

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

**SITMA HASTALARINDA LÖKOSİTLERİN
OKSİDATİF STRESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Abdullah TAŞKIN

Danışman
Prof. Dr. Nurten AKSOY

ŞANLIURFA
2010

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**SITMA HASTALARINDA LÖKOSİTLERİN
OKSİDATİF STRESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Abdullah TAŞKIN

**Danışman
Prof. Dr. Nurten AKSOY**

Bu Tez Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 897 numaralı proje ile desteklenmiştir.

**ŞANLIURFA
2010**



T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Sayı :
Konu : Yüksek Lisans Tez Savunma Sınav Sonucu

Tarih : 28/01/2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Tıp Yüksek Lisans Programı 075302001 No'lu öğrencisi Abdullah TAŞKIN'ın Tez Savunma Sınav Tutanağı aşağıdadır.

Gereği için bilgilerinize arz ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAVI TUTANAĞI

Jürimiz 28/01/2010 tarihinde toplanmış ve yukarıda adı geçen öğrencinin “Sıtma Hastalarında Lökositlerin Oksidatif Stresinin Araştırılması” isimli yüksek lisans tezinin savunma sınavı sonucunda **Oy Birliği** ile aşağıdaki kararı almıştır.

- Tez değerlendirme hakkındaki kişisel raporların incelenmesi ve yapılan savunma sınavında adayın başarılı bulunması sonucunda tez **KABUL** edilmiştir.
- Tez değerlendirme hakkındaki kişisel raporların incelenmesi ve yapılan savunma sınavı sonucunda tezin **DÜZELTİLMESİ** için ay **EK SÜRE** verilmesinin Enstitü Müdürlüğüne önerilmesi kararı alınmıştır.
- Tez değerlendirme hakkındaki kişisel raporların incelenmesi ve yapılan savunma sınavının sonucunda tezin **REDDİLMESİ** kararı alınmıştır.

Tez Sınavı Jürisi	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT	
Üye (Danışman)	Prof. Dr. Nurten AKSOY	
Üye	Doç. Dr. Seyithan TAYSI	
Üye		
Üye		

Tüm durumlarda jüri üyelerinin kişisel raporları gerekir.

TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalı'nda sürdürdüğüm Yüksek Lisans eğitimim süresince her türlü konuda desteğini esirgemeyen, tecrübe ve deneyimlerinden çok şey kazandığım değerli hocalarım başta danışmanım Prof. Dr. Nurten AKSOY'a, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT'e, bilgi ve birikimlerinden çok faydalandığım ve bana biyokimyayı sevdiren değerli hocam Prof. Dr. Özcan EREL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın başında sonuna kadar gerçekleşmesinde yardımlarını esirgemeyen, tüm konularda desteğini, içtenlikle ve titizlikle sürdüren Öğr. Gör. Hakim Çelik'e, Biyokimya laboratuvarına beni kazandıran Yard. Doç. Dr. Şahbettin SELEK'e, burada geçirdiğim süre boyunca çok şey öğrendiğim Uzm. Dr. Ali Rıza OCAK'a ve Uzm. Dr. Hale ÇAKIR'a içten teşekkür ederim.

Çalışma kanlarının toplanması aşamasında desteklerini esirgemeyen Şanlıurfa İl Sağlık Müdürlüğüne, Tıfındır Sıtma Sağlık Birimi çalışanlarına ve Mehmet Emin SAKLIM'a, teşekkür ederim. Ayrıca her zaman destek ve katkılarını eksik etmeyen Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarı çalışanlarına, teşekkür ederim. Tezin oluşumunda Ekonomik destekte bulunan Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığına (HÜBAK), Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.

Biyokimya eğitimim boyunca maddi ve manevi desteğini eksik etmeyen değerli arkadaşım Müzisyen Savaş ÖZLER'e teşekkür ederim. Ayrıca bu tezin yazımı aşamasında büyük katkıları olan değerli arkadaşım Mehmet Emin ÇOBAN'a teşekkürü bir borç bir bilirim. Bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme, özellikle annem Fatma TAŞKIN'a ve tüm insanlara teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Abdullah TAŞKIN

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sıtma	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2. Tarihçe	3
2.1.3. Etyoloji.....	5
2.1.4. Sıtma Vektörleri.....	8
2.1.5. Sıtma Etkenleri.....	9
2.1.6. Epidemiyoloji.....	11
2.1.7. Patogenezi	12
2.1.8. Patoloji	15
2.1.9. Klinik	17
2.1.10. Tanı	17
2.1.11. Tedavi ve Korunma.....	24
2.2. Serbest Radikaller	25
2.2.1. Biyolojik Sistemlerde Serbest Radikal Oluşum Kaynakları	26
2.2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	27
2.2.3. Reaktif Nitrojen Türleri (NO, NO ₂ , NO ⁺ , NO ⁻)	32

2.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri	33
2.3. Antioksidan Savunma Mekanizmaları	39
2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar	41
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	46
2.4. Lökositler	51
2.4.1. Lökositlerin Genel Özellikleri	51
2.4.2. Lökositlerin Oluşumu	52
2.4.3. Lökositlerin Yaşam Süresi	52
2.4.4. Fagositoz	53
2.4.5. Lökosit Kaynaklı Komplikasyonlar	54
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	56
3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	56
3.2. Kan Örneklerinin Alınması.....	56
3.3. Kalın Damla Kan Preparasyonu.....	57
3.4. İnce Yayma Kan Preparasyonu.....	57
3.5. Kullanılan Araç Gereçler	58
3.6.Kullanılan Kimyasal Maddeler	59
3.7. Lökositlerin Elde Edilmesi.....	60
3.8. Mikroprotein Düzeyi Ölçümü.....	60
3.9. Oksidan Parametrelerin Ölçümü.....	61
3.9.1. Myeloperoksidaz Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	61
3.9.2. NADPH Oksidaz Aktivitesinin Ölçümü	61
3.9.3. Lipit Hidroperoksit Düzeyi Ölçümü	61
3.9.4. Malondialdehit Düzeyi Ölçümü.....	62
3.9.5. Nitrik Oksit Düzeyi Ölçümü	62
3.9.6. Toplam Oksidan Status (TOS) Düzeyi Ölçümü.....	62
3.9.7. Caspase 3 Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	62
3.10. Antioksidan Parametrelerin Ölçümü.....	63
3.10.1. Katalaz Enzim Aktivitesi Ölçümü	63
3.10.2. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü.....	63
3.10.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü.....	63
3.10.4. Toplam Antioksidan Status (TAS) Düzeyi Ölçümü	64
3.10.5. Total Tiyol Ölçümü.....	64

3.10.6. Oksidatif Stres İndeksi Ölçümü	64
3.10.7. Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Ölçümü	64
3.10.8. Arilesteraz Aktivitesi Ölçümü.....	65
3.11. İstatistiksel Analiz.....	65
4. BULGULAR.....	66
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	78
6. KAYNAKLAR	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 <i>Plasmodim</i> 'lerin dünya üzerindeki yayılışı (36).....	12
Şekil 2 Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu.....	35
Şekil 3. Lökosit sayıları ile plazma malondialdehit düzeyleri arasındaki ilişki ($r = -0,70$ $p < 0,001$).....	70
Şekil 4. Hasta ve kontrol gruplarının Lökosit sayıları arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	71
Şekil 5. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Myeloperoksidaz enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	71
Şekil 6. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde NADPH oksidaz enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	72
Şekil 7. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Total Oksidatif Stres kapasitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	72
Şekil 8. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Lipit Hidroperoksit düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	73
Şekil 9. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Malondialdehit düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	73
Şekil 10. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Nitrik Oksit düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	74
Şekil 11. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Caspase 3 enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	74
Şekil 12. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Süperoksit Dismutaz enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	75
Şekil 13. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Glutasyon Peroksidaz enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	75
Şekil 14. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Katalaz enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	76
Şekil 15. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Tiyol düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları.....	76

Şekil 16. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Total Antioksidan düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları	77
Şekil 17. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Oksidatif Stres İndeksi düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları	77

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Oksijen türevli Bileşikler.....	28
Tablo 2. Hasta ve Kontrol gruplarının Demografik ve Karakteristik bilgilerinin Karşılaştırılması	66
Tablo 3. Sıtma hastaları ve kontrol grubunun lökosit sayıları ve lökositlerin oksidan - antioksidan parametreleri.....	68
Tablo 4. Sıtma hastaları ve Kontrol grubunun plazmalarının oksidan - antioksidan parametreleri.	69

ÖZET

Malarya, plasmodium parazitinin sebep olduğu enfeksiyöz parazitik bir hastalıktır. Hastalık tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygındır. İnsanda sıtmaya neden olan Plasmodiumlar; *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale* ve *P.malariae*'dir. Tüm sıtma olgularının % 95'inin nedeni *Plasmodium vivax*'tır ve yöremizde de en yaygın olan sıtma nedenidir. Sıtma, ancak insan, *Plasmodium* ve dişi anofel üçlüsü bulunduğu oluşabilen ve akut ateş nöbetleri ile başlayan bir parazit hastalığıdır. Sıtma paraziti insanlara dişi Anofel sivrisineklerinin ısırması ile geçmekte ve sıtma epidemileri gelişmektedir. Sıtma parazitinin saptanmasında klasik altın standart yöntem kalın damla kan preparatlarının mikroskopik incelenmesidir. Bununla birlikte sıtma tanısı için mikroskobiyeye alternatif yöntem olarak hızlı sıtma tanı testleri geliştirilmiştir.

Sıtma hastalarında daha önce yapılan bilimsel çalışmalarda, serumun/plazmanın, eritrositlerin ve trombositlerin oksidatif-antioksidatif durumları araştırılmıştır. Sıtma hastalarında lökopeni'de gözlemlenmektedir. Çalışmamızda sıtma hastalarında gözlemlenen bu durumun lökositlerin oksidatif stresle ve apoptozisle ilişkisi olabileceğini öngörerek, oksidan - antioksidan parametreleri ve bunların lökosit sayılarıyla ilişkilerini araştırdık.

Hasta kanlarından Histopaque-1119 ile elde ettiğimiz lökositlerin toplam oksidatif ve antioksidatif durumları REL[®] Assay kitleri kullanılarak kolorimetrik bir yöntemle ölçüldü. Ayrıca caspase 3 aktivitesi yine ticari kitler (Sigma[®]) kullanılarak tespit edildi. Elde edilen veriler SPSS11.5 istatistik programı kullanılarak student t testi ile analiz edildi. Ayrıca parametreler arası korelasyon Pearson korelasyon testi ile incelendi.

Elde ettiğimiz bulgulara göre, sıtma hastalarının lökositlerinde oksidan parametreler yüksek, antioksidan parametreler düşük bulunmuştur. Sıtma hastalarında lökosit sayılarıyla, plazmanın oksidatif hasarını gösteren plazma malondialdehit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde negatif korelasyon saptanmıştır. Apoptozisin bir göstergesi olan Caspase 3 enzim aktivitesinde sıtma hastalarının lökositlerinde kontrol grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur. Elde edilen bu bulgularla, konakçının sıtma patojenine karşı ortaya koyduğu durum, lökopeninin etyopatogeneziyle de ilgili olabilecek, immünokimyasal mekanizmalar hakkında yeni bilgiler üretilmiştir.

Bulgularımız ışığında, sıtma hastalarının lökositlerinde oksidatif stresin meydana geldiğini ve bununda sıtma hastalarında görülen lökopeninin etiyopatogeneziinde rol oynayabileceğini söylemek mümkün gözükmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sıtma, Oksidatif Stres, Antioksidan Seviye, Lökopeni

ABSTRACT

Malaria is a parasitic infectious disease caused by Plasmodium. It is widespread in tropical and subtropical regions. In humans malaria is caused by *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. vivax*. *P. vivax* is responsible for about 95% of all malaria cases which is same in our region. Malaria is a parasitic disease which may occur only in the presence of triad of human, Plasmodium, and a female Anopheles mosquito and initiates with acute fever attacks. Malaria parasite transmits to the human by biting female Anopheles mosquitos and malaria epidemias develop. For diagnosis of malaria parasite gold-standart method is the microscopic examination of thick blood smear. However, alternative methods for the microscopic diagnosis have been developed such as rapid malaria diagnostics tests.

In many studies undertaken on malaria patients oxidative-antioxidative status of plasma, erythrocytes and trombocytes have been investigated. There is leukocytopenia in malaria patients. It has been proposed that this leukocytopenia may be related to oxidative stres of leokocytes and apoptosiz and therefore in this study oxidant-antioxidant parameters and their relationship with leukocytes' numbers have been investigated.

Total oxidative and antioxidative status of leukocytes obtained with Histopaque-1119 from their blood were measured by using REL® Assay diagnostics with a colorimetric method. Additionally caspase 3 activities were measured using commercially available kits (Sigma®). The data were analysed by using SPSS 11.5 statistics program with student t test and the correlation analyses were performed with Pearson correlation test.

According to the findings in leukocytes of the patients oxidant parameters have been found to be high, antioxidant parameters to be low. There was a statistically significant negative correlation between the leukocyte account and plasma malondialdehyde levels which show oxidative damage in the patients with malaria. Caspase 3 activities showing apoptosiz in leukocytes of the malaria patients were found to be higher than those in leukocytes of the controls.

In the light of our findings it may be possible to conclude that oxidative stres occur in leukocytes of the patients with malaria and it may play a role in the etiophthogenesis of the leukocytopenia present in these patients.

Key words: Malaria, oxidative stres, antioxidant level, leukopenia

1. GİRİŞ

Sıtma (malarya) günümüzde bilinen en yaygın infeksiyon hastalıklarından biridir. İnsanlık tarihi kadar bir geçmişe sahip olan sıtma tarih boyunca etkili olduğu toplumların gelişmesini, sosyal ve ekonomik yapısını olumsuz şekilde etkilemiştir. Sıtma gelişmekte olan ülkelerde yılda 200 milyon morbititeye ve 1.5-3 milyon mortaliteye yol açmaktadır (1,2). Ölümlerin çoğu Sahra Altı Afrika da (Afrika kıtasının, Sahra'nın güneyinde kalan kısmını veya tamamını içine alan Afrika ülkelerini ifade eden coğrafya terimidir.) görülmekte olup ölenlerin çoğunluğunu beş yaşın altındaki çocuklar ve gebe kadınlar oluşturmaktadır (3-4). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, Türkiye sıtmanın endemik olduğu ülkeler arasında yer almaktadır. Türkiye nüfusunun % 23'ü sıtmanın endemik olduğu bölgelerde yaşamakta olup 1996-2000 yılları arasında yılda yaklaşık 33000 *P.vivax*, ve 10-20 *P. falciparum* türü bildirilmektedir (5). Türkiye'de ve Dünyadaki sıtma vakalarının tamamına yakınında etken olan tür *P.vivax'tır* (~%100) (6).

İnsanda hastalık oluşturan dört *Plasmodium* türü için insan hem ara konak hem de rezervuar konaktır. Hem son konak hem de vektörü ise sporogoni evresini tamamladığı dişi *Anopheles* sivrisinekleridir. Dişi anofel insan kanını emdikten sonra yumurtlamaya başlamaktadır. İnsanda sıtmaya sebep olan 4 *Plazmodium* türü; *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale* ve *P.malariae*'dir. *P.falciparum*, genel olarak tropikal bölgelerde görülür. Morbitide ve mortalite yönünden en ağır sıtma tablosunu oluşturur. Her yaştaki eritrosite girebildiği için parazitemi düzeyi %5-60 arasında değişmektedir. *P.vivax*, dünyada en geniş yayılım gösteren tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde yaygındır. Morbitide ve mortalite yönünden *P.falciparuma* göre daha hafiftir. *P.vivax*,

retikülositleri ve en genç eritrositleri istila edebildikleri için %1-3 arasında değişen parazitemi düzeyleri oluşturmaktadır. *P.ovale*, Batı Afrika ve bazı Güney Pasifik adalarında görülür, parazitemi düzeyi %2'yi aşmamaktadır. *P.malariae*' nın dağılımı sporodiktir. En yaşlı eritrositleri enfekte edebildiği için parazitemi düzeyi %1'i geçmemektedir.

Sıtma, yaş, cins, ırk ayırımı yapmayan ve duyarlı olan herkesi etkileyen bir hastalıktır. Yapılan çalışmalar; sıtmanın beyinde nekrozlara, ölümcül kanamalara, aşırı hemoliz sonucu anemilere, trombositopeniye, hepatomegaliye, splenomegaliye, hepatosplenomegaliye, hemoglobüriye ve böbrek yetmezliğine yol açtığını göstermektedir.

Sıtma hastalığında konakçının patojene karşı ortaya koyduğu immünokimyasal mekanizmalar henüz yeterince aydınlatılabilmemiş değildir (7,8). Sıtma hastalarında oksidanlar artarken antioksidanlar azalmakta ve oksidatif stres indeksi yükselmektedir (9). Bu durum oksidan-antioksidan düzen homeostazisinin oksidanlar tarafına kaymasına yol açmaktadır (10). Şimdiye kadar yapılan sıtma ile ilgili bilimsel çalışmalarda, serumun/plazmanın, eritrositlerin ve trombositlerin oksidatif durumları araştırıldı ve ölçülen oksidatif hasar düzeyleriyle eritrosit ve trombositlerin sayıları arasındaki ilişkileri saptanmıştır (11,12). Ancak sıtma hastalarında lökositlerle ilgili yeterince araştırma yapılmamıştır. Sıtma hastalarında lökosit sayısı düşmektedir (13), fakat bu lökopeninin nedeni ve mekanizması yeterince aydınlatılabilmemiş değildir. Sıtmada lökopeninin oksidatif stresle ilişkisi var mı veya yok mu şimdiye kadar hiç araştırılmamıştır. Bu çalışmadaki amacımız sıtma hastalarında lökositlerin oksidatif-antioksidatif durumunu araştırmak ve bunun lökopeni ile ilişkisini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sıtma

2.1.1. Tanım

Sıtma; Anofel cinsi dişi sivrisineklerin ısırmasıyla insana bulaşan *Plasmodium* türlerinin parazitliği ile oluşan, *Plasmodium* türüne göre; değişen aralıklarla gelen titreme ve ateş nöbetleri ile başlayıp, terleme ile sonlanan nöbetlerle seyreden, sekonder anemi, splenomegali, hepatomegali ile karakterize olan ve iç organlarda bir pigmentin birikmesi ile ortaya çıkan Malarya, Paludisma, Remittant ateş, Paludismus, Marsh miasma olarak da bilinen bir infeksiyon hastalığıdır (14).

