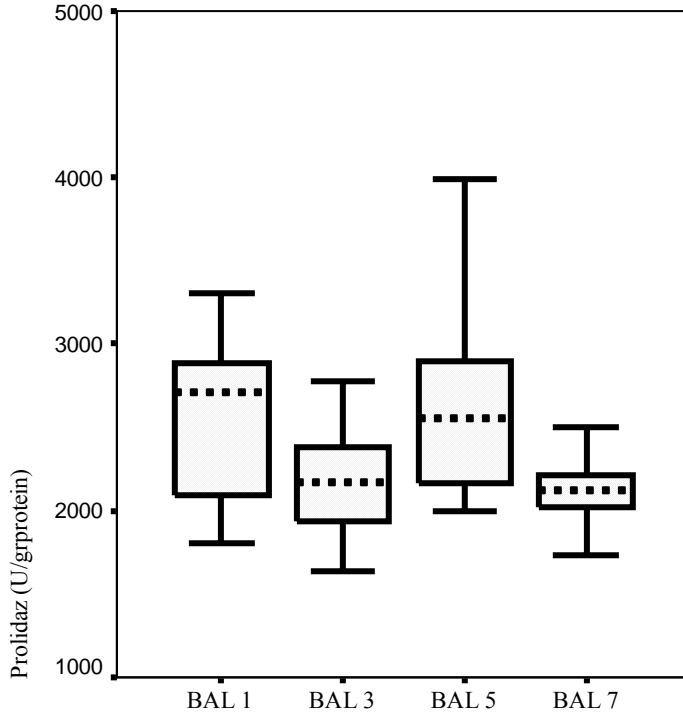
Hastaların BAL OSI değerleri karşılaştırıldığında, BAL OSI değerlerinin 3. günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığını tespit ettik ($p < 0,05$). BAL OSI değerleri 5. günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde ($p > 0,05$), 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p < 0,01$) yükselmiş bulundu. BAL OSI değerleri 7. günde de istatistiksel olarak anlamlı oranda yükselmiş bulundu ($p < 0,001$). Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL OSI değerleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları Şekil 10'da gösterilmektedir.



Şekil 10. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL OSI'leri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

4.2.8 BAL Prolidaz Değerleri

Hastaların BAL prolidaz değerleri karşılaştırıldığında, BAL prolidaz aktivitesi 3. günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulundu ($p < 0,05$). 5. gün yapılan BAL prolidaz aktivitesi tayininde, 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan ($p > 0,05$) bir yükselme, 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bir yükselme bulunmuştur. 7. gün BAL prolidaz seviyelerindeki düşme 1. ve 7. güne göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$), 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL prolidaz aktiviteleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları Şekil 11’de gösterilmektedir.



Şekil 11. Hastaların 1, 3, 5, 7. gün BAL prolidaz aktiviteleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

5.TARTIŞMA

Mekanik ventilasyon tedavisi, hastanın akciğerlerinin o anki durumu ve ventilatördeki kalış süresi ile korele olarak akciğerlerde istenmeyen durumlara da neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalar MV'un akciğer dokusunda oksidatif strese yol açtığını göstermektedir (108, 109). Coral ve arkadaşlarının 8'erli 2 rat grubunda yaptığı çalışmada, gruplardan birine orta tidal volümde (9ml/kg) diğerine yüksek tidal volümde (35ml/kg) mekanik ventilasyon uygulanmış, 1. saat sonunda yüksek tidal volüm uygulanan grupta daha fazla olmak üzere her iki grupta da akciğerlerde protein karbonilasyonu ve nitrasyonu ile ölçülen oksidatif stres, protein oksidasyonu ve hücresel inflamasyon düzeyi, MV uygulanmadan önceki duruma göre anlamlı olarak yükselmiş, katalaz gibi antioksidan düzeyleri ise MV uygulanmadan öncekine göre düşük bulunmuştur (108, 109).

MV'a bağlı istenmeyen durumlardan biri de Ventilatör İlişkili Diyafram Disfonksiyonu (VİDD)'dur. Reaktif oksijen radikalleri (ROS) ile ilgili yapılan çalışmalarda, MV sırasında diyaframda ROS'un arttığı, buna bağlı olarak diyaframda proinflamatuvar gen ekspresyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun diyafram hasarı yaptığı gösterilmiştir (110, 111). VİDD'ye yol açan hücresel mekanizmalar öncelikle hayvansal deney modellerinde çalışılmıştır. MV ilişkili belirteçlerin ve oksidatif stresin diyaframda arttığı ve oksidasyona bağlı hasarlanmanın olduğu gösterilmiştir (112, 113). 2008 yılında yapılan bir çalışmada erişkinde diyafram biyopsi örneklerinde MV'a bağlı diyafram atrofisi gösterilmiştir (112). MV sırasında ve sonrasında diyaframda oluşan mitokondriyal anormallikler, ROS'a bağlı diyafram hasarının kanıtı olarak görülmektedir (114, 115). Bu hastalarda diyaframda morfolojik hasar da meydana gelmektedir. MV'a bağlı olarak miyofibriler atrofi oluşup kontraktilite bozulmaktadır. Bu bulgular MV'a bağlı oksidatif stresin, diyaframda kasılma bozukluğu ve atrofide önemli rol oynadığını göstermektedir (116). MV'a bağlı diyafram hasarında kalpain-kaspaz ve ubiquitin-proteozom-proteoliz yolları yer aldığı iddia edilmiştir (117). MV sırasında ve sonrasında diyaframda vakuoler yapıların artması, lizozomal proteazlar ve katepsin aktivitesinin artmasına bağlı olarak diyaframda ve solunum kaslarında otofaji ve atrofi meydana gelmesi oksidatif strese bağlı diyafram ve solunum kasları hasarının diğer bir kanıtı olarak görülmüştür (118). MV'a bağlı olarak artan oksidanların diyaframda mitokondriyal disfonksiyon oluşturduğunu gösteren başka bir çalışmada, ratlar MV'a bağlanmış ve diyaframda uzamış MV sonucunda mitokondriyal ROS'un arttığı görülmüştür

(114). Mitokondrial oksidatif hasar ve diyafragmatik mitokondrial disfonksiyon sonucunda diyafram hasarı oluşmuştur. Artmış lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonunun, elektron transport zincirinde kompleks II, III, IV'te değişiklik meydana getirip mitokondrial depresyon ve hasar oluşturduğu düşünülmektedir. Bu çalışma ileride mitokondri hedefli antioksidan ilaçların terapötik amaçlı kullanımını için yön verici olabilir.

Solunum yetmezliği olan hastalarda kullanılan mekanik ventilasyon süresi uzadıkça, diyafram güçsüzlüğü oluşabilir. Bunun da uzamış weaninge neden olduğu düşünülmektedir (119). Mekanik ventilasyonun, diyafram düzeyinde oksidatif stresi artırarak diyafram disfonksiyonuna neden olduğu ve bunun da hastaların ventilatörden ayrılma süresini uzattığı düşünülmektedir. 2010 yılında Petrof ve arkadaşlarının (119) bu konudaki çalışmalara yönelik yaptıkları derlemede; mekanik ventilasyona bağlı hastalarda diyafram fonksiyonu, weaning için önemli bir belirleyici olarak gösterilmiştir. Yapılan sınırlı insan çalışmaları ve kapsamlı hayvan deneyleri, MV'un diyafram içi kas lifi hasarına ve atrofiye, bunun da MV uygulanan birçok kritik hastada diyafram yetmezliğine neden olabileceğini göstermektedir (116). Mevcut veriler altta yatan karmaşık patofizyoloji, oksidatif stres ve hücre içi proteolitik yolların kontraktıl aparatda degradasyon oluşturduğunu desteklemektedir (120, 121). Özet olarak, mekanik ventilasyon sırasında oluşan oksidatif stres bir olasılıkla diyafram disfonksiyonunda ortak bir sebep olabilir. Diyafram disfonksiyonu da uzamış weaningin bir sebebi olarak düşünülebilir. Ancak bu konuda hedef özellikle bu süreçleri önlemek olmalıdır. Gelecekteki çalışmaların, MV stratejileri ve farmakolojik ajanların gelişimini artırarak VİDD sıklığını azaltacağını düşünmekteyiz.

MV'a bağlı olarak akciğer dokusunda oluşan oksidatif stresin, akciğer hasarının bir göstergesi olabileceğini düşündüren kısıtlı çalışmalar vardır. 2009'da yapılan bir çalışmada iatrojenik olarak hemorajik şok oluşturulan tavşanlarda, hemorajik şok ve resüsitasyon sırasındaki iskemi ve reperfüzyona bağlı olarak gelişen akciğer hasarında, BAL'da artan sitokin düzeyleri ile ROS düzeyinin korele olduğu, ROS'un da akut akciğer hasarını gösterdiği saptanmıştır (122). Bu çalışmada, MV uygulanan 12'şerli iki gruptan birinde hemorajik şok oluşturulmuş, diğer grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Şok grubunda kontrol grubuna göre, iskemiye bağlı akut akciğer hasarı sırasında BAL'da sitokin düzeyleri, oksidatif stres, makrofajlar, malondialdehit seviyeleri ve toplam hücre anlamlı derecede artmış bulunmuştur. TAS azalmış bulunmuştur. Sonuç olarak, iskemiye bağlı akut akciğer hasarında oksidatif ve inflamatuvar yanıtın ROS'a neden olabileceği, ROS'un da

akciğer hasarının bir göstergesi olabileceği düşünülmüştür. Kanama, şok, iskemi sonrasında akciğerde yoğun inflamatuvar reaksiyonlar meydana gelip, BAL'da da oksidatif ve inflamatuvar sitokinlerin artışı gözlenebilmekte olup, bu çalışmada araştırmacılar BAL'da ROS artışını dolaylı yoldan gösterebilmişler, kısa ömürlü olduğu için ROS'u ölçmenin zorluğuna değinmişlerdir.

MV, akut akciğer hasarında bir taraftan tedavi edici olmakla birlikte paradoksal olarak akciğerdeki hasarı daha da arttırabilir. 2010 yılında yapılmış derlemede, VİDD'den sorumlu hücresel mekanizmalar tartışılmış (119) ve bulguların gelecekteki tedavi stratejileri için önemli olduğu görülmüştür. MV süresinin uzaması sonucunda oluşan VİDD'nin, uzamış weaning, beslenme güçlükleri ve diğer olumsuzluklarla birlikte ele alındığında, sağlık kaynaklarının doğru, akılcı kullanımı ve israfının önlenmesinde büyük bir etki potansiyeline sahip olduğu üzerinde durulmaktadır. Yapılan çalışmalarda, bu hasarı önlemeye veya azaltmaya yönelik çeşitli stratejiler tasarlanıp geliştirilmiştir (123, 124). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada Vitamin E analogu Trolox kullanımının, MV sırasında kısa vadeli olarak diyaframda kontraktıl disfonksiyonu azaltıp önlediği gösterilmiştir (125). Ksantin oksidaz inhibitörü oksipurinol ve antioksidan vitaminlerin de diyaframın kontraktilitesi ve atrofiye etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma, gelecekteki tedavi protokolleri açısından önemli görülmektedir. Melisa ve arkadaşlarının 2008 yılında ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada 8'erli 6 grup oluşturulmuş ve bu gruplardan bazılarına ksantin oksidaz inhibitörü olan oksipurinol verilerek antioksidanların, MV süresi ile diyaframda kontraktıl disfonksiyon üzerine etkisine bakılmış, kontrol grubuna göre MV süresi uzadıkça oksidatif stres (ksantin oksidaz)'in arttığı, oksipurinol verilen grupta ise oksidatif stresin azaldığı görülmüştür(126). Ksantin oksidazın MV ilişkili oksidatif stres ve buna bağlı kontraktıl disfonksiyonu gösterdiği düşünülmektedir. Ksantin oksidazın farmakolojik olarak inhibisyonunun uzamış MV ilişkili oksidatif stresi ve kontraktıl disfonksiyonu azaltacağı düşünülmektedir. Bu çalışmalarda oksipurinol, diyafram kontraktilitesini iyileştirmiş-geliştirmiş ancak atrofiye pek faydası olmamıştır. Tersine, MV'da spontan solunuma izin verilme dönemleri MV'a bağlı diyafram kontraktilitesini ve atrofiyi kalıcı olarak önlemiştir(126). Sıçanlarda Apocynin'in de hücresel düzeyde antioksidan etki göstererek uzamış MV'da koruyucu olduğu gösterilmiştir. Mc Clung ve arkadaşlarının 2009'da 8'erli 5 rat grubunda yaptığı çalışmada, 18 saat MV uygulanan ratlardan bir bölümüne NADPH oksidaz inhibitörü olan Apocynin (antioksidan) verilerek, antioksidanların MV süresine ve diyaframda kontraktıl disfonksiyon üzerine etkisine bakılmış