Sıtma ilk olarak Hipokrat tarafından tanımlanmıştır. Hastalık ayrıca Romen ateşi, Chagies ateşi gibi adlarla da anılmıştır. Sıtma (mal-aria, kötü hava) ismi eskiden Roma civarında çok sayıda olan bataklıklardan çıkan kötü hava anlamına gelmektedir ve sıtmanın bu kötü havanın solunması ile oluştuğu düşüncesiyle ortaya çıkmış, İtalyanca'dan türetilmiş bir kelimedir (15,16).

2.1.2. Tarihçe

Sıtma; tarihte bilinen en eski ve en çok ölüme neden olan hastalıklardan biridir. Bu yüzden, tarihte adından sıkça söz edilmektedir. Sıtmanın tarihi çok eski olup, jeolojik yapılarda görülen sivrisinek fosilleri ve eski kavimlerin yazılarının

araştırılmasında varlığı gözlenmiştir. Çok eski çağlardan beri bilinen bir hastalık olup, Eski Mısırlılar tarafından olgu bildirimleri yapılmıştır. Sıtma, dünya tarihine diğer infeksiyonlara oranla daha fazla damgasını vurmuş bir hastalıktır. Savaşların sonuçlarına, nüfusların değişmesine, dünyadaki farklı ülkelerin büyümelerine ve gelişmelerine etki etmiştir (17). Sıtma insanlık tarihinin ilk yazılı kayıtlarında yer alan hastalıklardan biridir. Hintli ve Mısırlı doktorlar, yaklaşık 3500 yıl kadar önce sıtmanın belirtilerini tanımlamışlardır. Mısırlılar, hastalıkla ilişkili olarak sivrisineklerin önemini kavramışlardır (18). Sıtmanın Mezopotamya, Eti ve Grek uygarlığını çöktüren en önemli etmen olduğu kabul edilmektedir. Hipokrat her gün gelen, üçüncü ve dördüncü gün gelen ateşleri tarif etmiştir. Jacquier, 1743'de sıtma için malaria (kötü hava) adını kullanmış ve ateşli hastalıkların bataklıklardan yükselen kötü havanın solunması ile oluştuğunu ortaya atmıştır. Giovanni Maria Lancisi, 1707'de sivrisineklerin sokarak, ısıarak kötü etkenleri kanımıza enjekte ederek sıtmayı bulaştırdığını, Juan Lopez adında bir Cizvit papazı da, kınakınanın sıtma tedavisinde etkili olduğunu bildirmiştir (19).

1880 yılında Laveran adında bir Fransız doktor, ilk defa ışık mikroskobu kullanarak sıtmalı hastaların kan örneklerinde etkeni saptamış ve 1907 yılında Nobel Tıp ödülünü kazanmıştır. Daha sonra bu örnekleri metilen mavisi ile boyamış ama memnun edici bir sonuç alamamıştır (20). Laveran, bu bulgusunu 23 Kasım 1880'de Paris'teki Académie de Medicini toplantısında bildirmiş ve bu parazite o zamanlar *Oscillaria malariae* adını vermiştir. Meckel, 1847'de yuvarlak veya iğ şeklinde ve içinde düzensiz boya taneleri bulunan protoplazma kitlelerini görmüş, Francis Delafield, 1872'de sıtmada en sabit bulgunun kanda kara veya kırmızı ufak boya parçacıklarının bulunmasının olduğunu bildirmiştir (16). St.Petersburg'da Dimitri Romanowsky, 1891 yılında eozin Y ve metilen mavisini karıştırarak infekte eritrositlerde parazitin sitoplazmasının mavi ve kromatin yapısının kırmızı renkte boyandığını gözlemlemiştir (20).

Marchiafava ve Agelo Celi, parazite *Plasmodium* adını vermişler, Alber Freeman, 1882'de sıtmanın insanlara sivrisineklerin sokması ile bulaştığını bildirmiştir. Camillo Golgi, 1886'da eritrositler içindeki şizogoniye tarif ederek sıtma nöbetlerinin merozoitlerin kana dökülmesi aşamasında meydana geldiğini, gün aşırı ve üç günde bir gelen iki çeşit sıtma hastalığının bulunduğunu göstermiştir. Bu hastalığa neden olan

etkenlere sırasıyla 1889'da Plasmodium var. tertiana ve 1890'da Plasmodium var. quartana adlarını vermiştir. Fritz Richard Schaudinn, 1902'de sporozoitlerin doğrudan doğruya eritrositlere girdiğini gördüğünü bildirmiştir. Fakat zamanla bunun doğruluğu üzerinde kuşku oluşmuş ve 1948'de karaciğerde bir eritrosit öncesi şizogoni döneminin olduğu ispat edilmiştir (16).

Ülkemizde ilk ele alınan büyük sağlık problemi sıtma'dır. 1925 Şubat ayında Ankara'da, Mayıs ayında Adana'da ve Temmuz ayında da Aydın'da, İstanbul Bakteriyoloji hanesinde yetiştirilen elemanlarla sıtma savaşı çalışmaları başlamıştır. 26 Mayıs 1926'da "Tıbbanın sıtma enstitülerinde staj mecburiyeti hakkında kanun" ve 13 Mayıs 1926'da "Sıtma Mücadelesi Kanunu" yayınlanmıştır. 1957 yılından itibaren Dünya Sağlık Örgütü ve UNICEF ile yapılan işbirliği ile ülkemizden sıtmanın eradikasyonu çalışmalarına başlanılmıştır (16). Tüm bu eradikasyon çalışmalarına ve araştırmalara rağmen sıtma paraziti ve sivrisinek günümüze kadar etkisinden pek bir şey kaybetmeden gelmeyi başarmıştır.

2.1.3. Etyoloji

Sıtma parazitinin dişi anofeldeki gelişme evresine sporogoni, insandaki gelişme evrelerine şizogoni veya merogoni adı verilmektedir. Dişi anofel sıtmalı insanın kanını emerken parazitli eritrositlerle birlikte gametositleri de almaktadır. İnsandaki eritrositik şizogoni evresinin aseksüel gelişme ürünü olan eritrositik merozoitler anofelin sindirim sisteminde eritrositlerle birlikte yıkılıp sindirilmekte, insandaki seksüel gelişmenin ürünü olan makro (dişi) ve mikro (erkek) gametositler ise gelişmeye başlamaktadır. Dişi anofelde geçen ve gametogoni adı verilen bu gelişme döneminin sonunda makrogametositten makrogamet, mikrogametositten mikrogamet adında makrogametositten daha küçük ince uzun hareketli 6-8 mikrogamet oluşmaktadır. Haploid mikrogametlerden birisinin haploid makrogameti sivrisineğin orta bağırsağında döllenmesi ile oluşan diploid zigot, hareketlenmekte ve ookinet adını almaktadır. Orta bağırsağın epitel hücreleri arasından geçen ookinet epitel ile lamina elastica arasına yerleşmekte, hareketlerini yitirmekte, etrafı bağdokusu ile çevrilmekte ve ookist adını almaktadır. Ookistin içinde sporogoni başlamakta, önce kromatin dağılarak, parçalara ayrılmakta, bu parçaları bölünen sitoplazma çevrelenmekte ve böylece içi binlerce

haploid sporozoit taslağı ile dolu sporokist oluşmaktadır. Bir dişi anofelde, dış koşullara göre 7-21 gün arasında değişebilen, ortalama 10 gün süren sporogoni evresi sonunda içleri binlerce haploid olgun sporozoit ile dolu 10-20 sporont oluşmaktadır. Sporontların patlaması ile onbinlerce sporozoit vücut boşluğuna dökülmekte kendi hareketleri ile hemolenfa içinde olarak, anofelin yumurtalıkları dışındaki bütün organlarına ulaşmakta, en büyük yoğunluğu ise tükürük bezleri ve kanallarında oluşturmaktadır (21-22). Sporogoninin tamamlanması ile enfeksiyonu yaymaya hazır hale gelen dişi anofel kan emme sırasında, anestetik ve antikoagülan etkiye sahip tükürüğü ile birlikte sporozoitleri insanın derisi altına vermekte, bu şekilde sıtma etkenlerini sağlam insana bulaştırmaktadır (23).

Çevre ısısının 16-33°C arasında, nem oranının da %65'in üstünde olması, sporogoni için en uygun çevre koşullarını oluşturmaktadır. %45'in altındaki nem oranı anofelin yaşam süresini kısaltmakta; 16°C'nin altındaki ısıda da sporogoni durmaktadır. Çevre ısısının ve neminin sporogoniye etkileri bakımından plazmodyum türleri arasında farklılıklar vardır. Örneğin 20°C ve altındaki ısı ve %65'in altındaki nem oranında *P.falciparum* sporogonisi dururken, *P.vivax* sporogonisi 16°C altındaki çevre ısısı ve %45'in altındaki nem oranlarında durmaktadır. Bu nedenle *P.falciparum* sıtması yoğun olarak tropikal iklimlerde görülürken, *P.vivax* sıtması ılıman iklimlerde de görülmektedir (22,23).

Sıtma parazitlerinin insandaki gelişme evresine şizogoni veya merogoni adı verilmektedir. Deneyle, deri altına verilen ve hızla dolaşıma giren sporozoitlerin 12 saat içinde kandan kaybolduklarını göstermiştir. Hareketli olan bu parazitler ya fagosite edilmekte ya da karaciğer parankima hücrelerine girerek aseksüel ekzoeritrositik veya hepatic şizogoni evresini başlatmaktadır. Bu evreye preeritrositik şizogoni veya birinci doku şizogonisi adı da verilmektedir (23).

Karaciğer parankima hücrelerine girebilen *P.falciparum* ve *P.malariae* sporozoitlerinin hepsi ortalama 10 günlük hepatic şizogoni evresini tamamladıkları halde, *P.vivax* ve *P.ovale* sporozoitlerinin bir kısmı gelişmeden, canlı ve hareketsiz halde kalmaktadır. Hipnozoit adı verilen bu uyuyan parazitler, 1-11 ay, bazen 3-5 yıl sonra gelişerek sıtmanın yinelenmesine yol açabilmektedir (23).

Plazmodyum türleri arasında bireysel farklılıklar bulunmakla birlikte, ekzoeritrositik şizogoni ortalama 10 gün sürmektedir. Bu sürenin sonunda her birisi binlerce hepatik merozoitle (2.000-40.000) dolu binlerce hepatik şizont oluşmaktadır. Olgun şizontların patlamaları, içinde buldukları hepatositlerin de ölmelerine neden olmakta, çevreye yayılan hareketli hepatik merozoitler dolaşıma geçmektedir. Kana geçen serbest hepatik merozoitler ya eritrositlere girmekte ya da fagosite edilmektedir. Deneyle merozoitlerin 30 saniye içinde bağlandıklarını eritrositlere girebildiklerini göstermektedir (24,25).

Eritrositlere giren hepatik merozoitler eritrositik şizogoni evresini başlatmaktadır. Sıtma hastalığının klinik tablosundan sorumlu olan bu evre, *P.vivax*, *P.ovale* ve benign *P.falciparum* sıtmalarında 48 saat, malign *P.falciparum* sıtmasında 24-36 saat, *P.malariae* sıtmasında ise 72 saat sürmektedir. Bu gelişmenin sonunda oluşan olgun eritrositik şizont, plazmodyum türüne göre değişmek üzere, 6-36 eritrositik merozoit içermektedir (23,25).

Olgun eritrositik şizontları taşıyan enfekte eritrositler, hemoglobini parazitler tarafından kullanıldığı için, boyanmış preparatlarda soluk ve şişkin olarak görünürler. Şizontların patlamaları ve eritrositlerin yırtılmaları sonucu kana dökülen eritrositik merozoitlerin bir bölümü fagosite edilirken bir bölümü de yeni eritrositlere girerek yeni bir eritrositik şizogoni evresini başlatmaktadır. Bu evre intraeritrositik şizogoni evresi olarak ta adlandırılmaktadır (25).

Eritrositik şizogoni sonunda olgun eritrositik şizontların patlamaları başlangıçta senkronize olmamakla birlikte, *P.falciparum* dışındaki sıtma parazitlerinde 1-3 hafta içinde senkronize hale gelmektedir. Toplu şizont rüptürü, ya ateşin titreme ile yükselme anına, ya da bunun hemen öncesine rastlamaktadır. Ateşin bol terle düşmesi ise, serbest merozoitlerin ya fagosite edilerek ya da yeni eritrositlere girerek kandan temizlendiklerini işaret etmektedir (23,26).

Merozoitlerin eritrositlere girebilmeleri taşıdıkları parazit antijenleri, aradaki bağlanma molekülleri ve eritrositlerin yüzey reseptörleri arasındaki karışık etkileşimlere bağlıdır. Bu etkileşimlerde eritrosit yaşının, taşıdığı hemoglobinin niteliklerinin, eritrosit enzimlerinin ve ortamdaki oksijen yoğunluğunun da katkıları vardır.

Eritrositik şizogoni ilk 1-2 hafta aseksüel olarak sürmekte ve genel olarak düzensiz seyreden sıtma nöbetlerini oluşturmaktadır. Daha sonra bir kısım eritrositik merozoitler aseksüel eritrositik şizogoniye sürdürürken, bir kısmı da erkek ve dişi gametositleri oluşturmak için kemik iliğinde tutulmaktadır. Gametositogoni adı verilen ve süresi plazmodyum türüne göre değişen bu evrenin sonunda eritrositlerin içinde haploid gametositler oluşmakta, arkasından olgun gametositleri taşıyan eritrositler yine çevresel kana geçmektedir (21,26).

P.falciparum gametositogonisi 9 gün sürmekte, gametositleri çevresel kanda 23 hafta yaşamaktadır. Buna karşılık *P.vivax*'ın gametositogonisi 36 saat sürmekte, gametositleri çevresel kanda 2-3 gün yaşamaktadır. Gametositler sivrisinekteki sporogoni evresini başlatabilmekte, ancak insandaki sıtma tablosunda rol oynamamaktadır. *P.falciparum* sıtmasında gametositogoninin aseksüel eritrositik şizogoninin başlangıcından birkaç hafta sonra, diğer sıtma parazitlerinde ise eritrositik şizogoni ile birlikte başlayabildiği yazılmaktadır (21,23).

Hepatik Şizogoni yalnızca enfekte dişi anofelin bulaştırdığı sporozoitler tarafından başlatılmakta, olgun hepatic şizontların patlayıp hepatic merozoitlerin kana dökülmesi ile sona ermektedir. Hepatic merozoitler eritrositik şizogoniden, eritrositik merozoitler ise sıtma hastalığından ve gametositogoniden sorumludurlar. Hepatic ve eritrositik merozoitler hepatositlere giremezler ve hepatic şizogoniye başlatamazlar (27).

2.1.4. Sıtma Vektörleri

Sıtmayı bulaştıran vektör, parazitin sporogoni evresini tamamladığı *Anopheles* cinsinden dişi sivrisineklerdir. Bunların yeryüzünde 450 kadar türü bulunmakta, 80 kadarı da sıtmanın bulaşmasında etkili olmaktadır (28).

Sıtma vektörü olan dişi anofel insan kanını emdikten sonra yumurtlamaya başlamaktadır. Dölleniş yumurtalarını tek tek veya küçük gruplar halinde durgun, tatlı suların yüzeyine bırakmakta; bir defada 300-500 yumurta yapabilmektedir (28). Su ısısı uygun (24°C-27°C) ve çevre koşulları elverişli ise 3-4 gün sonra yumurtalardan 1 mm boyunda larvalar çıkmaktadır (28).

2.1.5. Sıtma Etkenleri

İnsan sıtmasına sebep olan 4 etken; *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale* ve *P.malariae*'dir. *P. Falciparum*, morbidite ve mortalite yönünden en ağır sıtma tablosunu oluşturmaktadır. Giemza ile boyanmış preparatlarda, eritrositlerin içinde kahverengimsiyah boyanmış tanecikler görülmekte, bunlara Maurer cisimcikleri adı verilmektedir. Parazitin olgun hepatic şizontunda 30.000-40.000 hepatic merozoit, olgun eritrositik şizontunda ise, 8-24 eritrositik merozoit bulunabilmektedir. Ara şekilleri ve olgun şizontları taşıyan eritrositler, eritrositik şizogoninin ilk 24 saatinden sonra sitoplazmik membranlarında oluşan ve parazit antijenleri sergileyen yumrular aracılığı ile değişik bağlayıcı ara proteinleri kullanarak, mikro sirkülasyonda kapiller ve postkapiller venül endotel hücrelerinin değişik yüzey reseptörlerine yapışmaktadır. Böylece kan dolaşımından uzaklaşan enfekte eritrositler, hem (Retikuloendotelial Sistem) RES' de yıkılmaktan kurtulmakta hem de gelişmelerini tamamlamaktadır (29,30).

Eşaysız eritrositik şizogoni bir süre devam ettikten sonra, kemik iliğinde tutulan bir kısım parazitli eritrositlerde gametositogoni değişimi başlamakta, haploid mikro ve makro gametositler oluşturulmaktadır. Ortalama 9 gün süren bu gelişmenin ardından, eritrositlerin içinde yine dolaşıma giren gametositler çevresel kanda 2-3 hafta yaşamaktadır (24,31).

P. vivax, morbiditesi daha hafif, mortalitesi daha düşük benign tersiyana tipinde sıtma tablosu oluşturmaktadır. Hepatic şizogoniye uyan kuluçka dönemi ortalama 14 gün olmakla birlikte, 8-27 gün arasında değişebilmektedir. Hepatositleri istila eden sporozoitlerin bir bölümü hepatic şizogoni evresini tamamlayıp, her birisi 10.000 kadar hepatic merozoit içeren olgun hepatic şizontları oluştururken, diğer bölümü de gelişmeden sessiz fakat canlı halde kalmakta ve hipnozoit adını almaktadır. Kana dökülen hepatic merozoitler eritrositik şizogoni sonunda sıtma hastalığına yol açarken, çoğunlukla 1-11 ay seyrek olarak 15 yıl sonra gelişme gösterebilen hipnozoitler, sekonder hepatic veya sekonder ekzoeritrositik şizogoniye başlatabilmekte, böylece hastalığın yinelenmesine neden olabilmektedir (32,33).