(127), NADPH oksidaz inhibitörü olan Apocynin verilmeyen grupta oksidatif stresin arttığı görülmüş. Buradaki hipoteze göre Apocynin gibi maddeler, uzamış MV'da diyaframda ve solunum kaslarında hücresele düzeyde antioksidan etki göstererek, diyafragmatik kontraktile disfonksiyon ve atrofide koruyucu etkili bulunmuştur. Bu da ileride antioksidan ilaçların terapötik amaçlı kullanımı ve farmakolojik tedavi modalitelerinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. VİDD sırasında aktive olan proteolitik sistemlere müdahale de tedavi hedefleri arasındadır (128). Bu bağlamda Leupeptin (kalpain-katepsin inhibitörü) diyafram kasılma bozukluğu ve atrofiyi önleyebilir. Araştırmalarda VİDD'de akut yüksek doz kortikosteroid kullanımı ile ilgili sonuçlar biraz şaşırtıcı olmuştur (129). Şöyle ki; VİDD için kortikosteroid kullanımı uygun bir tedavi gibi görünmesine karşın kortikosteroidler kalın filament kaybı ve miyopati yapabilmektedir. Bir de kas gevşeticilerle sinerji oluşturup, kalpain-ubiquitin-proteozom sistemlerini aktive ederek uzamış weaningde neden olarak MV süresini uzatabilmektedirler (129 - 132). VİDD'yi önlemede, aralıklı kontrollü mekanik ventilasyon modları, kas gevşetici ajan kullanımının mümkünse önlenmesi, antioksidanların ve kas-proteoliz yolu inhibitörlerinin kullanımının faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada amacımız; primer akciğer patolojisi olmayan yoğun bakım hastalarında, MV süresi ile oksidatif stres parametreleri ve bir kollajen turn-over markeri olan prolidaz seviyelerinin kanda ve BAL'da nasıl etkilendiğini araştırmaktı. Total antioksidan durumun ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verir, bu yüzden kanın antioksidatif durumunu saptamada bireysel antioksidanlardan ziyade bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır. Nitekim bu çalışmada, Erel tarafından son yıllarda geliştirilen TAS, TOS ölçüm yöntemlerini (Erel tarafından geliştirilen REL[®] Assay ticari kitlerini) kullandık. Çalışmanın en önemli özellikleri:

- İnsanlarda yapılmış kapsamlı bir çalışma olması,
- Erel tarafından son yıllarda geliştirilen, birçok oksidanın, total oksidan kapasitenin ve birçok antioksidanın hassas bir şekilde ölçüldüğü tam otomatik kolorimetrik bir yöntem olan total oksidan kapasite yöntemlerinin kullanılarak oksidan ve antioksidanların daha rahat ölçülmesi (68, 107),
- Akciğerde MV'a bağlı olarak gelişen doku hasarını göstermede, önemli birçok dokunun yapısında da yer alan, kollajenin metabolik döngüsünde spesifik bir enzim olduğu için, kollajenin yıkımında ve prolinin kollajen yapımı döngüsüne

yeniden katılımında aktif görev alan, kollajen turn-over belirteci olarak prolidazın, ilk defa kullanılmasıdır (4).

Bu çalışmada prolidaz ölçümünde, yeni geliştirilen modifiye (optimize) Chinard yöntemini kullanmanın uygun olacağı düşünüldü. Prolidaz enzim aktivitesinin sağlıklı erişkinlerde büyük çeşitlilikler göstermemesi, prolidaz enziminin MV'a bağlı olan hastalarda akciğerde kollajen doku hasarının değerlendirilmesi açısından kullanılabileceği ihtimalini göstermektedir. Kollajen sadece pek çok organ ve dokunun değil aynı zamanda ekstrasellüler matriksin de yapısal bir bileşeni olduğundan, bu yapıların patolojisinden etkilenmektedir (5).

Çalışmada primer akciğer hasarı olmayan, mekanik ventilatör tedavisi gören yoğun bakım hastalarında, oksidatif stres parametreleri ile prolidaz enzim aktivite düzeyi değişiminin serum ve BAL'da gösterilmesi amaçlandı.

Çalışmada, mekanik ventilatör tedavisi görmeye başlayan hastaların yapılan serum incelemelerinde, 1. gün TOS ve OSI seviyelerini diğer günlere göre düşük, TAS seviyelerini daha yüksek tespit ettik. Bu da yeni gelen hastalarda yoğun bakım ve MV'ye bağlı oksidatif stresin henüz yükselmediğini, bu hastaların oksidatif hasar yönünden sadece lokal olarak etkilendiklerini (akciğerler), sistemik olarak henüz oksidatif hasara maruz kalmadıklarını göstermektedir. MV'ye bağlı oksidatif hasar 3. günden sonra sistemik olarak daha da ön plana çıkmaktadır. Yaptığımız çalışmada 3. gün, serumda TOS ve OSI'nin oldukça yükseldiğini dolayısıyla oksidatif stresin mevcut olduğunu, buna reaksiyonel olarak TAS'ın aşırı tüketimden dolayı düştüğünü ve aşırı oksidatif strese karşı yetersiz kaldığını tespit ettik. 5. gün, hastaların yoğun bakımda kalış süreleri uzadıkça vücuttaki antioksidanların kullanılmaya devam edildiği ve dolayısıyla TAS'ın anlamlı ölçüde düştüğü görülmektedir. Bu da bize vücuttaki oksidatif stresin dolayısıyla oksidatif hasarlanmanın devam ettiğini göstermektedir. Fakat oksidatif stres indeksi olarak kullandığımız OSI'nin 5 ve 7. gündeki artışı 1. güne göre istatistiksel olarak oldukça anlamlı olmasına karşın 3. güne göre anlamlı olmaması, tüketilen antioksidanların oksidatif strese karşı vücudu korumaya çalıştıklarını, özellikle 3. günde çok şiddetlenmiş olan oksidatif stresin vücut tarafından tolere edilmeye çalışıldığı ve oksidan / antioksidan dengesinin muhafaza edilmekte olduğunu göstermektedir. Bu duruma mekanik ventilatör tedavisinin olumlu katkısının da olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü mekanik ventilasyon akciğer ve diğer organlarda hipokseminin düzeltilmesi ve yeterli gaz değişiminin sağlanmasına katkıda bulunmaktadır. Fakat yoğun bakımda kalış süresi ve mekanik ventilasyonla normalden daha yüksek oranda (%40) oksijen maruziyetinin uzaması nedeniyle,

TOS ve OSI seviyeleri çok anlamlı oranda yükselmekte fakat TAS seviyeleri uzun süre aşırı kullanıma bağlı olarak anlamlı oranda düşmektedir. Bu da bize; hastaların yoğun bakımda mekanik ventilatöre bağlı olarak yatma süresinin uzamasının oksidatif stresin aşırı artmasına yol açarak, vücudun oksidan/antioksidan dengesini koruma çabalarını yetersiz bıraktığını düşündürmektedir.

Prolidaz enzim aktivitesini 3. günde, 1. gün alınan kana göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yükselmiş olarak tespit ettik. 3. günde TOS ve OSI seviyelerinin de anlamlı derecede yüksek olması, bize bu hastalarda aşırı bir oksidatif stresin meydana geldiğini, bunun da lipid ve protein gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara neden olup, bu hasarlanma neticesi de vücudumuzda en yaygın olarak bulunan proteinlerden birisi olan kollajen proteini turn-overinin hızlandığını, sonuç olarak da prolidaz aktivitesinin giderek daha da arttığını göstermektedir. Nitekim 5. gün yaptığımız serum prolidaz aktivite tayininde, prolidaz seviyeleri oldukça anlamlı bir şekilde yüksek bulunarak 3. gün sonucunu teyid edip, bu şiddetli oksidatif hasarın moleküler düzeyde devam ettiğini gösterdi. Fakat yoğun bakımda kalma süresinin daha da uzaması, oksidatif stresin giderek yükselmesine neden olmaktadır. Prolidaz seviyesindeki istatistiksel olarak anlamlı olmayan yükselme, kollajen turn-overindeki hızlanmanın istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile devam ettiğini göstermiştir.