Hepatic merozoitler kana dökülünce retikülositleri ve en genç eritrositleri istila edebildikleri için, parazitemi düzeyleri % 1-3 arasında değişmektedir. Retikülosit oranını

yükselten hemoliz, kanama gibi olaylar, parazitemi düzeyini de yükseltebilmektedir (33).

P.vivax'ın 48 saatte tamamlanan eritrositik şizogoni evresinin sonunda olgun eritrositik şizontlar oluşmaktadır. Her olgun şizont ortalama 14 eritrositik merozoit içermekte, bu sayı 8-27 arasında değişebilmektedir. Başlangıçta senkronize olmayan eritrositik şizont rüptürleri 1-2 haftada senkronize hale gelmekte ve düzenli sıtma nöbetlerini oluşturmaktadır. Bu nöbetler sırasında Giemza ile boyanarak incelenen çevresel kan preparatlarında, enfekte eritrositlerin içinde görülen eozinofilik boyanmış oluşumlara Schüffner tanecikleri adı verilmektedir (23,32).

P. vivax ile enfekte olan eritrositlerin sitoplazmik membranlarında yumrular oluşmadığı için, bunlar kapiller sistemde endotele bağlanarak sekestre olmamaktadır.

Bu nedenle *P.vivax*'ın genç halkadan olgun eritrositik şizonta kadar bütün gelişme şekilleri ve gametositleri çevresel kanda bir arada görülebilmektedir.

P. ovale, sahra altı Afrika'nın orta ve batı bölgelerinde *P. Vivax*'ın yerini almıştır. Duffy kan grubu A ve B reseptörlerini taşımayan eritrositlere girebilmesi, *P. Vivax*'tan farklı yanını oluşturmaktadır. Benign tersiyana tipinde sıtma tablosu oluşturan *P.ovale* en genç eritrositlere girebildiği için, parazitemi düzeyi %2'yi aşmamaktadır. *P.ovale* sporozoitlerinin de bir bölümü hepatositlerin içinde gelişmeden hipnozoit halinde kalabilmekte bu hipnozoitler hastalığın aylar veya yıllar sonra yinelemesine neden olabilmektedir (34).

P.ovale'nin enfekte ettiği eritrositler parazit proteinleri sergileyen yumrular oluşturmadıkları için, kapiller alanda endotele tutunarak sekestre olmazlar. Bu nedenle eritrositik şizogoninin bütün evreleri ve gametositler, çevresel kanda birlikte görülebilmektedir. Endemik bölgelerde sürekli oturan insanlar, 3-5 yıl içinde, *P.ovale* sıtmasına karşı hümorale ve hücresele bağışıklık kazanmaktadır.

P. malariae, orta ve batı Afrika'da biraz daha sık olmakla birlikte, tropikal bölgelerin tümünde seyrek olarak görülmektedir. Nöbetleri 72 saat ara ile yineleyen iyi gidişli kuartana tipinde sıtma tablosu oluşturan bir malarya parazitidir. En yaşlı eritrositleri enfekte edebildiği için, parazitemi düzeyi %1'i geçmemektedir. Kuluçka dönemine uyan hepatik şizogoni evresi ortalama 20 gün sürmekle birlikte 15-30 gün

arasında değişebilmektedir. Bu parazitin hepatic şizontu 2000 kadar hepatic merozoit içermektedir (34,23).

P.malariae'nin sporozoitleri hipnozoit oluşturmadıkları için, sekonder ekzoeritrositik şizogoni evreleri yoktur; buna bağlı yinleme görülmemektedir. 72 saat süren eritrositik şizogoni evresinin sonunda oluşan olgun eritrositik şizont ortalama 8 eritrositik merozoit taşımakta, ancak bu sayı 6-12 arasında değişebilmektedir.

2.1.6. Epidemiyoloji

İnsanlarda hastalık yapan dört *Plasmodium* türünden *P.vivax* ve *P. falciparum*, sıtma infeksiyonlarının %95'den, özellikle *P.vivax*'ın tüm sıtma infeksiyonlarının %80'den sorumludur. *P.vivax*, dünyada geniş bir yayılım gösterir; tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde, *P.falciparum* ise genel olarak tropikal bölgelerde görülür. *P.malariae*'nin dağılımı sporodiktir. *P.ovale* ise daha çok Batı Afrika ve bazı Güney Pasifik adalarında görülür (17).

Genel olarak sıtma, yaş, cins, ırk ayırımı yapmayan ve duyarlı olan herkesi tutan bir hastalıktır. Ancak *P.ovale*'ye karşı yalnızca Batı Afrika ve Pasifik yerlileri duyarlı olup diğer ırkların bu türe karşı doğal direnci olduğu bilinmektedir. Afrika yerlileri, diğer ırklara oranla *P.falciparum*'a daha duyarlıdır ancak *P.vivax*'a karşı daha dirençlidir. İmmün sistemi bozuk olan kişiler kötü prognoz açısından en başta gelen riskli grubu oluşturmaktadır. Bunları çocuklar ve gebeler izlemektedir (19).

Sıtma, 64. kuzey ve 32. güney enlemleri arasında, anofellerin üreyebildiği her bölgede görülebilmekle beraber, epidemik olarak daha çok tropik ve subtropik bölgelerde görülür. Sıtmanın Epidemik olduğu bölgeler Şekil-1'deki harita da gösterilmiştir. Herhangi bir bölgede sıtmanın yerleşebilmesi için, o bölgede sadece sıtmalı kişilerin ve anofelin bulunması yetmez, o bölgedeki sıcaklığın yılın en azından belli kısmında 15°C'nin üzerinde seyretmesi gerekir. Çünkü parazit, bu sıcaklığın altında anofelin vücudundaki evrimini tamamlayamaz (35). Deniz seviyesinden 2600–2800 metreden daha yüksek olan yerlerde bulaş görülmez. Tropikal bölgelerde sıtmanın aylara ve mevsimlere dağılımı eşit şekilde olur ve olguların aylara, mevsimlere dağılımı eşittir. Buna karşılık subtropikal bölgelerde bulaş sadece yaz aylarında gerçekleşir.

Soğuk mevsimlerde hem parazit sporogoni evresini tamamlayamaz hem de sivrisinek kış uykusuna yatar. Bunun sonucu olarak olgu sayısı yaz aylarında artar, kış aylarında ise azalır (19).



Şekil 1 *Plasmodium*'ların dünya üzerindeki yayılışı (36).

Koyu kısımlar *plasmodium*'ların yoğun olduğu bölgelerdir.

İnsanda hastalık oluşturan dört *Plasmodium* türü için insan hem ara konak hem de rezervuar konaktır. Hem son konak hem de vektörü ise dişi *Anopheles* sivrisinekleridir. Yurdumuzda sıtma vektörlüğü yönünden en önemli *Anopheles* türleri *A.sacharovi* ve *A.superpictus*'dur. *Plasmodium* türleri, insanlara dişi anofel kan emerken bulaştığı gibi kan ve doku nakli, konjenital ve kontamine enjektörlerin kullanılması ile de bulaşabilir. Gebelik esnasında sıtma geçiren kadınların yaklaşık %1'nin bebeklerinde konjenital sıtma görülmektedir (35,37). Bebeklerde sıtma daha ağır seyretmektedir. Bebeklerde sıtma görülmesi, son bir yılda yerli bulaşın olduğuna kesin kanıt teşkil etmesi açısından önemlidir. Bireyler arasındaki farklılık açısından bakıldığında, immün sistemi zayıf olan kişiler, G6PDH enzim eksikliği ve Akdeniz anemisi olanlar sıtmayı daha ağır geçirmektedirler (19,37).

2.1.7. Patogenezi

Sıtma hastalığında patogenezin temelini: 1. Parazitlerin eritrositleri istila etmeleri, 2. Endotel gözelerine yapışmaları, 3. Rozet formlarını oluşturmaları, 4. Paroksimal şizant rüptürü ve buna eşlik eden proenflamatuvar sitokinlerin salınması

oluşturmaktadır. Klinikteki belirti ve bulguları oluşturan aseksüel eritrositik şizogoni ve bunun ürünleridir. Normalde 48 veya 72 saat ara ile yineleyen sıtma nöbetlerindeki titreme ve ateşin, olgun eritrositik şizontların senkronize olarak patlamaları, olgun eritrositik merozoitlerin ve diğer maddelerin kana dökülmeleri ile eş zamanlı olduğu kabul edilmektedir (30,38).

Eritrositik merozoitlerin her eritrosite giremedikleri görülmektedir. Enfeksiyonun gerçekleşmesinde, merozoitin antijenik yapısının, aradaki bağlanma moleküllerinin, eritrosit yaşının, eritrosit yüzey determinantlarının ve hemoglobin yapısının rolü vardır. Sporogoni evresini tamamlamış, tükürük bezleri ve kanalları olgun sporozoitlerle dolmuş dişi anofelin kan emerken sıtmaya duyarlı insanın derisi altına verdiği sporozoitlerin öncüleri, dakikalar içinde karaciğere ulaşmakta, 1-2 saat içinde tümü kandan temizlenmekte, çoğu hepatositlere girmektedir (30).

Sporozoitler yüzeylerinde serum proteinlerinden trombospondin ile homolog olan ve sirkumporozoit protein veya sporozoit yüzey proteini olarak adlandırılan bir molekül taşırlar. Parazit bu molekülün Region II olarak adlandırılan bölgesini ligand olarak kullanarak, hepatositlerin bazolateral yüzlerinde yer alan trombospondin reseptörlerine bağlanmakta ve karaciğer hücrelerine girmektedir. Bu reseptörler, heparan sülfat proteoglikanlar ve düşük dansiteli lipoprotein reseptörlerinden oluşmaktadır. Genel olarak her hepatosite bir sporozoit girmekte ve bu sporozoitler kuluçka dönemi içinde hızla bölünerek binlerce hepatik merozoit ile dolu hepatik şizontları oluşturmaktadır. Patlayan olgun hepatik şizontlardan kana dökülen hepatik merozoitlerin bir bölümü fagositte edilirken bir bölümü de eritrositlere yapışmakta, hızla içine girmekte ve eritrositik şizogoniyi başlatmaktadır (24,39).

Hepatik merozoitlerin eritrositlere bağlanmalarını sağlayan çok sayıda parazit ligandı ve eritrosit reseptörü saptanmıştır. Merozoit, eritrosit membranına yapışmaya uygun olan apikal ucu ile membrana tutunmakta ve 30 saniye içinde eritrosite girmektedir (39). *P.vivax* merozoitleri, yüzeylerinde taşıdıkları homolog lektin molekülünü kullanarak Duffy pozitif (Fya, Fyb) kan grubu taşıyan eritrositlerin yüzeylerindeki A ve B reseptörlerine bağlanmakta ve hücre içine girmektedir. Orta ve Batı Afrika zencileri, eritrositleri Duffy-negatif (Fy, Fy) olduğu için *P. vivax* sıtmasına

direnc göstermektedir. Eritrositin içine giren hepatik merozoit eritrosit membran ile ilişkili bir besin vakuolü içinde çoğalmaya başlamaktadır. Bunun için gerekli enerjiyi konağın glikozunu anaerobik yoldan laktik aside yıkarak; parazit proteinlerinin sentezi için gerekli aminoasitleri de konak hemoglobinin hidrolizinden elde ettiği için globülünü yıkarak sağlamaktadır (31). Eritrositin içine girerek çoğalmaya başlayan merozoit, roptiri adı verilen organeli ile besin vakuolü içine başta hem polimeraz olmak üzere değişik enzimler salgılamaktadır. Bu organelin, hepatik ve eritrositik merozoitlerin eritrosit membranını aşarak hücre içine girmelerinde de rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Besin vakuolü içinde hidrolize edilen hemoglobinden ayrılan globin, çoğalan parazitin aminoasit gereksinimleri için kullanılmakta, toksik ve parazit için membranolitik olan hem ise, hem polimeraz enzimi aracılığı ile toksik olmayan hemozine çevrilerek depo edilmektedir. Monositlerde görülen sıtma pigmenti hemozin, protoporfirin IX, met hemoglobin ve bazı parazit proteinlerinden oluşan bir presipitattır. Klorokin, besin vakuollerinde birikerek hem polimerazı inhibe etmekte, hemozine çevrilemeyen toksik etkili hem, parazitin ölümüne yol açmaktadır (29). Sertleşmiş, esnekliğini yitirmiş ve sitoplazmik membranında parazit antijenleri sergileyen yumrular oluşturmuş enfekte eritrosit, kapiller dolaşımdan geçemeyeceği, RES süzgeçlerinde tutulup eritrositik şizogoni henüz tamamlanmadan yıkılacağı için, kapiller ve postkapiller venül endotel hücrelerine yapışarak dolaşımdan uzaklaşmakta ve gelişmesini burada tamamlamaktadır (29).

P.falciparum dışındaki sıtma parazitleri enfekte ettikleri eritrositlerin yüzeylerinde yumru oluşturmamakta, bu eritrositler endotel hücrelerine yapışmamakta ve rozet formları oluşturmamaktadır. *P.falciparum* merozoitleri tarafından enfekte edilmiş eritrositlerde görülen sitoaderans, sekestrasyon ve rozet formasyonu bu parazite bağlı sıtmanın seyirinde görülen mikro sirkülasyon hastalığının patogenezinde en önemli rolü oynamaktadır (23,29).

P.falciparum sıtmasının en ağır komplikasyonu olan serebral malarya, bu hastalığa bağlı çocuk ölümlerinin %80'inden sorumlu tutulmaktadır. Otopsilerde şizont içeren ve rozet oluşturmuş enfekte eritrositlerin tıkaçlar yaparak kapiller dolaşımı engelledikleri görülmektedir. Erişkinde serebral sıtmanın daha seyrek görüldüğü ve

daha iyi seyir gösterdiği dikkati çekmektedir. Bunun olası nedeni, parazitlerin sekestrin gibi antijenlerine karşı oluşan ve parazitli eritrositlerin erken yıkımını sağlayan güçlü, yüksek titreli ve uzun etkili antikorlardır. Ancak, sekestrin yapısının suşlara göre farklılıklar göstermesi, oluşan bağışıklığın bütün *P.falciparum* suşlarına karşı koruyucu olmasını engellemektedir (23).

Malaryada titreme ile yükselen ateş, çoğunlukla senkronize eritrositik şizont rüptürü ile aynı zamanda veya bunun biraz sonrasında ortaya çıkmaktadır. Ön hipotalamusta bulunan ateş düzenleme merkezini yeni bir ateş düzeyi belirlemeye zorlayan endojen pirojen etkisinin nereden kaynaklandığı kesin olarak bilinmemektedir. Şizont rüptürü sırasında ortama yayıldığı sanılan, glikolipid yapısında olduğu düşünülen ve endotoksin etkisi yaptığı kabul edilen bir maddenin varlığı kanıtlanamamıştır. Rüptür sırasında eritrositik merozoitlerle birlikte ortama yayıldıkları bilinen parazit antijenlerinin, metabolizma artıklarının, yıkım ürünlerinin ve pigmentlerin de bu etkinin oluşmasında rol oynayabilecekleri düşünülmektedir. Bu gibi maddelerin, sitokin oluşturan hücrelerden özellikle ateş düzenleme merkezini saran vasküler yapının, organum vasculorum laminae terminalisin, endotel hücrelerinden salgılandıkları bilinmektedir (34). Yeni ateş düzeyini belirleyen ateş düzenleme merkezi, bunu sağlayacak uyarıları kortekse ve perifere göndermekte, ısı kaybını azaltacak ve üretimini arttıracak önlemleri almakta, vücut ısısını gereksinimlere göre hızlı veya yavaş olarak yükseltmektedir. Hızlı ısı üretiminin merkezi çizgili kaslardır. Bunların hızlı biçimde kasılıp gevşemesi sıtmanın simgesi olan titremeyi oluşturmaktadır (34).

2.1.8. Patoloji

Malarya, organları değişik biçimde etkilemektedir. *P.falciparum* enfeksiyonunun başlangıcında konjestiyona bağlı olarak büyüyen, mikro sirkülasyon alanları parazitli eritrositlerle dolu olan ve ağırlığı 1000 grama kadar çıkabilen dalak, RES aktivitesi arttıkça büyümekte, kapsülü kalınlaşıp fibröz geliştikçe trabeküller de sertleşmektedir. Hemozin cisimcikleri ile dolan RES hücreleri dalağa siyahımsı görünüm vermekte, makrofajlar içinde fagosite edilmiş parazitler görülmektedir (21). Hastalık uzadıkça

karaciğer de büyümekte, rengi koyulaşmaktadır. Kupffer hücreleri parazit yıkım ürünleri ve hemozin cisimcikleri ile doludur. Hepatositlerin de yer yer hemozin içerdikleri görülebilmektedir. Bu pigment, kemik iliği, lenf bezi, derialtı dokusu ve/veya akciğer gibi doku veya organlardaki fagositer hücrelerin içinde de saptanabilmektedir. Böbrekler normalden büyüktür. Glomerüllerde malarya pigmenti, tubuluslarda hemoglobin silendirleri ile karşılaşmaktadır (21,40).

P. falciparum sıtmasının ağır bir komplikasyonu olan serebral malarya olgularında beyin damarlarının kapillerlerinde ve postkapiller venüllerde daha yoğun olmak üzere, parazitli eritrositlerle dolu olduğu görülmektedir. Damarların çevresinde dairesel kanamalar vardır. Kanamaların nedeni, eritrosit tıkaçlarının yol açtığı kan akımı yavaşlaması ve bundan kaynaklanan lokal hipoksidir. Hipoksi, vasküler geçirgenliği arttırmakta, bu da şekilli elemanlarının damar dışına çıkmasına neden olmaktadır. Daha ağır olgularda, artan iskeminin yol açtığı lokal nöron dejenerasyonu, dokuda fokal iskemik yumuşama, daha seyrek olarak da beyin zarlarında hafif enflamatuvar infiltrasyonla karşılaşmaktadır. Bütün bu lezyonların uygun sağaltıma karşın ortaya çıkabilen ölümlerden veya hastanın nörolojik sekellerle iyileşmelerden sorumlu oldukları kabul edilmektedir (23,24).

Ağır malarya kalpte de nonspesifik fokal hipoksik lezyonlara yol açabilmektedir. Giderek artan anemi ve dolaşımı yavaşlatan parazitli eritrosit tıkaçları, oluşan hipoksiden sorumlu tutulmaktadır. Bazı alanlarda fokal interstisyel infiltrasyonlar da görülebilmektedir. Bununla birlikte, malaryanın yol açtığı miyokard değişikliklerinin kalp fonksiyonları üzerinde olumsuz etki yaptığı gösterilememiştir (24).

Böbrek tutulması erişkinlerde çocuklardan sık görülmektedir. Patogenezde, renal kan akımını engelleyen, dokuda hipoksiye ve metabolizma bozukluğuna yol açan parazitli eritrosit tıkaçlarının rol oynadığı kabul edilmektedir. Daha çok akut tübüler nekroz bulguları görülmekte, renal kortikal nekroz ile karşılaşmamaktadır (39).

Pulmoner ödem, falciparum malaryasının seyrek görülen fakat mortalitesi %80'e ulaşabilen ağır bir komplikasyonudur. Sağaltım öncesinde, sağaltım sırasında veya sonrasında görülebilmektedir. Nedeni, seyrek olarak miyokard yetersizliğine eklenen

sağaltım amaçlı aşırı su ve elektrolit yüklenmesi olabilmektedir. Gerçek nedeni ise kapiller alanı dolduran ve mikro sirkülasyonu yavaşlatan parazitli eritrosit tıkaçlarının dokuda iskemiye, endotel geçirgenliğinin artmasına ve alveollere sıvı sızmasına yol açmasıdır (38).

2.1.9. Klinik

İnfekte dişi anofel tarafından sokulan hastalar, bir hafta veya biraz daha fazla süreyle asemptomatiktirler. Bu süre içinde parazit, karaciğerde pre-eritrositik siklusunu tamamlamaktadır. Sıtma nöbetleri, parazit karaciğeri terk edip eritrositleri infekte ettikten sonra, eritrositlerin rüptürü ve metabolik atıklarının kana geçmesi ile ortaya çıkmaktadır (17). Şizogoni sonucunda kana dökülen merozoitler, pigment ve eritrosit artıkları, aktive makrofajlardan tümör nekroz faktör salgılanmasına neden olmaktadır (35-37).

Sıtmanın klinik semptomları arasında anemi, splenomegali ve üşüme-titreme, ateş ve terlemeden oluşan klasik nöbetler bulunmaktadır. Her ne kadar ateşli nöbetler, infeksiyonu güçlü bir şekilde düşündürse de, bazen hastalığın erken evrelerinde tipik ateş bulgusu ortaya çıkmayabilir. Tipik nöbetler 1–2 saat süren üşüme-titreme ile başlar. Bunu takiben hastada yüksek bir ateş ortaya çıkar, deri sıcak ve kurudur (17). Ateş 39–41°C'ye kadar yükselir, beraberinde baş ağrısı vardır (35). Birkaç saat sonra hastada şiddetli bir terleme olur ve terlemeyle beraber vücut sıcaklığı normale veya normalin biraz altına düşer (17). Terleme dönemi 2-3 saat kadar sürer. Bu süre sonunda hasta yorgun düşüp uykuya dalar (37).

2.1.10. Tanı

Sıtmanın tanısında birden çok tanı yöntemi olmasının yanında; tanıda temel ilke, hastadan alınan kanda, infekte eritrositlerin uygun boyanmış periferik yaymalarda gösterilmesidir. Bu amaçla yapılan kalın damla preparasyonu ile parazitin var olup olmadığı, periferik yayma ile ise parazitin cinsi belirlenir. Bu yöntem sıtma tanısında **Altın Standart** olarak bilinir.

Tedavilerindeki farklılıklar nedeniyle *Plasmodium* türlerinin doğru olarak tanımlanması önemlidir. *P.falciparum* infeksiyonları çok kısa sürede fatal olabilmekte, *P.vivax* ve *P.ovale* hipnozoidleri karaciğer hücrelerinde latent olarak kalabilmekte ve relapsların oluşmasına neden olmaktadır. Tedavi olmamış kişilerde gametositlerin görülmesi aktif infeksiyonu, tedavi görmüşlerde ise persistan infeksiyonu gösterir. Persistan infeksiyonun başarılı bir tedaviden sonra da görülebileceği unutulmamalıdır (41).

Son yıllarda sıtma infeksiyonlarının saptanmasında daha fazla duyarlılığa ve özgüllüğe sahip alternatif tanı metodları geliştirilmiştir. Bunlar arasında akridin oranj ile boyanmış sıtma parazitlerinin floresan mikroskopla incelenmesi, türe özgül parazit antijenlerini saptayan immunolojik dipstick testleri ve moleküler testler bulunmaktadır (42).

2.1.10.1.Konvensiyonel Mikroskopi

Sıtma tanısında kalın damla ve ince yayma kan örneklerinin mikroskopla incelenmesi altın standart olarak kabul edilmektedir (43). Parazitlerin ışık mikroskobunda görülebilmesi için Giemsa ile boyanması gerekmektedir. Bu yöntem ucuz ve basit olmakla birlikte, iş yükü açısından zahmetlidir. Kalın damla, ince yaymaya oranla daha duyarlıdır (42).

Kalın damla incelemesinde, standart olarak her preparat için en az 30–50 alan olmak üzere 500 alana kadar inceleme yapılmalıdır. Düzenli olarak 100–200 alan incelendiğinde bile atlanan olguların olabileceği örneklerin tekrar incelenmesi veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gösterilmiştir (44). Orjinal kalın damla metodunun duyarlılığı %80-90'dır. Giemsa ile boyanmış kalın damla örnekleri parazitin görülmesini sağlarken, ince yaymaların incelenmesi türlerin tanımlanmasında yarar sağlamaktadır. Kalın damlada 100 alanın taranması ile 0,25 µl kan incelenirken, ince yaymada 0,005 µl kan incelenir. Bununla beraber kalın damlanın Giemsa ile boyanması sırasında parazitlerin %60-80'ni eksilebilmektedir. Teorik olarak kalın damlada *Plasmodium*'ların saptanabilmesi için bir µl'de en az 5-20 parazitin bulunması

gerekmektedir. Konvensiyonel mikroskopi ile dört *Plasmodium* türünün tamamı saptanabilmekte, parazit sayısı belirlenebilmekte ve prognostik faktörler ortaya çıkarılabilmektedir. Kalın damla metodunda negatif sonuç rapor edilmeden önce en az 200 alanın incelenmesi gerekmektedir. Çünkü 100 alanın incelenmesinde bile olguların %20'si atlanmaktadır (41).

2.1.10.2. Floresan Boyama

Olgun eritrositler normalde DNA içermezler ancak *Plasmodium*'ların yapısında DNA bulunur. Bu DNA'nın floresan boyalarla (sıklıkla akridin oranj) boyanması ile parazitler saptanabilmektedir. Lamların akridin oranj ile boyanması özel ekipmanlar gerektirmekle beraber boyama maliyeti düşüktür. Fakat preparatların uzman kişiler tarafından değerlendirilmesi gerekmektedir, özellikle Howell-Jolly cisimcikleri gözden kaçırılmamalıdır (41).

Kawamoto, akridin oranj ile boyanmış ince yayma preparatları floresan mikroskopi ile incelemiştir, klasik kalın damla ile karşılaştırdığında bunun daha az duyarlılığa sahip olduğunu belirtmiştir (45). Bununla beraber floresan mikroskopinin daha duyarlı olduğunu savunan otörler de bulunmaktadır (41).

2.1.10.3. Quantitative Buffy Coat (QBC) Yöntemi

Quantitative Buffy Coat (QBC) yöntemi, sıtma tanısında kalın damla yöntemine oranla daha büyük hacimde kanın görüntülenmesini sağlayan yüksek duyarlılıkta bir yöntemdir. QBC yöntemi ile parazit bulunan hücreler kan tüpünün dar bölgesine yoğunlaştırılır ve tüplerde santrifüj edilmiş kanda eritrositler 10 ile 30 saniye arasında incelenebilir. QBC sıtma saptama tüpleri, akridin oranj boyası, potasyum okzalat, sodyum heparin ve dipotasyum EDTA gibi antikoagülanlar ile kaplanmıştır. Akridin oranj boyası parazitlerin DNA'sını boyar. Sıtma paraziti içeren eritrositler, parazitsiz eritrositlere oranla daha hafif olduklarından santrifüj edildiklerinde eritrositlerin üstünde granülositlerin hemen altında yoğunlaşırlar. Floresan mikroskopu ile incelendiğinde, floresan olmayan kan hücreleri arasında parazitler parlak ışık kümesi şeklinde

görülürler. İncelemede tüpün en üstünde bulunan trombositler portakal sarısı renğinde, ortadaki lenfositler ve monositler yeşil renkte, bunun altında bulunan granüositler ise sarı renkte görünürler. En altta da eritrositlerin bulunduğu kırmızı tabaka vardır. Bu tabakada floresan veren infekte eritrositler, infekte olmamış eritrositlerin arasından ayırt edilir. Ağır sıtmalı bir hastada tüm eritrositlerin %2'den azı *Plasmodium* içerir. Böyle küçük oranı saptayan klasik kalın damla yöntemi son derece yetenekli kalifiye elemanları gerektirir. Çünkü pozitif bir sonucu saptamak için 300'e yakın alan, negatif bir sonucu saptamak için 100 alan taramak gerekir ve her preparatı incelemek 10 dakika alabilir. QBC yönteminde bu süre bir dakikadan azdır. Ayrıca QBC yüksek duyarlılığa sahiptir. Kalın damla yönteminde 0,1-0,25 µl kan ile 100 alan taranabilirken, bir QBC tüpü bu hacmin 500 katını içermektedir (46).

Konvansiyonel mikroskopi referans standart kabul edilerek yapılan bir çalışmada QBC tekniği ile ParaSight-F testi karşılaştırılmış, ParaSight-F testinin duyarlılığı %90-97, özgüllüğü %99 olarak bulunmuş buna karşılık QBC tekniğinin duyarlılığı %88-98, özgüllüğü ise %58-90 olarak tespit edilmiştir. Bununla beraber parazit yoğunluğunun az olduğu durumlarda QBC tekniğinin ve konvansiyonel mikroskopinin duyarlılığı ParaSight-F testine oranla daha düşük olduğu görülmüştür (47).

2.1.10.4. Hızlı Tanısal Testler

2.1.10.4.1. OptiMAL test

Laktat dehidrogenaz (pLDH), *Plasmodium*'ların hücre içi spesifik metabolik bir enzimidir. OptiMAL test, bu pLDH'a karşı elde edilen monoklonal antikorların nitroselüloz kağıt üzerine kaplanması ile oluşturulmuş bir dipstick testidir. Türe özgü pLDH kullanarak insanda sıtma yapan dört *Plasmodium* türünün 10 dakikadan kısa bir sürede bu yöntemle saptanması mümkündür. Bunun yanında pLDH sadece canlı parazitler tarafından sentez edildiği için, bu testin canlı organizma ile ölü organizma ayrımını sağlayan bir özelliği de bulunmaktadır (19).

Palmer ve arkadaşları 202 sıtma şüpheli hastanın kanlarını Giemsa ile boyanmış kalın damla ve OptiMAL test metodları ile incelemişlerdir. Hastaların %48'i kalın damla ile %45'i OptiMAL test ile pozitif bulunmuştur. OptiMAL test ile pozitif bulunanların %82'i *P.vivax*, %19'u *P.falciparum* çıkmıştır. Kalın damla ile pozitif olanların ise %82'i *P.vivax*, %18'i *P.falciparum* çıkmıştır. Bununla beraber parazit yoğunluğunun 100 parazit/µl'den az olduğu kişilerde OptiMAL test negatif çıkmıştır (48).

2.1.10.4.2. ICT Malaria testi

ICT Malaria testi, immunokromotografik tekniğe dayanan iki yüzeyi nitroselüloz membranla kaplı küçük bir kart şeklinde bir sistemdir (49, 19). *P.falciparum*'un spesifik histidinden zengin protein-2 (HRP-2) antijeni ve panmalarial antijen saptanır. Panmalarial antijen ile *P.falciparum* ve *P.vivax* saptanır. Nadiren de olsa *P.ovale* saptanabilmektedir ama *P.malariae* şimdiye kadar saptanamamıştır. ICT Malaria Pf/Pv testinin *P.falciparum* için duyarlılığı %95,5 ve özgüllüğü %89,8, *P.vivax* için duyarlılık %75 ve özgüllük %94,8 olarak bulunmuştur (50). Araz ve ark. yaptıkları çalışmada ICT testi kullanmışlar ve mikroskopi ile karşılaştırdıklarında testin özgüllüğünü %100, duyarlılığını %85,7 olarak bulmuşlardır (49).

2.1.10.4.3. MAKROmed Rapid Malaria Testi

MAKROmed testi ile kanda bulunan *P.falciparum*'a spesifik HRP-2 antijeni immunokromotografik olarak saptanabilmektedir. Test klinik belirtilerin başlamasından 9-12 gün sonra olumlu sonuç verir. PCR ile karşılaştırıldığında testin duyarlılığı %95 ve özgüllüğü %94'den fazladır (51). Richardson ve ark. yaptıkları bir çalışmada MAKROmed rapid malarya testini, PCR ile karşılaştırdıklarında duyarlılığını %97 ve özgüllüğünü %96 olarak bulmuşlardır (52). Bu testte test tüpü içinde yer alan tampon solüsyonu içine 5 µl kan damlatılmış çubuk daldırılıp bir süre bekletildiğinde pozitif örneklerde çift, negatif örneklerde tek bir bant oluşmaktadır (19).

2.1.10.4.4. ParaSight-F Testi

Bu testin sıtmanın endemik olarak görüldüğü bölgelerde yüksek bir duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir (53). *P.falciparum*'un kanda bulunan aseksüel kan formları ve gametositler tarafından salgılanan HRP-2'yi tanımaya dayalı hızlı bir antijen tespit yöntemidir. Humar ve ark. 151 ateşli hasta üzerinden yaptıkları bir çalışmada, ParaSight-F testini, PCR ile karşılaştırdıklarında ParaSight-F testinin duyarlılığı %88 ve özgüllüğü %97 bulmuşlardır. Testin duyarlılığı parazit yükünün 50 parazit/μl'den az olan hastalarda %40, 50–100 parazit/ml olanlarda %89, 100 parazit/μl'den fazla olanlarda ise %93 bulmuşlardır (54).

Cropley ve ark. ateş ve sıtmanın endemik olduğu bölgelere seyahat hikâyesi olan 160 kişiyi ParaSight-F testi ve mikroskopi ile incelemişlerdir. Bu 160 kişinin 45 tanesinde bu iki yöntemle göre *P.falciparum* saptamışlardır. Tek başına mikroskopi ile 42 ve yine tek başına ParaSight-F testi ile 42 olgu *P.falciparum* olarak saptanmıştır (53).

Yapılan bir çalışmada, parazit yükünün olduğu durumlarda (100 parazit/μl'nin altında) hızlı tanısal testlerin duyarlılığının düşük olduğu gösterilmiştir. İspanyol hastanelerinde kullanımı hızla artan hızlı testlerin duyarlılık ve özgüllükleri PCR ile karşılaştırıldığında, referans laboratuvarlarda PCR'a dayalı testlerin bulunması gerektiği ortaya çıktığı, yurt dışından geri dönen turistlerin ve göçmenlerin kontrolünde ilk etapta hızlı tanısal testlerin yardımcı olabileceği ama bu ve diğer çalışmaların sonuçlarında PCR teknolojisi ile konfirme edilebilen daha duyarlı laboratuvarların geliştirilmesine ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (55).

2.1.10.5. Moleküler Tanı Yöntemleri

Son 10 yıl içinde infeksiyöz ajanların saptanmasında moleküler tanı yöntemleri önemli bir yer almaktadır. Bu teknikler önceleri yavaş bir şekilde gelişmeye başlamakla beraber sonraları bu konudaki ilerlemeler hızlanmış, moleküler tanı yöntemleri paraziter hastalıkların saptanmasında, epidemiyolojik çalışmalarda, paraziter hastalıkların

önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler tekniklerin başlıca avantajı patojenlerin saptanmasındaki duyarlılığı ve organizmanın tanımlanmasındaki kesinliğidir. Direkt mikroskopide parazitlerin saptanmasında ve morfolojik yapılarına göre türlerin tanımlanmasında yeterli olmakla beraber bu durum genelde parazit miktarının yüksek olduğu durumlar için geçerlidir. Oysa parazit miktarının düşük olduğu durumlarda tanısal test olarak moleküler yöntemlerin kullanılmasında büyük yarar vardır (56).

Franzen ve ark. ilk defa 1984 yılında sıtma tanısında kullanılan DNA hibridizasyon yöntemini bildirmişlerdir. *P.falciparum*'un genomik DNA'sını görüntülemek için fosfat ile işaretli proplar kullanmışlar, *P.falciparum* genomik DNA'sında birbiri ile sıkı sıkıya hibrize olmuş iki DNA fragmanını pBR322 plazmid vektörüne klonlamışlardır. Daha sonra bu bölgelerden birini HindIII restriksiyon enzimi ile kesmiş, aynı vektör üzerinde klonlamışlardır. Sonuçta tekrarlayan 21 bp ünitelerinden oluşan bir fragman elde etmişler ve bu fragmanı *P.falciparum*'un saptanmasında hibridizasyon probu olarak kullanmışlardır (57). Daha sonraki çalışmalarda *Plasmodium*'ların rRNA'larının türe spesifik küçük ribozomal subüniteleri üzerine yoğunlaşmış ve elde edilen sonuçların duyarlılığının daha fazla olduğu görülmüştür. Ribozomal RNA, hücre içinde bulunan diğer DNA ve RNA'lardan daha yoğun olduğundan elde edilen sonuçlar daha net çıkmıştır, ancak stabilitesi daha az olduğundan başka suşlarla çapraz reaksiyonlar ortaya çıkmıştır. Bugün için dört ayrı sıtma suşuna ait RNA probları tespit edilmiş olup, bunların RNA içerisindeki çok fazla sayıdaki tekrarları nedeniyle yüksek bir duyarlılığa sahip oldukları gösterilmiştir (19). *Plasmodium*'ların small-subünit RNA genleri hem cins hem de türe spesifik sekanslar içermektedir. Kurutulmuş kan örneklerinden bu RNA ekstrakte edildiğinde ve buna yönelik dört türe spesifik radyoizotopla işaretli proplar kullanıldığında 10–50 parazit varlığında bile *Plasmodium*'ların 4 türünün ayrımı yapılabilmektedir (56).