Çalışmanın sonucunda, mekanik ventilatör tedavisi görmeye başlayan hastalardan alınan 1. gün BAL örneklerinde, mekanik ventilatörle verilen yüksek oksijen basıncına paralel olarak serbest oksijen radikalleri artmış ve TOS yüksek bulunmuştur. Buna reaksiyonel olarak vücut TAS'ı arttırmıştır. Bilindiği gibi mekanik ventilatör tedavisinde başlangıçta genellikle %100 oksijen ile tedaviye başlanmakta, ancak akciğerlerde serbest oksijen radikallerine bağlı oluşabilecek hasarı en aza indirebilmek için mümkün olabilen en kısa sürede en düşük oksijen konsantrasyonuna düşülmektedir. 3. gün yapılan BAL incelemesinde TAS, TOS, OSI değerlerinin hepsinin 1. güne göre anlamlı oranda azaldığını tespit ettik. TAS'ın kullanıma bağlı olarak azaldığını, TOS ve OSI'nin lokal iyileştirici faktörler (müsin gibi) ve MV'nin iyileştirici yönde etkisine bağlı olarak azaldığını düşündük. 1. gün BAL örneklerinde, mekanik ventilatörle verilen yüksek oksijen basıncına paralel olarak anlamlı derecede yüksek bulunan oksidatif hasar kollajen proteininin de metabolizmasını değiştirmiş ve turn-overini hızlandırmıştır. Yükselmiş olan prolidaz değerleri 3.gün oksidatif stresin azalmasına ve kollajen turn-overinin stabilleşmesine bağlı olarak düşük tesbit edildi. Bu da 1. günde verilen yüksek oksijen basıncının oluşturduğu serbest oksijen radikallerinin, moleküler seviyede lipid,

protein ve DNA hasarı yaparak ileri derecede oksidatif zedelenme oluşturduğunu, hem oksidan hemde antioksidan moleküllerin azalmasına yol açtığını ortaya koymaktadır. Verdiğimiz oksijen basıncı % 40 oranında standardize olmasına rağmen, 3. günden sonra (5. gün), hastalarımızda oksidatif stresin tekrar arttığını gözlemledik. Buna reaksiyonel olarak TAS'ın da arttığını gördük. Fakat hastaların yoğun bakımda kalma süresinin uzaması çevresel faktörlerin de etkisi ile 7. günde oksidatif stresin giderek yükselmesine neden olmuştur. TOS'un artmasına karşın TAS miktarları antioksidanların aşırı tüketimine bağlı olarak çok fazla yükselmemiştir. Dolayısıyla hastanın yoğun bakımda kalış süresi uzadıkça potent bir oksidatif strese maruz kalınmakta ve TAS'ında aşırı tüketilmesinden dolayı koruyuculuğu düşmektedir. Hastalarda buna bağlı olarak hücre ve doku düzeyinde lipit, protein ve DNA hasarı meydana gelip oksidatif hasar oluşmaktadır. BAL'da TAS'ı yükseltecek pek çok antioksidan bulunmaktadır. Akciğerlere özel olarak bronkoalveolar yüzeyi kaplayan, mukus tabakasında yer alan müsin glikoproteinleri de antioksidan etki göstererek epitelyal örtüyü oksidatif hasara karşı koruyucu etki göstermektedir (133). Fakat, MV'e bağlı hastalarda yüksek oksijen basıncına maruz kalan bronkoalveolar epitelyal yüzey ve bu yüzeyi kaplayan mukus tabaka da hasara uğramakta, dolayısıyla hastaları uzun süren oksidatif strese karşı koruyucu potansiyeli olan TAS giderek azalmaktadır. Çalışmamızda düşük bulduğumuz TAS seviyeleri de bu sonucu teyit etmektedir. Özellikle 3. günden sonra yükselen TOS seviyeleri ve yetersiz kalan TAS seviyesi OSI'nin aşırı yükselmesine sebep olmuştur. Bu da bize özellikle 3. günden sonra yüzeyleri koruyan mukozal tabakanın oksidatif hasarla zedelendiğini ve bu hasarın şiddetinin de mekanik ventilasyonun ve yoğun bakımda kalma süresinin uzaması ile artacağını işaret etmektedir. Fakat bu hipotezimizin teyidi için, mukus tabakasının da özellikle müsin glikoproteinlerini içine alan bir araştırmayla araştırılması gerekmektedir.

Çalışmaya dahil olan hastaların BAL örneklerinde, 1. gün mekanik ventilasyonla maruz kalınan aşırı oksijen basıncından dolayı TOS ve OSI artmakta, buna paralel olarak TAS, içerdiği sülfhidril gruplarından dolayı aşırı olmamakla beraber yüksek bulunmaktadır. Ayrıca mekanik ventilasyona bağlı olarak bronkoalveolar epitelyal yüzeyde, özellikle ekstraselüler matrikste mevcut olan kollajen proteinlerinin mekanik ve oksidatif olarak hasarlandığını, dolayısıyla kollajen yıkımının mevcut olduğunu ve prolidazın da bu yıkıma paralel olarak 1. gün BAL örneklerinde yüksek bulunduğunu söyleyebiliriz. 3. günde BAL prolidaz seviyesinde 1.güne göre oldukça anlamlı düşme tespit ettik. Bu da bize BAL daki

TAS, TOS, OSI değerlerindeki dūşme gibi oksijen radikallerine aşırı maruz kalan bronkoalveolar yüzeyde moleküler seviyede lipit ve proteinlerde oksidatif zedelenme meydana geldiğini göstermektedir. Prolidazın, kollagenin zedelenmesiyle hızlanmış olan turnoverına paralel olarak 1.günde yükselmesi de hipotezimizi doğrulamaktadır. 3.günde ise oksidatif stresin bronkoalveoler doku düzeyinde düşmesi kollajen hasarında düşmesi veya turnoverının stabil hale gelişi prolidaz seviyesinin düşmesi ile teyit edilmektedir. 5. günde yaptığımız BAL analizinde ise prolidaz miktarının OSI, TAS ve TOS seviyelerindeki artışa paralel olarak arttığını tespit ettik. Bu sonuca göre bronkoalveolar yüzeyde oluşan mekanik ve oksidatif hasarın 5. günde bronkoalveolar yüzey hücrelerinin ve ekstraselüler matrixin ana yapısal proteini olan kollajen molekülünün yıkımının arttığı, turn-overının hızlandığı ve sonuç olarak prolidaz seviyelerinin yükseldiğini gösterdi. 7. gün ise BAL prolidaz seviyelerinin hem 1. güne, hem de 5. güne göre anlamlı oranda düşük olduğunu gördük. Bu da, hastaların yoğun bakımda mekanik ventilatöre bağlı olma süresinin uzamasının, bronkoalveolar yüzeyin hem mekanik hem de şiddetli oksidatif hasara bağlı olarak total antioksidanlarını oldukça tükettiğini fakat maruziyet süresi uzadıkça özellikle yüzey epitelini kaplayan mukus tabakanın koruyuculuk vasfının hücresel mekanizmalarla adaptasyon sürecine girmiş olabileceğini varsayabiliriz. Nitekim prolidaz seviyesinin 5. güne göre düşük bulunması kollajen metabolizmasının kontrol edilebildiğini ve turn-over hızının stabil hale getirilebildiğini göstermektedir.