Sonunu ve ark. organik DNA ekstraksiyonundan sonra agaroz jel elektroforezi uygulayarak *Plasmodium* DNA'sını tespit edip, 0,01–11 parazit/μl yoğunluktaki parazit yükünü saptayabilen PCR yöntemleri geliştirmişlerdir (58). Bu karmaşık yöntemlere ilaveten *P.falciparum*'un tespiti için oldukça basit ve duyarlılığı yüksek olan nested PCR geliştirilmiştir. Bu yöntemle parmak ucundan alınan 10 μl'lik bir kan örneği içinde

13 parazit gibi parazitemisi %0,000026 olan vakalarda dahi parazit yoğunluğunu tespit edilebilmiştir (19).

2.1.11. Tedavi ve Korunma

P.ovale ve *P. malariae* sıtmalarından korunmak için haftada bir gün cWoroquine fosfat (500 mg/ hafta) kullanılmaktadır.

Günümüzde sıtmaya karşı korunmanın en etkili yolu, kemoprofilaksidir. Etkili kemoprofilaksinin düzenli olarak uygulanması ve buna vektörle teması azaltıcı önlemlerin eklenmesi malarya riskini çok azaltmaktadır. *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae* veya klorokine duyarlı *P.falciparum* sıtmasının endemik olduğu bölgeye gidecek duyarlı insanların kemoprofilaksisi için en uygun olan ilaç cWoroquine fosfattır (Haftada bir gün 500 mg). Klorokine dirençli *P.falciparum* sıtmasının endemik olduğu bölgelerde ise en sık önerilen ilaç mefloquinedir (59,31).

Pryrimethamine (25 mg) + sulfadoxine (500 mg) kombinasyonu artık sıtmadan korunmak amacıyla kullanılmaktadır. Sahra altı Afrika'nın bazı bölgelerinde dirençli *P.falciparum* sıtmasından korunmak için cWoroquine (Haftada bir 500 mg) ve kloroguanid (Her gün 200 mg) birlikte kullanılmakta; bazı bölgelerinde ise yalnız chloroquine (haftada bir 500 mg) verilmekte, dirençli *P.falciparum* sıtmasının görülmesi durumunda fansidar ile sağaltım yapılmaktadır. Dirençli *P.falciparum* sıtmasından korunmak için, doxycycline (Her gün 100 mg) ve chloroguanidin (Her gün 200 mg) birlikte kullanılmasını salık verenler de vardır (31).

Sıtmanın endemik olduğu bölgelerde özellikle duyarlı gebe kadınların ve 9 yaşın altındaki çocukların korunması çok önemlidir. Gebe kadınların duyarlı sıtma etkenlerine karşı her üçüncü trimesterde de cWoroquine ile korunmalarında sakınca yoktur. Dirençli *P.falciparum* sıtmasından korunmak için, ikinci ve üçüncü trimesterde kullanılacak mefloquine'in zararsız olduğuna inanılmaktadır (60). Endemik bölgede yapılacak düzenli kemoprofilaksinin yanında vektörle teması kısıtlayacak kişisel önlemlerin alınması da çok önemlidir. Bunlar arasında, gün doğuşu ile batışı arasında konut dışında bulunmamak, geceleri dışarıda kalın, uzun ve koyu renk giysiler giymek,

vücudun açık yerlerine %35 oranında dietil toluamid-DEET içeren sinek kovucuları sürmek, konut içinde insektisid kullanmak, permethrin veya deltamethrin ile empenye edilmiş cibinlikle korunan yatakta uyumak gibi basit görünen ancak çok önemli olan önlemler alınabilir (21).

Sıtmadan korunmada aşılmanın da önemli bir yeri vardır. Ancak parazitin 4 türünün bulunması, her türünün insandaki ve anofeldeki gelişme evrelerinin değişik antijenik yapılar sergilemeleri, bu yapıların mutasyonlar sonucu değişebilmeleri, aşı üretim çabalarının önündeki en önemli engelleri oluşturmaktadır (25).

Etkili bir malarya aşısının en az 3 grup antijene karşı güçlü antikorlar oluşturması beklenmektedir. Bunlar sporozoit, merozoit ve gametosit antijenleridir.

Böylece sporozoitlerin karaciğer hücrelerine girerek ekzoeritrositik şizogoniye, merozoitlerin eritrositlere girerek eritrositik şizogoniye, gametositlerin de dişi anofelde sporogoniye başlatmalarının önlenebileceği umulmaktadır. Sporozoitlerde, merozoitlerde ve gametositlerde immünodominant olan epitoplardan sorumlu genlerin klonlanmasına ve aday aşılarda üretim aşamasına ulaşılmış olmasına karşılık, bu aşılarda koruyucu olup olmayacağı bilinmemekte, koruyucu aşının ne zaman üretilabileceği sorusuna da kimse kesin bir yanıt verememektedir (38,32).

2.2. Serbest Radikaller

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler (61,62).

Serbest radikalde bulunan eşleşmemiş elektron, herhangi bir kimyasal bağ içinde başka bir elektronla spin paylaşmadığından bu radikaller, ekstra elektronları başka atomlara lokalize olana kadar ya da elektron alınca kadar oldukça reaktiftirler. Bu

reaktif maddeler, diğer atom ve moleküllerle elektron alışverişine girerek onları da kararsız hale getirirler (62,63).

Serbest radikaller yaşam süreleri çok kısa olmasına karşın, yüksek aktiviteleri nedeniyle organizmada yüksek düzeyde tahrip edicidirler. Serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı arasında denge olduğu sürece, organizma bundan etkilenmemektedir. Bu denge bozulduğunda, oksidanların arttığı veya antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda organizma oksidatif strese maruz kalır. Bunun sonucunda, hücrel metabolizma işleyişi bozulur, oluşan moleküler yıkım ile kalp, böbrek, karaciğer, mide, akciğer, beyin gibi birçoğu yaşamsal öneme sahip organlarda doku hasarı meydana gelir (62,64-66).

2.2.1. Biyolojik Sistemlerde Serbest Radikal Oluşum Kaynakları

Serbest radikal oluşturan kaynaklar, endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

2.2.1.1. Endojen Serbest Radikal Oluşum Kaynakları

Organizmada çoğu fizyolojik olay sırasında küçük miktarlarda serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bunlar antimikrobiyal savunma, sinyal iletimi gibi işlevlerde rol oynadıktan sonra antioksidan savunma sistemleri tarafından etkisiz hale getirilirler. Hücrenin tüm bileşenleri radikal oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Özellikle mitokondriyal elektron transport zinciri endojen kaynaklı radikallerin olduğu en önemli yerdir (67-69). Mitokondriyal solunum zinciri sırasında NADH ve FADH₂ gibi indirgeyicilerin elektronlarının moleküler oksijene aktarılması olayında, solunum zinciri taşıyıcılarının indirgenmesi sonucu serbest radikal yapısına sahip ürünler oluşmaktadır (64,67,70). Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Elektron transport sistemlerinin aktivitesi sırasında sadece oksijen türevi radikaller meydana gelirken, ksenobiyotiklerin metabolizması sırasında ek olarak yüksek toksik özelliğe

sahip karbon merkezli radikaller de meydana gelebilir. Nükleer membran kaynaklı radikaller özellikle DNA hasarına neden olabilirler (70,71-73).

Peroksizomlar, önemli hücre içi hidrojen peroksit kaynağıdır. Peroksizomlardaki D-aminoasit oksidaz, urat oksidaz, L-hidroksilizin oksidaz ve yağ asidi açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlar süperoksit radikalini ($O_2^{\cdot -}$) üretmeden, bol miktarda hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimine sebep olurlar. Ancak katalaz aktivitesi çok yüksek olduğu için bu organelden sitozole ne kadar H_2O_2 geçtiği bilinmemektedir (64,70).

2.2.1.2. Ekzojen Serbest Radikal Oluşum Kaynakları

Serbest radikal oluşumunun ekzojen kaynakları arasında sigara, pestisitler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar, alkol, güneş ışınları, stres, X-ışınları hatta yiyeceklerde bulunan bazı bileşikler en önemlileridir. Ağır bedensel aktivite de oksijen kullanımındaki artışla beraber radikal oluşumunu artırmaktadır. (64,74-80).

Kimyasal ve organik maddelerin yanması ile açığa çıkan özel maddelerin, radikallerin olası kaynakları ve taşıyıcıları olduğu ileri sürülmektedir. Sigara dumanı, akciğerlere alınan başlıca yanmış organik materyaldir. Sigara dumanı gaz fazının, invitro poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) otooksidasyonunu başlattığı gösterilmiştir (62).

Sigara dumanındaki NO_2 'nin ilk formu nitrik oksit, hemoglobinin hem demiri ile oldukça hızlı reaksiyon verir. Böylece eritrositlerde artan methemoglobin konsantrasyonu, bu kan hücrelerini oksidasyona predispoze hale getirir (62).

2.2.2. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Serbest oksijen radikalleri; singlet oksijen radikali, süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hipoklorik asit ve hidroksil radikali olup bu radikaller oksijenli solunum metabolizması esnasında oluşurlar. Bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç mili saniye ile saatler arasında değişmektedir (81).

Moleküler oksijen, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü sebebiyle hayati bir öneme sahiptir. Moleküler oksijenin toksik etkisi yoktur, fakat aerobik hücre metabolizmasında moleküler oksijen, serbest oksijen radikallerine dönüşür. Enzim reaksiyonları da ROS oluşumuna neden olmaktadır (82). Ayrıca oksijen radikalleri doku hasarına neden oldukları için daha bir önem kazanmaktadır (68). Oksijen molekülündeki aynı yöne 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 1. Oksijen türevli Bileşikler

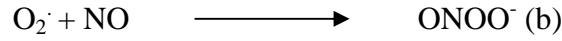
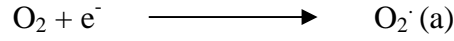
Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil (HO [·])	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)
Alkoksil (RO [·])	Singlet Oksijen (O ₂ ^{↑↓})
Peroksil (ROO [·])	Ozon (O ₃)
Süperoksit (O ₂ ^{·-})	Hipoklorid (HOCl)
Nitrik oksit (NO [·])	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Azot dioksit (NO ₂ ^{·-})	Peroksinitrit (ONOO ⁻)

Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdaki 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. Bu özellikleri ile reaktif oksijen partikülleri iki ana başlık altında incelenmektedir (83,84).

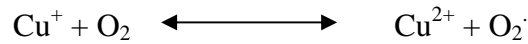
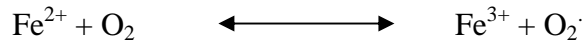
2.2.2.1. Süperoksit Radikalleri (O₂^{·-})

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde, oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle süperoksit radikal anyonu (O₂^{·-}) (a) meydana gelir. Süperoksit nitrik

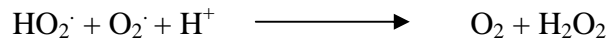
oksitle reaksiyona girerek azot dioksit (NO₂), hidroksil radikali (OH[·]), nitronyum iyonu (NO₂⁺) gibi toksik ürünlere dönüşebilen peroksinitriti (b) (ONOO⁻) oluşturur (70,85,86).



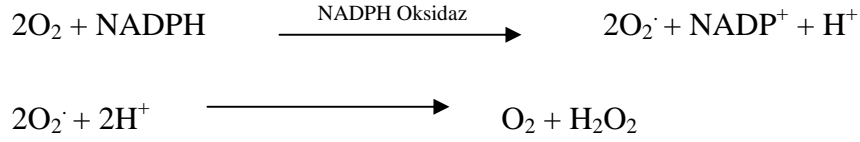
Süperoksit radikali membranları kolaylıkla geçemediğinden, belli başlı tahrip edici etkisi yoktur. Genellikle hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri indirgeyicisi olarak bilinir (87). Süperoksit radikali mitokondriyal solunum sırasında oluşur. Mitokondrielerde kullanılan oksijenin % 2'si süperoksit haline dönüşür. Oksijen mitokondride indirgendiğinde primer ürün sudur (88,89). Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali diğer moleküllerin elektronlarını çekerek enerji gereksinimlerini karşılarlar, hem oksitleyici hem de redükleyici anyonlar olarak bilinirler (70,88). Süperoksit indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyon reaksiyonu ile de oluşabilmektedir. Bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdür.



Süperoksit düşük pH' da protonlanarak perhidroksil (HO₂[·]) radikalini oluşturur. Süperoksit ve perhidroksil radikali süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığı ile etkileştiğinde biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda O₂ ve H₂O₂ oluşur (70,85).



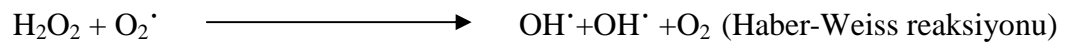
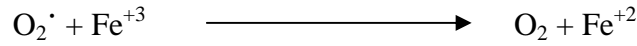
Fagositik hücreler (nötrofiller, monositler, makrofajlar, eozinofiller) bazı biyolojik hedeflerin tahrip olmasına sebep olan ve enfeksiyonlara karşı hücrel cevabı başlatan hücrelerdir. Nötrofillerde süperoksit radikali NADPH oksidaz enzimi aracılığı ile yapılır. Önce fagosit uyarılır ve sonra NADPH oksidaz enzimi aktive olur, redükte piridin nükleotidlerinden (NADPH) iki elektron iki molekül oksijene transfer edilir. Böylece iki molekül O₂^{·-} oluşur (70,88).



2.2.2.2. Hidroksil Radikalleri (OH \cdot)

Hidroksil radikali, biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikal olarak bilinir. Hidroksil radikalının en güçlü serbest radikal olmasının nedeni hücre nükleusundaki membran bariyerleri kolayca geçmesi ve mutajenik olarak DNA'yı etkilemesidir. Bu nedenle *in vivo* oluşan bir OH \cdot radikali hemen her moleküle saldırır ve olduğu yerde de büyük hasara neden olur. Nonradikal biyolojik moleküllerle zincirleme reaksiyonları başlatır (70,90-91).

Hidroksil radikali, hidrojen peroksidin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ile (Fenton reaksiyonu) oluşan son derece reaktif bir radikaldir. Ayrıca hidrojen peroksidin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda da (Haber-Weiss reaksiyonu) meydana gelir. Bu reaksiyon katalizörsüz çok yavaş olduğu halde Fe $^{+3}$ katalizörlüğünde çok hızlı oluşur (70,92).



Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur (70,93). Bir hidroksil radikali, yüzlerce yağ asidini ve yan zincirini lipid hidroperoksitlere çevirebilir. Bu oluşan hidroperoksitler birikerek membran bütünlüğünü bozar ve hücrenin kollabe olmasına neden olur. Ayrıca bu hidroperoksitlerden son ürün olarak toksik ve reaktif olan aldehytler de oluşabilir. Bunlardan en önemlilerden biri de Malondialdehit (MDA)'dır (94).

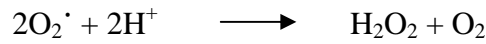
Hidroksil radikali, organik ve inorganik bileşiklerde elektron transfer tepkimelerine neden olur. Ancak normalde OH \cdot radikali oluşmaz. Çünkü OH \cdot oluşumu

için moleküler oksijenin üç değerlikli olarak indirgenmesi gerekir ki, bu oldukça zordur. OH[•] meydana gelebilmesi için O₂[•] ve H₂O₂ gereklidir. Bunlarda SOD, CAT veya GSH-Px enzim sistemiyle uzaklaştırılır. Böylece fizyolojik şartlarda fazla miktarda OH[•] oluşamaz. Bu üç enzim intrasellüler major antioksidanlardır (91,95).

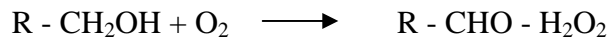
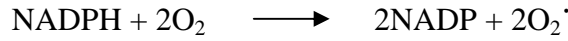
2.2.2.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

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 (84,96).

Reaksiyon şu şekilde ifade edilir;

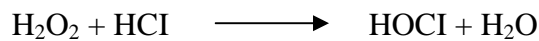


Bazı enzimler ya tekli (NADPH oksidaz) ya da çiftli (Glukoz oksidaz) elektron eklenmesini katalize ederek O₂[•] veya H₂O₂ oluşmasını sağlarlar.



2.2.2.4. Hipoklorik Asit (HOCl)

Hipoklorik asit 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^{•-}'i oluştururlar ve daha sonra dismutasyonu ile oluşan hidrojen peroksiti klorür iyonu ile birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'i meydana getirirler.



2.2.2.5. Singlet O₂ (O₂^{↑↓})

Singlet oksijen (O₂^{↑↓}), dış yörüngesinde ortaklanmamış elektronu olmadığından nonradikal reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin enerjetik uyarılmasıyla oluştuğundan spin kısıtlaması yoktur ve reaktivitesi çok yüksektir. Oksijen elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönündeki bir başka orbitale yer değiştirmesiyle oluşmaktadır (70,87).

Singlet oksijen, uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyesine düşmesiyle ışık yayar. Kimyasal bir bileşikle etkileşimi sonucunda meydana gelen kemilüminesans ölçülerek reaktif oksijen türlerinin direkt tayini yapılabilmektedir (70,88).

Pigmentlerin (flavin içeren nükleotidler, renital, bilirubin gibi) oksijenli ortamda ışığı absorplamasıyla, metal varlığında katalizlenen hidroperoksitlerin yıkım reaksiyonlarında, spontan oluşan dismutasyon tepkimelerinde (fagozom içerisinde), prostaglandin endoperoksit sentaz reaksiyonları ve bazı sitokrom P450 tepkimelerinde vücutta singlet oksijen meydana gelebilir (70,88).

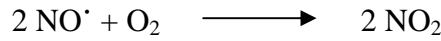
Singlet oksijen diğer moleküllerle karşılaştığında mevcut enerjisini transfer edebileceği gibi kovalent tepkimelere de girebilir. Karbon-karbon çift bağları sayesinde, peroksi radikalini (ROO[•]) meydana getirir ve lipid peroksidasyonunu başlatabilir (88,97).

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

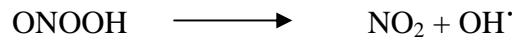
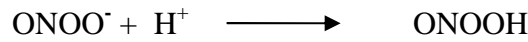
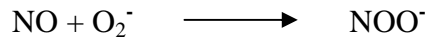
Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir (98). Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO, bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür (99-101). Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir (98). NO[•]; bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır (102). Bu lipofilik serbest radikal damar endotel hücrelerinde Nitrik Oksid Sentaz (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'in 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' radikali 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 Diabetis Mellitus gibi bazı önemli hastalıklarda rol oynayabilmektedir.

2.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Vücutta serbest radikaller ile antioksidan savunma mekanizması arasında bir homeostasis vardır. Bu denge oksidanlar lehine bozulduğunda, serbest radikaller

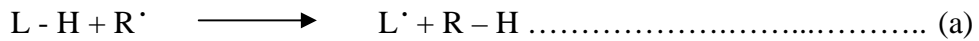
karbonhidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olur (70,71,103).

2.2.4.1. Membran Lipitleri Üzerine Etkileri

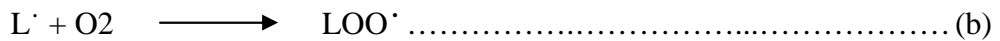
Tüm biyomoleküller serbest radikal atağına maruz kalır ancak bunların içinde lipitler en kolay etkilenenlerdir (71). Hücre, membranı ve diğer komponentleri ile serbest radikal atakları ve peroksidasyon için potansiyel bir hedefdir (104,105). Tüm biyolojik zarlar çoklu doymamış yağ asitleri ile amfipatik lipitler ve zar proteinlerinin birleşmesinden oluşur. Lipit peroksidasyonu serbest oksijen radikalleri tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonunu içeren kimyasal bir otokatalitik zincir reaksiyonu olup, lipit peroksitlerinin aldehit türevleri, hidrokarbon radikalleri ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi şeklinde sonlanır (103,106-108).

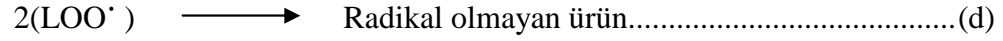
Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Lipit peroksidasyonu membranlara yakın bölgelerde ortaya çıkan OH[•] radikalının membran fosfolipitlerinin yağ asidi yan zincirlerine saldırması ile oluşur (70,109).

Lipit peroksidasyonu üç temel aşamadan meydana gelir (110-112) : Başlangıç Aşaması (a), çoğalma aşaması (b,c) ve sonlanma aşaması (d).



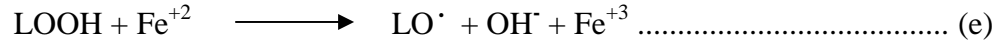
Lipid Hidroperoksit genellikle çoklu doymamış yağ asidi (PUFA)' dir. Başlangıçta yüksek enerjili bir elektronlu (OH[•] gibi) radikal yağ asidi zincirinden bir hidrojen çekerek karbon merkezli bir radikal (L[•]) oluşturur. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğraması ile molekül içi çift bağların değişmesi sonucu konjuge dien yapıları oluşur. Oluşan değişikliklerin ardından lipit radikali hemen dioksijenle reaksiyona girer ve lipit peroksil radikalini oluşturur (b). LOO[•] çoğalma turlarının zincir taşıyıcı radikalidir (c) (103,113,114).



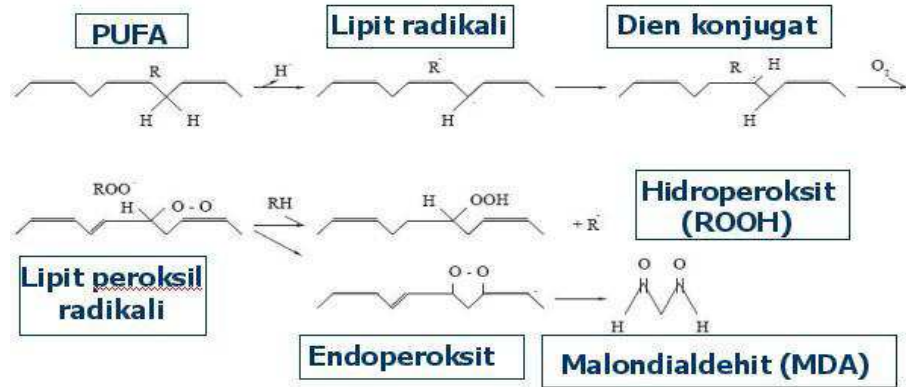


Lipit peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni karbon merkezli radikaller oluştururken, kendileri de açığa çıkan H parçacığı ile birleşerek lipit hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder (103).

Lipit hidroksit formu başlangıca veya zincir dallanmasına öncülük yapacak şekilde hareket eder (e). Bu yüzden lipit peroksidasyonu kompleks, dallanan bir serbest radikal zincir reaksiyonudur.



Çoğalma evresi lipit zincirdeki çeşitli C-H bağ disasiasyon enerjileri tarafından yönlendirilir. En zayıf C-H bağı bis-allilik metilen pozisyonundadır (111,115). Teorik olarak lipit zincirde ne kadar çok bis-allilik metilen pozisyonu var ise o kadar çok oksidasyona uğrayabilir (110-112)



Şekil 2 Lipit peroksidasyonunun kimyasal yolu

Lipit peroksidasyonu ya toplayıcı antioksidan reaksiyonlarla sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma tepkimeleri ile devam eder (103). Şekil 2' de lipit peroksidasyonu şematik olarak gösterilmiştir (106).

Lipit hidroperoksitlerinin membranlarda birikimi sonucu, membran fonksiyonları bozulur ve hücre kollebe olur. Ayrıca lipit hidroperoksitleri geçiş metalleri katalizi ile yıkıldığında çoğu zararlı olan aldehitler oluşurlar. Lipit peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan çeşitli aldehitlerden en iyi bilinenleri MDA ve 4-hidroksinonenaldır. MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonu değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bu bileşikler ya hücrel olarak metabolize olurlar ya da başlangıçta etkili oldukları bölgeden diffüze olup hasarı hücrenin diğer bölgelerine yayarlar. Lipit radikallerinin hidrofobik yapıda olması dolayısı ile reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Peroksil radikalleri ve aldehitler, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece membranlarda, reseptörleri ve membrana bağlı enzimleri inaktive etmek suretiyle membran proteinlerinde de ciddi hasarlar meydana getirebilirler. İyon transportunu etkileyebilirler. Plazma lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinler de oksidasyona uğrayabilir. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler (70,116-117).

Araşidonik asit metabolizması sonucu lipitlerden serbest radikal üretimine 'enzimatik lipit peroksidasyonu', diğer radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna ise 'enzimatik olmayan lipit peroksidasyonu' adı verilir (70,103,109).

2.2.4.2. 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 fragmantasyonu, 3) Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalardır (118).

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 (119).

Serbest radikaller etkisiyle IgG ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin O₂ veya H₂O₂ ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (75,120).

2.2.4.3. Nükleik Asitler ve DNA Üzerine Etkileri

İyonize edici radyasyona bağlı hücre ölümünün başlıca nedeni nükleik asitlerin reaktif oksijen türleri ile reaksiyonudur. Reaktif oksijen türleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine sebep olabilir. Bu da kromozal mutasyonlar ve sitotoksisite ile sonuçlanır (121-123).

Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir. DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. Fe^{2+/3+} ve Cu^{1+/2+} iyonları negatif yüklü DNA'ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA'ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H₂O₂'in hedefi haline getirmektedir. DNA'ya bağlı metal iyonları ile H₂O₂'in DNA üzerinde reaksiyonlaşmasından oluşan OH radikalleri, OH radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, OH radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir (124).

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (70,72,108,122,123,125). Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazı bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali

DNA' nın yakınında meydana gelirse pürin ve pirimidin bazlarına atak yapabilir ve mutasyonlara sebep olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerde doymuş karbon atomlarından hidrojen çıkarır veya çift bağlara katılma tepkimeleri ile sonuçlanan tepkimelere girer. Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Süperoksit anyonu güçlü bir oksitleyici olduğundan guanin gibi yüksek elektron yüklü yoğunluklu bölgeler içeren moleküllerle daha kolay tepkimeye girer (121).

DNA'da oksidatif hasar ile ilk oluşan lezyon dal kırıklarıdır. Dal kırıkları DNA onarımı sırasında nükleaz aktivitesi ile de oluşabileceğinden her zaman oksidatif DNA hasarını göstermemektedir. Tek dal kırıklarında, diğer daldaki bilgi doğru okunarak 'hasarlı dal onarıcı enzimlerle' onarılabildiğinden çift dal kırıkları daha önemlidir. OH radikali pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlar meydana getirmektedir. Örneğin bir pürin olan guaninin 4, 5 veya 8 pozisyonlarındaki C atomlarına veya adeninin 4, 5, 6 pozisyonlarındaki C atomlarına OH radikali katılarak çeşitli ürünler oluşmaktadır. Günümüzde 100 kadar oksidatif DNA baz hasarı tanımlanmıştır (126).

2.2.4.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Glukoz otooksidasyonu, taşıyıcı metallerin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda glukozun kısmen radikal olan anyonları oluşturması ile meydana gelir. Bu radikaller, daha sonra O_2 'i indirgeyerek O_2^- anyonunu meydana getirirler. Bu da diğer ROS' ların oluşumunu tetikler. Proteinlerin glikolizasyonu, glukozun, proteinlerin amino grubuna bağlanmasıyla başlar. Bunun ardından bir seri kimyasal modifikasyon geçirerek, daha kararlı bir yapı olan protein-glukoz kompleksine dönüşür. Biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda oluşan glikolize proteinler ise, Cu ve Fe varlığında, O_2 'ye elektron vererek ROS' ların oluşmasına neden olurlar (127,128).

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda H_2O_2 , peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı çeşitli hastalıkların patolojisinde önemli rol oynarlar (70,108).

2.3. Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada koruyucu mekanizmalar vardır. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tümüne birden genel olarak Antioksidanlar denir (70,122,129,130).

Etkilerini; lokal oksijen konsantrasyonunu azaltarak, hidroksil radikallerini temizleyip lipit peroksidasyonunun başlamasını önleyerek, geçiş metal iyonlarını bağlayıp etkisizleştirerek, peroksitlerin alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak ve zincir reaksiyonlarına neden olan tüm radikaller ile reaksiyona girip zinciri kırarak gösteren antioksidanlar; intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere iki grupta incelenirler. En belirgin özellikleri okside olan substratlara oranla çok daha az konsantrasyonlarda bile substratın oksidasyonunu geciktirmeleri ve inhibe etmeleridir (131).

Antioksidanlar etkilerini şimdiye kadar tespit edilen altı değişik mekanizma ile gösterirler (108,122,131-133). Bu mekanizmalar birbirinden bağımsız veya bir arada işleyebilmektedirler.

I. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltırlar.

II. Hidroksil radikali yapısında yer alan hidrojen atomları bağ oluşturabilecek yapıdaki ürünleri temizleyerek peroksidasyonun başlamasını önleyebilirler.

III. Membran lipitlerini direkt etkileyerek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni baskılayabilir veya temizleyebilirler (131).

IV. Metal iyonlarını bağlamak yoluyla reaktif grupların (OH[•], ferril ya da Fe⁺²/Fe⁺³/O₂ kompleksleri gibi) ve/veya lipit peroksitlerden peroksil ve alkoksil radikallerinin oluşumunu önleyebilirler. Membranlarda lipit peroksidasyonunun başlamasına hangi reaktif ürünlerin neden olduğu tartışılmaktadır, ancak hem başlangıç hem de oluşan lipit

peroksitlerin dekompozisyonu için transisyonel metal iyonlarına ihtiyaç olduğuna dair genel bir kanı vardır.

V. Peroksitleri, alkol gibi nonradikal ürünlere çevirebilirler. Örneğin; GPx, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır.

VI. Zincir kırabilirler yani; zincir oluşumuna neden olabilen serbest radikallerle reaksiyona girebilirler ve yağ asidi zincirlerinden sürekli hidrojen iyonu salınımını önleyebilirler. Zincir kırıcı antioksidanlar için de fenoller, aromatik aminler ve en yaygın olan a-tokoferol yer almakla birlikte başka lipit solubl zincir kırıcı antioksidanlar da vardır (131).

Lipit peroksidasyonunu yukarıdaki mekanizmalardan ilk dört tanesi ile önleyenler 'Koruyucu Antioksidanlar' olarak kabul edilmektedir. Dördüncü mekanizma ile etki edenler reaksiyon sırasında tüketilmezler. Beşinci mekanizma ile etki eden antioksidanlar ise koruyucu olmakla birlikte reaksiyon sırasında kimyasal karakterlere göre tüketilebilir veya tüketilemezler. Altıncı mekanizma ile etki eden zincir kırıcı antioksidanlar ise zincir uzama reaksiyonlarına neden olan radikallerle kompleks yaptıklarından kırma reaksiyonu sürecinde tüketilirler. Burada özellikle vurgulanması gereken nokta antioksidanların pek çoğunun tek bir mekanizma üzerinden etki etmediği, birden fazla mekanizma ile asıl etkisini oluşturduğudur. Ek olarak oksidatif hasarın hızlı tamiri ki bu, peroksidize yağ asitlerinin membran lipitleri arasından temizlenmesi şeklinde olur, lipit peroksidasyonunu yavaşlatabilir. Membrandaki yapısal değişiklikler de peroksidabiliteye etki edebilir. Antioksidanlar sadece lipitlerin değil, belki okside olmaları çok daha zararlı olabilen DNA ve proteinlerin de korunmasında etkilidir (70,72,90,108,109,123,131,134).

Antioksidan savunma; radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi, oluşan hücre haraplanmasının onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan kapasitenin artırılması olarak ayrımlanan beş değişik blokta yürür (103). Bazı otoriteler antioksidan savunmayı komponentlerin enzimsel olup olmamasına bakarak, katalaz, SOD ve GSH-Px'ın rol aldığı antioksidan aktiviteleri Enzimatik antioksidan savunma ; α -tokoferol, askorbat,

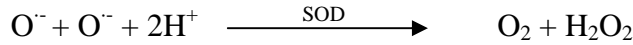
glutasyon, ürik asit, glukoz gibi maddelerle gerçekleştirilen deoksidasyon işlemlerini Enzimatik olmayan antioksidan savunma olarak tanımlar (135). Öte yandan, antioksidanlara daha spesifik rollerin yüklendiği çalışmalarda, antioksidan savunma; sellüler, mambransal ve extrasellüler olarak sınıflandırıldığı görülmektedir (136).

2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Antioksidan savunmanın ilk basamağı süperoksitin H_2O_2 ' e dismutasyonunun katalizleyen SOD (EC 1.15.1.1) enzimidir (95,130,136-141).

Süperoksit radikallerinin H_2O_2 ve O_2 ' ne dismutasyonunu sağlayan süperoksit dismutaz enzimi ilk olarak inek eritrositlerinden saflaştırılmıştır (136). SOD aerobik hücrelerde oksijen radikalinin zararına karşı intraselüler savunmada büyük rol oynar ve aktivitesinde yaşlanmaya bağlı olarak bir azalma olmaktadır (142).



SOD enzimi kofaktör olarak içerdiği metal iyonu tipine göre üç sınıfta toplanır (137,143-146). İnsanda SOD' un iki tipi bulunmaktadır. Bunlar; sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn içeren izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn içeren izomerdir (Mn-SOD). Prokaryotlarda bulunan ve Fe içeren bir izomeri daha vardır (Fe-SOD). Ayrıca 1982 yılında glikoprotein yapısında olan ekstraselüler SOD (EC-SOD) tanımlanmıştır (147).

Sitozolik SOD yapısında bakır ve çinko (CuZn-SOD), mitokondrial SOD yapısında mangan (Mn-SOD) bulunmaktadır (148). Çinkonun stabiliteyi sağladığı ve bakırın ise aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir (149). SOD izoformlarının dağılımı dokudan dokuya farklılık gösterir. İskelet kasında toplam SOD aktivitesinin % 15-35 kadarı mitokondride iken geriye kalan % 65-85 'lik kısmı sitozoldedir (150).

Cu-Zn SOD, ilk defa 1969 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. Cu-Zn SOD, hayvansal hücrelerin sitozolünde yer alan enzimin molekül ağırlığı yaklaşık olarak 32000 daltondur. Birbirinin aynı olan iki alt ünitelerden meydana gelir. Her subünitede bir Cu atomu, bir Zn atomu, bir zincir içi disülfür köprüsü, bir sülfidril grubu ve bir asetillenmiş terminal amino grubu bulunduğu tespit edilmiştir (64).

Mn-SOD; prokaryotik hücrelerde molekül ağırlığı 40000 dalton olan, birbirinin aynı olan iki alt birimden oluşan ve enzimin alt birimi başına birer atom Mn bağlı olan bir dismutaz içerirler. Mitokondri dismutazı da diğer prokaryotik hücrelerdeki dismutaza benzer, ancak 80000 dalton molekül ağırlığında tetramer yapıdadır. Mitokondri ve diğer prokaryotların dismutazlarının primer yapıları da birbirine çok benzer. Mitokondri dismutazının bu özelliği, mitokondrinin prokaryotik orijinli olup, ökaryotik hücre içine girerek simbiyotik bir yaşam oluşturduğuna kanıt kabul edilir. Aynı tepkimeyi katalizlemeleri dışında Mn-SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur (131).

Bazı bakteriler birden fazla SOD içerirler. Bunlardan biri bütün prokaryotlarda bulunan Mn-SOD olup, hücre stoplazmasında bulunur. Bazı bakteriler periplazmik bölgelerinde demir içeren bir SOD (Fe-SOD) bulundurlar (151). Bu dismutaz faktörü dışında Mn-SOD' a benzer. Bu tip mikroorganizmalarda matrix enziminin (Mn-SOD) endojen O_2^- radikallerine karşı demir içeren dismutazın ise çevreden gelen radikallere karşı koruyucu fonksiyon gördüğü kabul edilmektedir (152). Mn-SOD ve Fe-SOD enzimlerinin biri ya da her iki birden prokaryotlarda bulunur.

SOD enziminin canlılardaki dağılımı katalaz ile birlikte incelenmelidir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürün, oksijenin toksik ürünlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir (151).

2.3.1.2. Katalaz

Katalaz (KAT, EC 1.11.1.6), tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, dört hem grubu içeren bir hemoproteindir. Molekül ağırlığı 248000 daltondur.

Hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya katalizler (70,153,154). Demir (Fe^{+3}), enzimin aktif bölgesine bağlanması gereken bir kofaktördür (155).

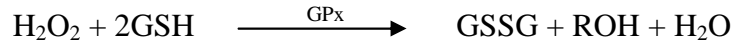
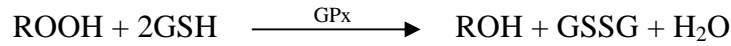


Katalaz hücre içinde büyük çoğunlukta peroksisomlarda bulunur ama mitokondrielerde de az miktarda bulunmaktadır (155). Katalaz' ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ile metil ve etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipit hidroperoksitlerine etki etmez. Kan, kemik iliği, mukoz membranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır (70,117,130,140,153,156).