Bu bulgular ışığında, MV uygulanan hastalarda, MV'un süresi ile artan şiddetli bir oksidatif stresin olduğunu, bunun MV'a bağlı akciğer hasarının etyopatogenezinde ve progresyonunda rol oynadığı, dolayısıyla ciddi bir oksidatif hasarın ortaya çıktığı, bundan en fazla etkilenen proteinlerden biri olan kollajenin hasarlandığını ve yıkımının artarak turnoverının hızlanmış olduğunu ve bundan dolayı da MV'a bağlı akciğer hasarında prolidaz enzim aktivitesinin serumda artmış olduğunu söyleyebiliriz. Prolidaz enzim aktivitesinin gösterilmesinde fotometrik bir metod olan Modifiye Chinard Yöntemi, otomatize olmaması, güvenilir fakat kolay uygulanabilir olmaması nedeniyle rutin bir parametre olarak henüz kullanılabılır değildir. Ayrıca oksidatif stres belirteçlerini yüksek olarak tespit ettiğimiz bu hastalarda, MV'a bağlı olarak oksidatif stres ve oksidatif hasarın da meydana geldiğini düşünmekteyiz. Oksidan maddelerin artması ve bunun yanında antioksidan kapasitenin azalması kollajen doku hasarı oluşturarak bu sürece katkıda bulunabilir. Bundan dolayı, bu hastalarda antioksidan kapasitenin dışardan verilebilecek antioksidan supplement örneğinin

vitaminlerle desteklenmesinin MV'a bağlı oksidatif hasarı azaltabileceği ve klinik süreci olumlu yönde etkileyebileceğini düşünüyoruz.

6. SONUÇ

İnsanlarda yapılmış kapsamlı bir araştırma olan ve MV'ye bağlı olarak vücutta ve bronkoalveoler doku düzeyinde oluşan oksidatif hasarlanmanın incelenmesini amaçladığımız çalışmamızda; primer akciğer patolojisi olmayan yoğun bakım hastalarında MV'ye bağlı oksidatif hasarlanma sonucu, MV süresi ile doğru orantılı olarak hem serum hem de BAL'da TAS, TOS, OSI ve vücudumuzda en yaygın bulunan proteinlerden birisi olan kollajenin metabolik döngüsünde spesifik bir enzim olduğu için, kollajenin yıkımında ve prolinin kollajen yapımı döngüsüne yeniden katılımında aktif görev alan, kollajen turn-over hızının belirteci olarak prolidazın anlamlı ölçüde değişmekte olduğunu tespit ettik.

Bu çalışmada hastaların yoğun bakım ünitesinde kalış süreleri ve MV'ye bağlı kaldıkları süre uzadıkça serum TAS değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düştüğünü tesbit ettik. Serum TOS ve OSI değerlerinde 3. günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme olduğunu, 5. günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artma, 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma olduğunu, 7. günde 1- 3- 5. günlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme olduğunu tesbit ettik. Hastaların serum prolidaz aktivitesi 3. günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yükselmiş bulundu. 5. gün yapılan serum prolidaz aktivitesi tayininde, prolidaz seviyeleri 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı, 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde yüksek bulundu. 7. gün serum prolidaz seviyelerindeki yükselme 5. güne göre istatistiksel olarak anlamlı olmayıp, 1. ve 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Yapılan BAL analizlerinde ise; hastaların TAS değerlerinin 3. günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığını tespit ettik. TAS değerleri 5. günde, 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek, 1.güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde yüksek bulundu. BAL'daki TAS değerleri 7. günde, 1. ve 5. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük, 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde düşük bulundu. Hastaların BAL TOS değerlerinin 3. günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldığını tespit ettik. TOS değerleri 5. günde 1. güne ve 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yükselmiş bulundu. BAL'daki TOS ve OSI değerleri 7. günde 1. ve 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı oranda, 5. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde yükselmiş bulundu. Hastaların BAL prolidaz seviyeleri 3.

günde 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulundu. 5. gün yapılan BAL prolidaz seviyesi tayininde, 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yükselme, 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme bulunmuştur. 7. gün BAL prolidaz seviyelerindeki düşme 1. ve 5. güne göre istatistiksel olarak anlamlı, 3. güne göre ise istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Sonuçlarımız ışığında, yoğun bakım ünitesinde kalma ve MV'nin, hastalarda hem sistemik hem de lokal dokusal şiddetli oksidatif stres ve buna bağlı oksidatif hasar oluşturduğunu, bu oksidatif stresin yoğun bakım ve MV süresi uzadıkça devam ettiğini ve bu süre zarfında vücudun oksidatif strese bağlı hasarlanmayı önlemek veya azaltmak için antioksidanları kullanarak tüketilmelerine neden olduğunu gördük. Ayrıca gerek hücre ve dokuların yapısında gerekse ekstrasellüler matriks ve yarı viskoelastik yapıda olan epitelyal mukus tabakasının bileşiminde yer alan kollajen proteininin metabolizmasındaki değişiklikler hakkında bize ön bilgi kazandıran, kollajen yıkımı ve yeniden sentezinde özellikle de son basamaklar için spesifik ve tek enzim olan prolidaz aktivitesinin de değişiklikler gösterdiğini, dolayısıyla yoğun bakım ünitesinde kalma ve MV ile kollajen proteininin metabolizmasında değişiklikler meydana geldiğini ve oksidatif hasara uğradığını tespit ettik. Özellikle 1. gün BAL örneklerinde, mekanik ventilatörle verilen yüksek oksijen basıncına paralel olarak kollajen doku hasarının oldukça yüksek olduğunu, bunun daha sonra oksijen basıncının düşürülmesi ve oksidatif stresin hem azalması hem de antioksidanlarla kontrol altına alınmasıyla, ayrıca doku ve hücrelerin kendi rejenerasyon çabalarıyla stabilize hale geldiğini, dolayısıyla da prolidaz seviyelerinin de düştüğünü göstermiş olduk. Fakat bu sonuçlarımızın, MV'nin lokal mekanik etkilerini daha kapsamlı olarak ortaya koyabilmesi için bronkoalveoler epitelyal yüzeyi kaplayan mukus tabakasının bileşimindeki değişiklikleri de BAL'ın moleküler yapısını da ortaya koyabilecek ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. İlerideki çalışmalarda, hem doku hem de kanda oksidatif stresin azaltılması, antioksidan savunma mekanizmalarının güçlendirilmesi ve MV'ye bağlı patolojilerin azaltılmasının hedeflenmesi, yoğun bakım ve MV tedavisi gerektiren hastaların tedavileri açısından gelecekte daha yüz güldürücü adımlar atabilmemizi sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Marino Pl Yoğun bakım kitabı. Logos yayınevi. 2002.
2. Cuhruk H. Anesteziyoloji ve Reanimasyon Antip AŞ. yayınları 1999;13:189
3. Akkuş İ: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Ed Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
4. Lenz AG, Costabel U, Maier KL. Oxidized BAL fluid proteins in patients with interstitial lung diseases. Eur Respir J, 1996, 9, 307–312
5. Kaleli S et. Al. The effects of different treatments on prolidase and antioxidant enzyme activities in patients with bronchial asthma. Environmental Toxicology and Ph.2006 ;35-39
6. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem 2005; 38: 1103–11.
7. Erişim: www.gata.edu.tr/cerrahibilimler/anestezi/.../Yogunbakimintarihcesi.ppt, erişim tarihi; 05.03.2010.
8. Erişim: <http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/reanimasyonnot/newpage12.htm>, erişim tarihi; 05.03.2010.
9. Pillbeam SP: Mechanical ventilation: Physiological and Clinical Application. 2nd Ed. St Louis, Mosby-Year book, Inc;1992,p 1
10. Erişim: http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/mekanik_ventilasyon/bl_1.htm, erişim tarihi; 21.03.2010.
11. Perel A, Stock MC: Handbook of mechanical ventilatory support. 1st Ed. Williams and Wilkins, Philadelphia,1992,p 3.
12. Erişim: http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/mekanik_ventilasyon/bl_1.htm, erişim tarihi; 21.03.2010.
13. Kirby RR, Banner MJ, Downs JB (eds): Ventilatory support. 1st Ed Churchill Livingstone Inc, New York,1990,p 1.
14. Demling DH: Adult Respiratory distress Syndrome: Current Concepts. New Horizons 1:388,1993.
15. Demling DH: Respiratory failure after cerebral injury. New Horizons 1:440,1993
16. Erişim: http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/mekanik_ventilasyon/bl_3.htm erişim tarihi; 21.03.2010.

17. Perruzzi WT: Full and partial ventilatory support: The significance of ventilator mode (editorial). *Respir Care* 35:174,1990.
18. Holtackers TR, Loosborck LM, Gracey DR: The use of the chest cuirass in respiratory failure of neurologic origin. *Respir Care* 27:271,1982.
19. Erişim: http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/mekanik_ventilasyon/bl_8.htm, erişim tarihi; 21.03.2010.
20. MacIntyre NR, Leatherman NE: Ventilatory muscle loads and the frequency-tidal volume pattern during inspiratory pressure-assisted (pressure supported) ventilation. *Am Rev Respir Dis* 141:327,1990.
21. Sperman CB: Appropriate ventilator selection: In Kacmarek RM, Stoller JK: *Current Respiratory Care*. BC Decker Inc, Philadelphia,1988.
22. Rossi A, Gottfried SB, Zocchi L, et al: Measurement of static compliance of the total respiratory system in patients with acute respiratory failure during mechanical ventilation. The effect of intrinsic positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 131:672,1985
23. Rau JJ, Shelledy DC: The effect of varying inspiratory flow waveforms on peak and mean airway pressure with time-cycled volume ventilator: A bench of study. *Respir Care* 36:347,1991.
24. Primiano FP, Chatburn RL, Lough MD: Mean airway pressure: Theoretical considerations. *Crit Care Med* 10:378,1982.
25. Kacmarek RM: Pints of view: Pressure Support. *Respir Care* 34:136,1989.
26. Marini JJ, Capps JS, Culver BH: The inspiratory work of breathing during assisted mechanical ventilation. *Chest* 87:612,1985.
27. Tokioka H, Saito S, Kosaka F: Effect of pressure support ventilation on breathing patterns and respiratory work. *Intensive Care Med* 15:491,1989.
28. Shapiro BA, Cane RD, Harrison RA, et al: Changes in intrapulmonary shunting with administration of 100 percent oxygen. *Chest* 77:138,1980.
29. Meister A. Glutathione ascorbate and cell cycle regulation *FEBBS letters*. 1-4, 1994.
30. Cross CE, Halliwell B, Borish ET. Oxygen radicals and human disease. *J. Annals. Int. Med.* 107: 526-45,1997.
31. Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J. Mayo Clin. Proc.* 63:381,1988.

32. Brent JA, Rumack HH. Role of radicals in toxic hepatic injury. *J. Free Radical Chemistry. J. Clinical Toxicology.* 49: 481-493,1993.
33. Dizdaroğlu M. Mechanisms of oxidative DNA damage; lesion and their measurement. *Kluwer academic/plenum publishers.* 302: 67-87,1999.
34. Dizdaroğlu M. Chemical Determination of Free Radical-Induced Damage to DNA. *J Free Radical Biology & Medicine.* 61: 225-242,1993.
35. Wetberg AB, Weitzman SA, Clark EP. Effects on antioxidants induce: sister chromatid Exchange formation. *J. Clin. Invest.* 75: 35-37,1985.
36. Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *J. Biochem.* 222: 1-15,1984.
37. Tappel AL, Dillard JC. In vivo lipid peroxidation measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *J. Federation proceedings.* 40: 174-178,1981.
38. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *J. Clin Chem.* 42:18-19,1995.
39. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide. *Physiology, pathophysiology and pharmacology.* *J.Pharmacol Rewiev;* 43:109-137,1991.
40. Lancaster J.: Nitric oxide, principles and actions. Copyright by Academic Press. Inc. California/USA.1990.
41. Marletta MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 268: 123-125, 1993.
42. Myatt L, Rosenfield RB, Eis ALW. Nitrotyrosine residues in placenta: Evidence of peroxynitrite formation and action. *J. Hypertension.* 28: 488-493,1996.
43. Halliwell B. Oxygen is poisonous. The nature and medical importance of oxygen radicals. *J. Med Lab Sci.* 41: 157-162,1984.
44. Canbaş A. Gıda Bilimi ve Teknolojisi. Ziraat Fakültesi Yayını No: 78. Ç.Ü. Adana. 1983.
45. Sies H, De Groot h. Role of reactive oxygen species in toxicity. *J. Toxicology.* 64: 547-551,1992.
46. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *J. The American Journal of Medicine.* 91: 14-22,1991.
47. Mead J. Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. *Free radical in molecular biology.* *J. Aging and disease.* 65: 53-66,1984.
48. Notarjan D. Oxidants and signal transduction in vessel endothelium. *J. Clin. Med.* 125: 26-37, 1994.