Katalaz ve glutatyon peroksidaz aynı fonksiyona sahip fakat substrat olan H_2O_2 ' ye farklı affinite gösteren enzimlerdir. Memeli glutatyon peroksidazı, katalaz ile karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda bile H_2O_2 ' ye daha yüksek afinite göstermektedir (157).

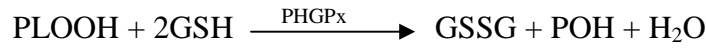
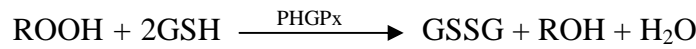
2.3.1.3. Glutatyon Peroksidaz

Selenyum içeren peroksidazlara iyi bir örnek olan glutatyon peroksidaz (EC 1.11.1.19), GSH' ı kullanarak çeşitli hidroperoksitlerin ($ROOH$ ve H_2O_2) redüksiyonunu katalizler ve bu sayede memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı korur.



Memelilerde en az beş çeşit GPx izoenzimi bulunmaktadır. Her dokuda bulunmalarına karşın, her izoformun miktarı doku tipine göre değişir. Sitolik ve mitokondrial glutatyon peroksidaz (GPx1), yağ asidi hidroperoksitlerini ve hidrojen peroksidi GSH kullanarak indirger. GPx1 ve fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz GPx4 (PHGPx) da çoğu dokuda bulunur. GPx4 hem sitozolde hem de

membran fraksiyonlarında lokalizedir. PHGPx peroksidize membran ve oksidize lipoproteinlerde oluşan fosfolipit, yağ asidi ve kolesterol hidroperoksitlerini direk indirgeyebilir (158). GPx1 daha çok eritrosit, böbrek ve karaciğerde bulunurken; GPx4, renal epitel hücre ve testislerde bulunur. Sitozolik GPx2 (GPx-G1) ve ekstraselüler GPx3' e sırasıyla gastrointestinal sistem ve böbrek dışındaki çoğu dokuda az rastlanır. Bu aileye yeni katılan ve fare epidermisinde rastlanan GPx5' in selenyum bağlı olmaması ise ilginçtir.

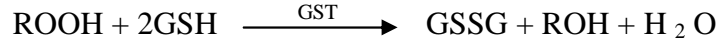


GPx'in molekül ağırlığı 80.000 Dalton'dur. Dört identik subünitesinin her birinde enzim aktivitesi için esansiyel olan bir selenosistein (Sec) kalıntısı içerir (159). GPx substratını (H_2O_2) katalazla paylaşmasına rağmen, lipit ve diğer organik peroksitlerle etkili şekilde tek başına reaksiyona girer. Glutasyon redoks döngüsü düşük seviyeli oksidatif stres için ana savunma kaynağıdır ama Katalaz şiddetli oksidatif strese karşı korumada daha önemlidir (160). Katalaz' ın H_2O_2 ' ye düşük afinitesinin GPx' den daha düşük olması yüzünden uzun bir süre, hayvan hücrelerinde ve özellikle insan eritrositlerinde H_2O_2 ' nin detoksifikasyonunda esas antioksidan enzimin GPx olduğu düşünülmüştür.

2.3.1.4. Glutasyon-S-Transferazlar

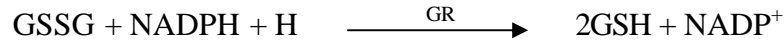
Dimer yapıda, molekül ağırlığı 50000 dalton olan, yedi farklı formda alt ünite taşıyan ve sekiz izoenzimi olan bir proteindir (161,162). Selenyuma (Se) bağlı olmayan glutasyon peroksidaz olarak adlandırılır (EC 2.5.1.18). Membran lipit peroksidasyonunu yalnızca fosfolipaz A2' nin varlığında inhibe eder. Öncelikle araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipit peroksitlere karşı Se bağımsız GSH peroksidaz gibi aktive göstererek antioksidan etki gösterir (70,163).

İnsanda birçok dokuda geniş dağılıma sahip, çok işlevli ve geniş spektrumlu substrat özelliği olan bir enzimdir (164). Glutasyon S-transferaz (GST) bu özelliği ile potansiyel toksik kimyasallara maruz kalan canlı organizmada savunma görevi görür. Detoksifikasyon görevini glutasyonun -SH grubu ilgili bileşiklerin elektrofilik bölgelerini nötralize ederek gerçekleştirir. Oluşan ürün suda çözünen merkaptürik asittir ve idrar ile vücuttan atılır (165-177).



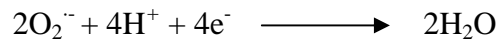
2.3.1.5. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz (EC 1.6.4.2) molekül ağırlığı 120000 dalton olan 2 alt birimli bir proteindir (168,169). Hidroperoksitlerin redükte olması esnasında meydana gelen okside glutasyon (GSSG), Glutasyon Redüktaz' ın katalizlediği reaksiyonla tekrar redükte hale (GSH) dönüşür. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH' a ihtiyaç vardır (70,117,168-170).



2.3.1.6. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, superoksidi detoksifiye eden enzimdir.



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli devam eden normal bir reaksiyondur ve bu yolla yakıt maddelerin otooksidasyonu tamamlanarak enerji üretimi sağlanır (70,123,129,130,146). Ancak, süperoksid üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar.

2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**2.3.2.1. Askorbik Asit (C Vitamini)**

Askorbat, altı karbonlu bir laktondur ve pek çok memeli türünde karaciğerde glukozdan sentezlenir. Ancak insanda askorbik asidin sentezlenmesi için esansiyel olan glukolakton oksidaz enzimi bulunmaz ve bu sebeple sentezi gerçekleşemez (171,172). C vitamini elektron donorü ve dolayısıyla indirgeyici ajandır. Bilinen bütün fizyolojik ve biyokimyasal hareketleri elektron donorü olmasından kaynaklanır.

Su bazlı ortamlarda geniş antioksidan kapasiteli vitamin C, lipit ortamların güçlü antioksidanı olan vitamin E' nin antioksidan etkisini andıran bir rol üstlenerek kan ve diğer vücut sıvılarının primer antioksidan savunmasını gerçekleştirir Askorbik asit, süperoksit ve hidroksil radikalleriyle reaksiyona girip onları temizleyen bir antioksidan olmasının yanı sıra tokoferoksil radikalinin tekrar tokoferole dönüşmesini sağlar. Bu esnada kendisi de dehidroaskorbata okside olur. C vitamini yetersizliği durumlarında oluşan tokoferoksil radikalleri tokoferole dönüşmek için GSH ile reaksiyona girdiğinden hücredeki GSH miktarını azaltacaktır. Vitamin C'nin singlet oksijen süperoksit, hidroksil, hidroperoksil, lipit peroksil ve lipit alkoksil radikallerini ortamdan temizleyerek antioksidan etkisini gösterdiği bilinmektedir. Lipit moleküllerinin oksidasyonu ile oluşturduğu lipit peroksitlerinin sulu ortamlarda çözünmesinin de vitamin C'nin antioksidan etkisiyle oluştuğu ileri sürülmektedir Bazı biyolojik sistemlerde lipozomal metil linoat misellerinin oksidasyonunu baskılayan antioksidan aktivitenin de vitamin C'den oluştuğu söylenmektedir (173).

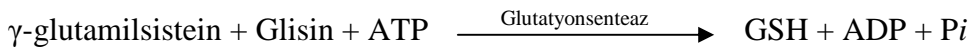
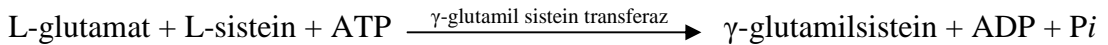
2.3.2.2. Glutasyon

Redükte glutasyon (GSH); glutamik asit, sistein ve glisin içeren bir tripeptit olup, aktif bir sülfidril (-SH) grubuna sahiptir. Hemen hemen bütün hayvan hücrelerinde ve bazı bakterilerde bulunur (174,175). GSH 'ın hücrel antioksidan savunmada birçok rolü vardır (174-176,177). En önemli antioksidan görevi H₂O₂ ve organik peroksitleri (lipit peroksit gibi) selenyum bağımlı enzim GPx ile katalizleyip yok ederek sırasıyla su

veya alkole dönüşmesidir. Bir çift hidrojen iyonu vererek GSSH' a yükseltgenir, GSSH ise glutatyon redüktaz tarafından katalizlenir. Bu reaksiyon GPx ile oluşur, böylece GSH' ın meydana gelebilmesi için bir redoks döngüsü sağlanmış olur (176,178). Gerekli olan NADPH dokuya göre ya heksozmonofosfat şantından ya da izositrat dehidrojenaz ve malik enzim tarafından katalizlenen reaksiyon sonucunda oluşur (175-187).

En önemli görevi, enzim ve proteinlerin tiyol gruplarının indirgenmesi ile redükte formlarının yeterli düzeylerde kontrolünü sağlamaktır. Tiyol grubuna sahip birçok enzim düşük hızda fakat okside olarak ya da oksijenin direk etkisi ile hızla aktivitelerini yitirirler. İşte GSH kendisi okside olup tiyol gruplarını tekrar indirgeyerek bunların aktivasyonunu sağlar. Özellikle H₂O₂' nin elimine edilmesinde GSH' ın oksitlenebilirliğinden faydalanılır (70,168).

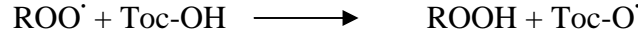
GSH hücrede en çok bulunan kısa zincirli peptid olup hücrenin protein olmayan tiyol kaynağıdır (174,175). Hücredeki GSH konsantrasyonu milimolar oranlarda olup, organların fonksiyon ve oksidatif kapasitesine göre farklı organlarda farklı miktarlarda bulunur. Karaciğer GSH'ın vücutta en yüksek konsantrasyonda olduğu organdır. Ayrıca gözün lens kısmında da GSH konsantrasyonu yüksektir (155). Akciğer, böbrek, kalp gibi organlarda da 2-3 mM GSH bulunur. Kırmızı kan hücreleri, plazma ile karşılaştırıldığında daha fazla GSH' a sahip oldukları ve oksidatif strese karşı daha koruyucu oldukları görülür (179).



2.3.2.3. α -Tokoferol (Vitamin E)

α -Tokoferol yağda çözünen ve zincir-kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi oksijen serbest 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 (180). Bunun sonucunda serbest radikal zincir reaksiyonları kırılır.



Toc-OH = TOKOFEROL

Oluşan serbest α -tokoferol radikali bundan sonra yeni bir serbest peroksit radikaliyle reaksiyona girer. Böylece α -tokoferol kolay reversibl oksidasyona uğramaz. Kroman halkası ve yan zincir şeklindeki serbest olmayan radikal ürününe okside olur. Bu oksidasyon ürünü ikinci konumundaki hidroksil grubu üzerinden glukoronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yoluyla atılır (181).

Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. Bundan dolayı en yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipit yapılarında örneğin eritrosit ve solunum sistemi membranlarında etkileri belirgindir (182,183).

2.3.2.4. Karotenoidler

Vitamin A'nın ön maddesi olan β -karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve peroksit radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü saptanmıştır (70). Karotenoidler; bitki, hayvan ve insanlarda oluşan yeşil ve kırmızı renkli pigmentler grubuna girerler. Fizyolojik olarak oldukça önemlidirler. Reaktif oksijen türleri ile güçlü bir etkileşime girerek, bitkisel ve hayvansal organizmalarda potansiyel serbest radikal giderici, singlet oksijen yakalayıcı ve lipit antioksidanları olarak görev yaparlar (184). Karotenoidler; uzun, alifatik, konjuge çift bağlı sistemlerdir. Hidrokarbondan oluşan bir kısım içerirler ve bu genelde sekiz izopren birimden oluşur. Molekül formülü $\text{C}_{40}\text{H}_{56}$ ' dir (184).

Karotenoidler OH^\cdot , O_2^\cdot ve peroksil radikalleri ile etkileşime geçerek mükemmel bir radikal süpürücüsü olarak iş görürler. Yapılarındaki çift bağların yerleşik olmayan eşleşmemiş elektronlara bağlanması sonucu antioksidan aktivitesi gösterirler (185). Yüksek konsantrasyonlarında lipitleri peroksidasyon zararından korurlar. Serbest

radikaller ile karotenoidler arasındaki etkileşimin açıklanmasında genel olarak üç mekanizma ileri sürülmektedir: Serbest radikallere yeni bir radikal ekleme, yapısından bir H⁺ kopararak radikali etkisiz hale getirme ve yapısından bir elektron transfer ederek radikali yüksüzleştirme şeklindedir (186).

2.3.2.5. Melatonin

Melatonin, karanlıkta pineal bezden salgılanan; uyku, üreme, immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Melatoninin bir antioksidan olduğu, literatürde ilk kez 1991 yılında Ianas ve arkadaşları tarafından öne sürülmüş ve daha sonra yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarla desteklenmiştir. Melatoninin OH[•], H₂O₂ gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir. Melatoninin antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır (187).

Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki melatoninin; SOD gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir. Ayrıca melatoninin bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir. Bunların dışında melatonin hem suda ve hem de lipit fazda çözünebildiğinden, organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen melatonin için, bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, melatoninin tüm intraselüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece melatonin, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Hücre membranı ile temas ettiğinde, fosfolipit tabakanın dış yüzeyine tutunan melatonin, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve membranı korur. Melatonin varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan radikallerin üretimi de azalmaktadır. Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatoninine bir üstünlük sağlamaktadır. Daha da önemlisi, diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve 5 yıl gibi uzun süre kullanımda bile, melatoninin toksik bir etki göstermemesidir (187).

2.3.2.6. Polifenoller

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.

2.3.2.7. Seruloplazmin

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmını akut faz proteini olan seruloplazminden kaynaklanır. Seruloplazmin SOD'a benzer bir mekanizmayla etki gösterir. Ferro demiri (Fe^{2+}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder.

2.3.2.8. Ürat

Normal plazma konsantrasyonunda ürat, hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler. Fakat lipid radikalleri üzerine etkisi yoktur. Ayrıca vitamin C oksidasyonunu engelleyici etkisi vardır.

2.3.2.9. Transferrin ve Laktoferrin

Transferrin ve laktoferrin dolaşımdaki serbest demiri bağlarlar.

2.3.2.10. 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. Bu biyolojik olarak önemli olmayan, albumine ait bir reaksiyon örneğidir. Aynı zamanda myeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl'i hızlı bir şekilde temizler.

2.3.2.11. Bilirubin

Hem katabolizması ile meydana gelen ve albumine bağlı olarak taşınan bir safra pigmentidir. Bilirubin süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

2.4. Lökositler

Lökositler vücudun savunma sisteminin hareketli birimleridir. Kısmen kemik iliğinde (granülositler, monositler ve az sayıda lenfosit) oluşurlar. Oluştuktan sonra, kan ile kullanılacakları farklı vücut bölgelerine taşınırlar. Lökositlerin (Akyuvarlar) gerçek önemleri çoğunun spesifik olarak ciddi enfeksiyon ve inflamasyon bölgelerine taşınmalarıdır, böylece olabilecek herhangi bir enfeksiyon ajanına karşı hızlı ve güçlü bir savuma sağlarlar. Bu işlemler iki yolla gerçekleşir. 1. Yayılımcı ajanları fagositoz ile harap ederek. 2. Antikorlar ve duyalı lenfositler oluşturarak (188).

2.4.1. Lökositlerin Genel Özellikleri

Kanda normalde altı çeşit akyuvar bulunur. Bunlar polimorfonükleer nötrofiller, polimorfonükleer eozinofiller, polimorfonükleer bazofiller, monositler, lenfositler ve seyrek olarak plazma hücreleridir. Ayrıca çok sayıda trombosit bulunur, bunlar kemik iliğinde bulunan ve akyuvarlara benzeyen bir başka hücre tipi olan megakaryositlerin parçalarıdır. İlk üç hücre tipi granül görünümü için Granülositler olarak veya klinik terminolojide çok nükleuslu oldukları için “polimorfonükleer hücreler” diye adlandırılırlar. Granülositler ve monositler yayılımcı organizmayı esas olarak sindirerek yani fagositoz ile vücudu korurlar. Lenfosit ve plazma hücrelerinin fonksiyonu ise temelde immün sistem ile ilişkilidir. Trombositlerin fonksiyonu ise kanın pıhtılaşma mekanizmasını aktive etmektir. Erişkin insanda milimetre küp kanda 7.000 kadar akyuvar vardır. Tüm akyuvarların farklı hücre tiplerinin normal yüzdeleri yaklaşık olarak şöyledir. Polimorfonükleer nötrofiller % 62.0, polimorfonükleer eozinofiller % 2.3, polimorfonükleer bazofiller % 0.4, monositler % 5.3, lenfositler % 30.0, bunların

dışında hücre parçacıkları olan trombositlerin sayıları milimetre küp kanda normalde 300.000 kadardır (188).

2.4.2. Lökositlerin Oluşumu

Granülositler ve monositler yalnız kemik iliğinde oluşur. Lenfositler ve plazma hücreleri esas olarak lenfoid dokularda, lenf bezleri, dalak, timus, tonsiller, vücudun çeşitli yerlerindeki lenfoid dokularda, özellikle kemik iliğinde ve barsak duvarı epiteli altında uzanan Peyer plaklarında üretilirler. Kemik iliğinde oluşan akyuvarlar, özellikle de granülositler, dolaşım sisteminde gerek duyuluncaya kadar, ilikte depolanırlar. Ardında ihtiyaç duyulduğunda çeşitli faktörlerle salınımına yol açılır. Normalde tüm kanda dolaşımın üç katı kadar granülosit ilikte depolanır. Bu yaklaşık altı günlük granülosit kaynağı sağlar. Geçici olarak kanda taşınan az sayıda lenfosit dışında lenfositlerin çok büyük kısmı lenfoid dokunun çeşitli bölgelerinde depolanır (188).

2.4.3. Lökositlerin Yaşam Süresi

Kanda lökositlerin başlıca bulunma nedeni kemik iliğinden veya lenfoid dokudan gereksinim duyulan yerlere taşınmalarıdır. Kemik iliğinden salındıktan sonra granülositlerin ömrü normalde dolaşım kanında 4-8 saat, dokularda da 4-5 gündür. Ciddi doku enfeksiyonlarında bu toplam yaşam süresi genellikle birkaç saate kadar düşer, çünkü granülositler hızla enfekte bölgeye gider, fonksiyonlarını yerine getirir ve süreç içinde kendi kendilerini haraplarlar.