49. Reubset FAG, Veerkamp JH, Tirijbels JMF, Momens LA: Total and peroxisomal oxidation of various saturated and unsaturated fatty acid in rat liver, heart. J. M. Quadriceps. Lipids. 24: 11-16,1992.
50. Arıcıoğlu A: Serbest oksijen radikalleri ve hücre hasarı. 2: 139-242,1994.
51. Stevenson MA, Pollock SS, Coleman CN, Calderwood SK: X- irradiation, phorbol esters and H₂O₂ stimulate mitogen activated protein kinase activity in NIH-3T₃ cells through the formation of reactive oxygen intermediates. J. Cancer Res. 54:12-15,1994.
52. Çakır H. Bel Fıtığı Olan Hastalarda Prolidaz Aaktivitesinin Belirlenmesi Ve Oksidatif Stres İndeksi İle Karşılaştırılması Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Şanlıurfa 2010.
53. Ball S, Weindruch R, Walford L: Antioxidants and immun response. J. Free radicals, Aging and Dejenervative Diseses. 57: 427-456,1986.
54. Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoid. J. Nutr. 119:109-111,1989.
55. Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation chemistry and physics of lipids. 44: 227-253,1987.
56. Braughler M, Chose L, Pregenter F: Oxidation of ferrous iron during peroxidation of lipid substrates. J. Biocheica and Biohysica Acta. 921: 457-464,1987.
57. Ripine JE, Bast A: Oxidative stres in chronic obstructive pulmorary disease. J. Respir Crit Care Med. 156: 341-347,1997.
58. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, : Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. J. Clin Biochem. 286: 607-611,1992.
59. Mccord JM: Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. Clin Biochem. 26. 351-357,1993.
60. Seven A, İnci F, Civelek S, Burçak G, İnci E, Korkut N: Larenks kanserli olgularda lipid peroksidasyon ve antioksidan statü göstergelerinin dokuda incelenmesi. Türk ORL arşivi. 36: 33-6,1998.
61. Ceballos L, Triver JM, Nicole A: Age corralated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutatione-related enzyme activies in human erythrocytes. J. Clin. Chem. 36: 66-70,1992.
62. Smith EL, Hill RL, Lehmal R: Principle of biochemistry 7th ed-mcBraw Hill, inc. USA. 382-383,1993.

63. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW: Harpers biochemistry. 2nd edition. Typo.1991.
64. Anderson ME, Meister A: Glutathione moesters. *J. Anal. Biochem.*183:16-20,1989.
65. Berger SJ, Gosky D, Zberowska E: Sensitive enzymatic cycling in diabetes. *J. Diabetes* 46: 405-12,1991.
66. Yao JK, Reddy R, Mc Elhinny LG, et al: Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res*; 31(1): 1-8. 1998.
67. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, et al: Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*; 29(11): 1106-14. 2000.
68. Erel O: A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*; 37(2): 112-9. 2004.
69. Harma M, Erel O: Oxidative stres in women with preeclapsia. *Am J Obstet Gynecol*; 192(2): 656-57. 2005.
70. Harma M, Erel O: Measurement of the total antioxidant response in preeclampsia with a novel automated method. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 118(1): 47-51. 2005.
71. Milligan A, Brown G. Prolidase deficiency: a Case Report and Literature Review. *Brit J. Dermatol*, 121:405 –409, 1989.
72. Dolenga M. Hechtman P: Prolidase deficiency in cultured human fibroblasts: Biochemical Pathology and Iminodipeptid Enhanced Growth. *Pediatr Res.* 32(4): 479-482, 1992.
73. Davis NC, Smith EL: Prufication and Some Properties of Prolidase of Swine Kidney, *J. Biol Chem*,244: 261-275,1957.
74. Boright A, Scriver CR: Prolidase Deficiency: Biochemical Classification of Alleles *Am J Hum Genet* 44: 731-740,1989.
75. Alparslan S, Gültepe M: Serum Prolidase Activity: Its value as an indicator of collagen accumulation in chronic liver diseases. *Biyokimya Dergisi*,18(1):1-9,1993.
76. Phang JM., Yeh GC., Scriver.: Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In the *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, (7th Ed)ScriverRC., Blandet al., Sly WS., (Eds) Mc Graw Hill, Montreal,1125-1141; 1995.
77. Scriver CR. : Disorder of proline and hydroxyproline Metabolism. In: the metabolic Basis of Inherited Disease (4th Ed.) Stanbury, J. B. Et all. 336-361. 1978.

78. Mock WL, Zhuang H. Chemical Modification Locates Guanidinyl and Carboxylate Groups Within The Active site of prolydase *Biochem biophys Res Com.*180(1): 401-406, 1991
79. Endo F., Tanoue A.: Primary Structure and Gene Localization of Human Prolydase. *J Biol Chem.* 264: 4476-4481, 1989.
80. Endo F, Tanoue A.: Structural organization of the gene for human prolydase (Peptidase D) and Demonstration of a partial gene deletion in a patient with prolydase deficiency. *J. Biol Chem.* 265(19): 11306-11311, 1989.
81. Dannenberg AL, Garrison RJ, Kannel WB. Incidence of hypertension in the Framingham Study. *Am J Public Health,* 78: 676-9;1988.
82. Cosson C, Myara I.: Only prolydase I activity is present in human plasma. *Int. J Biochem.* 24(3): 427-432, 1992.
83. Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. Optimal conditions for prolydase assay by localization of human prolydase. *J Biol Chem,* 264(8): 4476-4481,1989.
84. Myara I. Effect of long preincubation on the two forms of human erythrocyte prolydase. *Clin Chim Acta.* Dec;170(2-3): 263–270, 1987.
85. Cheng TC, DeFrank JJ, Rastogi VK, Alteromonas prolydase for organophosphorus G-agent decontamination. *Chem Biol Interact;* 119-120, 455 62, 1999.
86. Bielawska A., Bielawski K, Chrzanowski K, et al., Prolydase-activated prodrug for cancer chemotherapy cytotoxic activity of proline analogue of chlorambucil in breast cancer MCF-7 cells. *Farmaco,* 55:11-12, 736-41; 2000.
87. Myara I., Cosson C., Moatti N., Lemonnier A.: Human kidney prolydase-purification, preincubation properties and immunological reactivity. *Int. J Biochem.* 26(2): 207-214, 1994.
88. Mock WL., Green PC.: Mechanism and Inhibition of prolydase. *J Biol Chem,* 265 (32): 19606-19610,1990.
89. Radzicka A., Wolfenden R.: Analogues of intermediates in the action of pig kidney prolydase. *Biochemistry.* 30: 4160-4164, 1991.
90. Myara I: Plasma prolydase activity: A possible index of collagen catabolism in chronic liver disease. *Clin Chem.* 30(2): 211-215, 1984.
91. Atara J Umemura S, Yamamoto Y, Hagiyaama M, Nohara N: Prolydase deficiency: Its dermatological manifestations and some additional biochemical studies. *Arch Dermatol* 115: 62,1979.

92. Endo F, Matsuda I: Human eritrosite Prolidase and prolidase deficieny. *Pediatr Res*, 16: 227-231, 1982.
93. Tanoue A, Endo F. A single nucleotide change in the prolidase gene in fibroblast from two patients with polipeptid defieny. *J, Clin in vest* 86: 351-355,1990.
94. Kodama H, Ohhashi T.: Characteristics and partial purification of prolidase and defieny. Effect of glycy-proline on the degradation of newly synthesized collagen *clin physiol Biochem.*7:128-136, 1989.
95. Powell GF, Rasco MA, Maniscalco RM: A prolidase defieny in man with iminopeptidurea. *Metabolism* 23: 505,1974.
96. Butterworth J, Priestman DA. Precense in human cells and tissues of two prolidas and their alteration in prolidase defieny. *J Inherit Metod Dis* 8: 193,1985.
97. Gürdal F., Genç S., Yalçın Ö., Gültepe M: The presence of prolidase activity in amniotic fluid and its evaluation as a maturity test. *Biol Neonate* 67: 34 ,1995.
98. Chinard P: Photometric determination of proline and ornithine. *J Biol Chem.* 199: 61-65. 1952.
99. Kodama H, Mikasa H: Biocheemical investigations on prolidase and prolinase in erythrocytes from patients with prolidase defieny. *Clin Chim Acta*, 173:317-324,1988.
100. Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. : Optimal contions for prolidase assay by proline colorimetric determination: Application to iminodipeptiduria. *Clin Chim Acta.* 125:193-205, 1982.
101. Ohhshi T, Ohno T, Arata J, Sugahara K, Kodama H. : Characterisation of prolidase I and II from erythrocytes of a control, a patient with prolidase defieny and her mother. *Clin Chim Acta.* 187(1):1-9, 1990.
102. Mock WL, Green PC. : Mechanism and inhibition of prolidase. *J Biol Chem.* 265 (32): 19606-19610, 1990.
103. Ozcan Ö, Mustafa G, Osman Mİ: Prolidazın mutlak aktivitesini değerlendirmede fotometrik enzim aktivitesi ölçüm metodunun optimizasyonu. *Turkish Journal of Biochemistry*; 32 (1) ;12-16, 2007.
104. Wilce MCJ, Bond CS, Dixon NE, Freeman HC, Guss JM, Lilley PE, Wilce JA. Structure and mechanism of a proline-spesific aminopeptidase from *Escherichia coli*. *Proc Nati Acad Sci USA.* 95: 3472-2477, 1998.

105. Davis NC, Smith EL. Purification and some properties of prolylase of swine kidney. *J Biol Chem.* 224: 261-275. 1956.
106. Hamilton PB, Ortiz PJ: Proline and hydroxyproline: purification, reaction with ninhydrine and some properties of their N-nitrosoderivatives. *J Biol Chem.* 184 (2): 607-615. 1950.
107. Erel O. : A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. Clinical J. Clinical Biochemistry.* 47: 119-29, 2005.
108. Judith Marín-Corral, et al. Redox Balance and Cellular Inflammation in the Diaphragm, Limb Muscles, and Lungs of Mechanically Ventilated Rats. *Critical care medicine Anesthesiology* 2010; 112:384 –94.
109. Reddy SP, Hassoun PM, Brower R: Redox imbalance and ventilator-induced lung injury. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9:2003–12.
110. Shanely RA, Zergeroglu MA, Lennon SL, et al. Mechanical ventilation-induced diaphragmatic atrophy is associated with oxidative injury and increased proteolytic activity. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1369–1374.
111. Zhu E, Sassoon CS, Nelson R, et al. Early effects of mechanical ventilation on isotonic contractile properties and MAF-box gene expression in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2005; 99:747–756.
112. Levine S, Nguyen T, Taylor N, et al. Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans. *NEngl JMed* 2008; 358:1327–1335.
113. Powers SK, Kavazis AN, McClung JM. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J Appl Physiol* 2007; 102:2389–2397.
114. Kavazis AN, Talbert EE, Smuder AJ, et al. Mechanical ventilation induces diaphragmatic mitochondrial dysfunction and increased oxidant production. *Free Radic Biol Med* 2009; 46:842–850.
115. Falk DJ, DeRuisseau KC, Van Gammeren DL, et al. Mechanical ventilation promotes redox status alterations in the diaphragm. *J Appl Physiol* 2006; 101:1017–1024.
116. Jaber S, Chanques G, Jung B, et al. Mechanical ventilation decreases diaphragm force, induces muscular injury and stimulates proteolytic pathway: in vivo and in vitro human study (abstract). *Proceedings of Annual Meeting of the American Society of Anesthesiologists* 2009; A365.

117. Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA. Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem* 2003; 179:135–145. du J, Wang X, Miereles C, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 2004; 113:115–123.
118. Du J, Wang X, Miereles C, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 2004; 113:115–123.
119. Basil J. Petrof, Samir Jaber and Stefan Matecki. Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Current Opinion in Critical Care* 2010, 16:19–25.
120. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:C834–C843.
121. Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 2000; 23:20–26.
122. Tasoulis M, et al. High concentrations of reactive oxygen species in the BAL fluid are correlated with lung injury in rabbits after hemorrhagic shock and resuscitation. *Tohoku J. Exp. Med.* , 2009, 219,193-199.
123. Capdevila X, Lopez S, Bernard N, et al. Effects of controlled mechanical ventilation on respiratory muscle contractile properties in rabbits. *Intensive Care Med* 2003; 29:103–110.
124. Vassilakopoulos T, Petrof BJ. Ventilator-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:336–341.
125. Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:1179– 1184.
126. Whidden MA, McClung JM, Falk DJ, et al. Xanthine oxidase contributes to mechanical ventilation-induced diaphragmatic oxidative stress and contractile dysfunction. *J Appl Physiol* 2009; 106:385– 394.
127. McClung JM, Van Gammeren D, Whidden MA, et al. Apocynin attenuates diaphragm oxidative stress and protease activation during prolonged mechanical ventilation. *Crit Care Med* 2009; 37:1373– 1379.
128. Maes K, Testelmans D, Powers S, et al. Leupeptin inhibits ventilator-induced diaphragm dysfunction in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:1134–1138.

129. Maes K, Testelmans D, Cadot P, et al. Effects of acute administration of corticosteroids during mechanical ventilation on rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:1219–1226.
130. Dekhuijzen PN, Decramer M. Steroid-induced myopathy and its significance to respiratory disease: a known disease rediscovered. *Eur Respir J* 1992; 5:997-1003.
131. Testelmans D, Maes K, Wouters P, et al. Rocuronium exacerbates mechanical ventilation-induced diaphragm dysfunction in rats. *Crit Care Med* 2006; 34:3018–3023.
132. Testelmans D, Maes K, Wouters P, et al. Infusions of rocuronium and cisatracurium exert different effects on rat diaphragm function. *Intensive Care Med* 2007; 33:872–879.
133. Fraser R. S. ,Colman N. , Müller N.L., Pare P.D. *Synopsis of Diseases of the Chest*, 2006, Güneş Tıp Kitabevi Ltd. Şti. 1 : 28 – 31.