Monositlerin taşınma zamanı da kısadır, kapiller membrandan dokulara geçmeden önce 10-20 saat kadar dolaşımında kalırlar. Dokularda şişerek genişlerler, doku makrofajları haline gelmeye başlarlar ve bu formda fagositik fonksiyonları sırasında yıkılmadıkça aylarca hatta yıllarca yaşayabilirler. Doku makrofajları, doku makrofaj sisteminin temelini oluşturarak dokularda enfeksiyonlara karşı sürekli bir savunma sağlarlar. Lenfositler, lenf düğümleri ve diğer lenfoid dokulardan lenfatik drenaj ile sürekli olarak dolaşıma katılırlar. Ardından birkaç saat sonra, diapedez ile dokulara geçerler. Daha sonra tekrar lenfe girerler ya lenfoid dokuya ya da kana tekrar dönerler;

böylece tüm vücutta lenfositlerin sürekli dolaşımı vardır. Lenfositlerin yaşam süresi, vücudun bu hücrelere gereksinimine göre haftalarca, aylarca, hatta yıllarca olabilir. Kandaki trombositler yaklaşık her on günde bir değişir, bir başka deyişle hergün milimetreküp kan için yaklaşık 300.000 trombosit yapılır (188).

2.4.4. Fagositoz

Nötrofil ve makrofajlar esas olarak yayılımcı bakteriler, virüsler ve diğer zedeleyici ajanlarla savaşır ve harap ederler. Nötrofiller, bakteriler ve virüslerle dolaşan kanda bile savaşır, onları harap edebilen olgun hücrelerdir. Diğer yandan makrofajlar yaşamlarına enfeksiyon ajanları ile savaşma yetenekleri kısıtlı, henüz tam gelişmemiş kan monositleri şeklinde başlarlar. Bazen çapları beş misli artarak 60-80 mikrometreye kadar ulaşırlar. Ayrıca sitoplazmalarında çok sayıda lizozom gelişerek, sitoplazmaya granül ile dolu kese görünümü verir. Bu hücrelere artık makrofaj denir ve hastalık etkenleri ile savaşma yetenekleri fazladır. Nötrofil ve makrofajların en önemli fonksiyonları olan fagositoz sardırgan ajanın hücresel sindirimi demektir. Fagositler, fagosite edilecek materyalde seçici olmalıdır, aksi takdirde vücudun normal yapıları ve hücreleri de sindirilir. Fagositozun olup olmaması özellikle üç seçici işleme dayanır. İlk olarak vücudun doğal yapılarının pek çoğu fagositoza dirençli olan pürüzsüz yüzeylere sahiptir. Fakat eğer yüzey pürüzlü hale gelirse, fagositoz olasılığı artar. İkincisi, Vücudun doğal yapılarının çoğu, fagositleri iten koruyucu, protein kılıflara sahiptir. Diğer yandan ölü dokularda ve yabancı patiküllerin çoğunda genellikle koruyucu kılıf yoktur, bu da onları fagositoz için uygun hale getirir. Üçüncü olarak, vücut bazı yabancı oluşumları fark eden özel bir sisteme sahiptir. Bu durum İmmün sistemin bir sonucudur. İmmün sistem, bakteri gibi enfeksiyöz ajanlara karşı antikorlar geliştirir. Ardından antikorlar bakteri membranlarına tutunur ve böylece bakteri fagositoz için elverişli hale getirilir.

Nötrofillerle fagositozda, dokulara giren nötrofiller olgun hücreler oldukları için derhal fagositoza başlayabilirler. Fagosite edilecek partiküle yaklaşıncaya nötrofil önce partiküle tutunur ve sonra partikül etrafında her yöne doğru pseodopodlar uzatır. Karşılıklı pseodopodlar birbiri ile kaynaşır. Böylece içinde fagosite edilen partikülü bulduran kapalı bir bölme oluşturur. Ardından bu bölme sitoplazmik kavitenin içine

doğru çöker ve hücre membranından ayrılarak sitoplazma içinde serbestçe yüzen fagositik vezikülü oluşturur. Bir nötrofil, kendisi inaktive olup ölmeden önce genellikle 3-20 bakteriyi fagosite edebilir.

Makrofajlar immün sistem tarafından aktive edildiklerinde nötrofillerden çok daha güçlü fagositoz yapabilirler, genellikle 100 bakteriyi fagosite edebilecek yetenektedirler. Nötrofiller bakteriden daha büyük partikülleri fagosite edemezken, makrofajlar çok daha büyük partikülleri örneğin tüm bir alyuvarı veya nadiren de olsa sıtma parazitlerini bile yutabilirler. Ayrıca makrofajlar, partikülleri sindirdikten sonra artık ürünlerini atabilir ve aylarca yaşayabilirler (188).

2.4.5. Lökosit Kaynaklı Komplikasyonlar

2.4.5.1. Lökopeni

Lökopeni veya agranülositoz olarak bilinen ve nadiren ortaya çıkan klinik durumda, kemik iliği akyuvar yapımını durdurarak vücudu bakterilere ve dokuları istila eden diğer ajanlara karşı korunmasız bırakır. Normalde insan vücudu birçok bakteri ile simbiyoz halinde yaşar çünkü vücudun bütün muköz membranları sürekli olarak çok sayıda bakteri ile karşılaşır. Akyuvar sayısındaki herhangi bir azalma, vücutta zaten var olan bakterilerin derhal dokulara yayılmasına yol açar. Kemik iliği akyuvar yapımını durdurduktan iki gün sonra ağız ve kolonda ülserler görülebilir veya kişide ağır solunum enfeksiyonları gelişir. Ardından ülserlerdeki bakteriler hızla çevre dokulara ve kana yayılırlar. Tedavi edilmezse, akut total lökopenin başlamasından bir haftadan az bir süre sonra sıklıkla ölüm gerçekleşir. Nükleer patlama nedeniyle vücudun gamma ışınları ile irradasyonu, benzen ve antrasen çekirdeği içeren kimyasal maddeler veya ilaçlarla karşılaşma kemik iliği aplazisine neden olur. Gerçekten de bilinen ilaçların bazıları örneğin kloramfenikol (antibiyotik), tiyourasil ve hatta çeşitli barbitürat hipnotikler agranülositoz (veya kemik iliği aplazisi, kemik iliğinde hiçbir hücrenin alyuvarlarda dahil üretilmemesi) nedenleridir, böylece bu hastalığın tüm enfeksiyon aşamaları gelişir. Kemik iliğinin irradasyon harabiyetinden sonra bazı kök hücreler, miyeloblastlar ve hemositoblastlar genellikle ilikte zedelenmeden kalırlar ve yeterli

zaman sağlandığında kemik iliğini rejenere etme yeteneğindedirler. Enfeksiyonları engelleyen antibiyotikler ve diğer ilaçlarla uygun şekilde tedavi edilen hastada genellikle birkaç hafta ile birkaç ay içinde kan hücreleri konsantrasyonunu normale getirecek yeterli kemik iliği oluşur (188).

2.4.5.2. Lökositoz

Organizmanın savunma sisteminin hareketli elemanları olan lökositler, organizmayı bakterilere, virüslere, parazitlere ve tümörlere karşı savunurlar. Lökositlerin 1 mm³ kandaki sayıları 4000-10000 arasında değişebilir. Ortalama lökosit sayısı 7000'dir. Lökosit sayısının 4000'nin altına düşmesine lökopeni, 10 000' nin üstüne çıkmasına ise lökositoz denilmektedir.

Akyuvarların kontolsüz üretimi, bir miyeloid ya da lenfoid hücrenin kanseröz mutasyonu nedeniyle ortaya çıkar. Bu, dolaşan kanda anormal akyuvarların sayısının çok artması ile karakterize lösemiye neden olur. Lösemiler iki genel tipe ayrılır. *Lenfoid Lösemiler* ve *Miyeloid Lösemiler*. Lenfoid lösemiler, lenfoid hücrelerin kanseröz üretimi nedeniyle olur, genellikle lenf düğümleri veya diğer lenfoid dokularda başlar ve sonra vücudun diğer bölgelerine yayılır. İkinci lösemi tipi olan miyeloid lösemi, kemik iliğindeki genç miyeloid hücrelerin kanseröz üretimi ile başlar ve sonra vücuda yayılır. Miyeloid lösemide kanseröz süreç, arasıra kısmi farklılaşmış hücreler üretir, bunlar *nötrofilik lösemi*, *eozinofilik lösemi*, *bazofilik lösemi* veya *monositik lösemi* olarak adlandırılabilir. Ancak daha sıklıkla lösemi hücreleri şekilsiz, değişikliğe uğramamış (indeferansiye) ve normal akyuvarların hiçbirine benzemeyen türdür. Genellikle daha inferansiye hücreler daha akut lösemiye neden olur ve eğer tedavi edilmezse genellikle birkaç ay içinde ölüme yol açar. Daha diferansiye (farklılaşmış) hücrelerde süreç oldukça kronik olabilir, bazen 10-20 yıla kadar yavaş yavaş gelişir. Lösemik hücreler, özellikle çok diferansiye hücreler, akyuvarların enfeksiyonlara karşı genel koruma sağlayıcı fonksiyonundan yoksundurlar (188).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Hasta grubu: Şanlıurfa ili, Tıfındır Sıtma Savaş Dispanserine başvuran, kalın damla ve periferik yayma yöntemiyle sıtma paraziti taşıdığı kesinleşen, anamnezinde enfeksiyon dışında herhangi bir şikayeti olmayan, fizik muayenesinde herhangi bir patoloji saptanmayan, klinik ve laboratuvar tetkiklerinde lokal veya sistemik hastalık tespit edilmeyen, 9 sıtmalı erkek ve 9 sıtmalı kadın toplam 18 birey hasta grubu olarak seçildi. Hasta grubunun yaş ortalaması 27.11 ± 7.13 idi.

Kontrol Grubu: Kontrol grubu olarak ise, kalın damla yöntemiyle sıtma paraziti taşımadıkları kesinleşen, anamnezinde herhangi bir şikayeti olmayan, fizik muayenesinde herhangi bir patoloji saptanmayan, klinik ve laboratuvar tetkiklerinde lokal veya sistemik hastalık tespit edilmeyen, alkol ve sigara kullanmayan, herhangi bir kanser risk faktörü taşımayan 9 sağlıklı erkek ve 9 sağlıklı kadın toplam 18 kişi seçildi. Kontrol grubunun yaş ortalaması 28.94 ± 6.15 idi.

3.2. Kan Örneklerinin Alınması

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan kişilerden tüm kan örnekleri, 12 saatlik açlığı takiben ve kan örneklerinin standardizasyonunun sağlanması amacı ile bireyler oturur pozisyondayken alındı. Kan örneklerinin alınmasında, hem geniş hem de yüzeye daha yakın olduğundan antekübital venler (median kübital ven ya da sefalik ven) kullanıldı. Antekübital venden 3 ayrı tüpe kan alındı. Birisi rutin hemogram sayımı için

EDTA'lı kan sayımı tüplerine, diğer ikisi heparinli tüplere alınıp bunlardan birisi lökositlerin elde edilmesinde kullanıldı, diğeri plazma parametrelerinin ölçümü için kullanıldı.

3.3. Kalın Damla Kan Preparasyonu

Parmak uçlarından lanset yardımı ile lam üzerine alınan kan 1 cm çapında yayıldıktan sonra havada kurutulmakta, fiske edilmeden boyanmakta, kurutularak ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmektedir. Bu şekilde boyandığı zaman eritrositler eridiği için parazitler hücre dışında üst üste yığılmış olarak görülmektedir. Görme alanına giren parazitlerle birlikte lökositler de sayılmakta, buradan görülen parazit sayısı saptanmaktadır. Çevresel kandaki lökosit sayısının 200'e bölünmesi ile elde edilen sayı, 200 lökositin sayıldığı alanlarda sayılan parazit sayısı ile çarpılarak 1 mm³'teki toplam parazit sayısı bulunmaktadır. Bu amaçla Giemza, Wright, Field ve Leishman boyaları kullanılmıştır. Wright boyası ile Schüffner tanecikleri iyi görülmemekte, en uygun boyamanın pH 7,2'de yapılan Giemsa boyası olduğuna inanılmaktadır.

Tanı, incelenen preparatta parazitlerin, gametositlerin ve/veya hemozin cisimciklerinin görülmesi ile konmaktadır. Önce kalın damla preparatının en az 5 dakika incelenmesi, parazitler saptanarak sıtma tanısının konması, sonra sağaltım açısından çok önemli olan tür tayinini yapmak için, ince yayma preparatlarının incelenmesi tavsiye edilmektedir.

3.4. İnce Yayma Kan Preparasyonu

İnce yayma kan preparasyonu parazitin tür tayinini yapmada kullanılan bir yöntemdir. Hastanın parmak ucundan lanset yardımı ile lam üzerine alınan kan 1 cm çapında yayılır. Lam sol elin baş ve işaret parmakları arasında kan damlası işaret parmağının bulunduğu tarafta olacak şekilde düz bir şekilde tutulur. Sağ elin baş ve işaret parmakları arasına alınan bir lam, kan damlasının ön kısmına işaret parmağına bakan 45°'lik bir açı yapacak şekilde temas ettirilir. Kanın, lamın iki köşesine yayılması

için kısa bir süre beklendi ve açılı korularak sol tarafa doğru sürüldü. Preperat havada kurutulur. Preperatın üzerine metil alkol döküldü ve 2-3 dakika bekletilerek tespit edildi. Mezüre 10 ml distile su konur ve bunun üzerine her 1 ml distile su için 1 damla oranına göre 10 damla ticari Giemsa boyası ilave edilir. Mezür, dairesel hareketler yapılarak hafifçe karıştırılır. Hazırlanan Giemsa boyası preperat üzerine döküldü ve 30 dakika süreyle beklendi. Lam musluk suyu ile yıkanır ve havada kurutulur. Kuruyan lam üzerine immersiyon yağı damlatılarak X100'lük objektif ile ışık mikroskopunda incelendi. İnceleme esnasında merozoid içeren eritrositler saptanarak Plasmodium vivax'a bağlı sıtma olarak değerlendirildi. İnceleme yaparken en az 200 sahaya bakıldı.

3.5. Kullanılan Araç Gereçler

1. Santrifüj (Hettich® Universal 30 RF)
2. Spektroflorometre (Shimadzu® RF-1501 MODEL, Japon)
3. Spektrofotometre (JASCO® V530 UV/VIS)
4. Derin dondurucu (New Brunswick Scientific® , C54285 model)
5. Vorteks (Nüve®, NM 110 model, Türkiye)
6. Dijital pH-metre (Hanna®, pH 211 model, Japon)
7. Hassas Terazi (Sartorius® marka 0,001 g'a duyarlı)
8. Otomatik Biyokimya Analizörü (Aeroset®, USA)
9. Işık Mikroskobu (Nikon®, Japon)
10. Kan Sayım Cihazı (Abbott® Cell-Dyn 3700, USA)
11. Lanset (İSOLAB®, Almanya)
12. Lam ve Lamel (İSOLAB®, Almanya)
13. Mekanik Homojenizatör (CAT M.Zipperer®, Almanya)
14. Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin® SH213, Almanya)

3.6.Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Sodyum Klorür (Merck®)
2. Potasyum Klorür (Merck®)
3. Kalsiyum Klorür (Sigma®)
4. Magnezyum Sülfat (Merck®)
5. Sodyum Bikarbonat (Merck®)
6. Sodyum Karbonat (Merck®)
7. Sodyum Hidroksit (Merck®)
8. Sodyum Tartarat (Merck®)
9. Bakır Sülfat (Merck®)
10. Folin Ciocalteu (Sigma®)
11. Disodyum hidrojen Fosfat (Merck®)
12. Sodyum dihidrojen Fosfat (Merck®)
13. Hidrojen Peroksit (Merck®)
14. o-dianisidine dihydrochloride (Sigma®)
15. 3-(4,5 dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H- diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) (Sigma®)
16. Potasyum Fosfat monobazik (Riedel-de Haen®)
17. Potasyum Fosfat tribazik (Merck®)
18. Nitrate Reduktase (NAD[P]H) (Sigma®)
19. Xylenol Orange (Merck®)
20. *t*-buthylhydroperoxide (Sigma®)
21. Trikloroasetikasit (TCA) (Merck®)
22. Thiobarbütürikasit (TBA) (Sigma®)
23. 1,1,3,3 tetraetoksipropan (Sigma®)

24. Brij-35 Solusyonu (Sigma®)
25. Amonyum Molibdat (Merck®)
26. Ethylenediamintetraasetik asit (EDTA) (Sigma®)
27. 5,5'-dithiobis(2-nirobenzoat) (DTNB) (Sigma®)
28. Giemsa Boyası (Merck®)
29. Histopaque-1119 (Sigma®)

3.7. Lökositlerin Elde Edilmesi

Lökositler; Histopaque-1119 yöntemiyle ayrıştırılarak elde edildi (189). Bir ml histopaque-1119 üzerine bir ml taze heparinize kan yavaşça konup 2100 rpm ve 25°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Orta tabakada biriken mononükleer lökositler pipet yardımıyla alınıp bir ml tuzlu fosfat tamponu (pH=7.4) ile karıştırıldıktan sonra 1600 rpm ve 25°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atılıp pellet tuzlu fosfat tamponu (pH=7,4) ile 10⁶ mononükleer lökosit /µl olacak şekilde dilüe edildi.

Elde edilen bu lökosit süspansiyonu -80 °C de derin dondurucuda bekletildi. Çalışma için derin dondurucudan çıkarılan hücre süspansiyonu 6 kez dondurulup çözüldü, daha sonra mekanik ve ultrasonik homojenizatörlerde homojenize edildi.

3.8. Mikroprotein Düzeyi Ölçümü

Lökositlerin homojenatlarının protein içeriği Folin ayırıcı kullanılarak Lowry yöntemiyle ölçülmüştür. Yöntemin temel prensibi, alkali ortamda bakır iyonu (Cu⁺²) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve Cu⁺¹, e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys amino asitleri Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (190).

3.9. Oksidan Parametrelerin Ölçümü

3.9.1. Myeloperoksidaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

Myeloperoksidaz enzim aktivitesi modifiye o-dianisidine yöntemiyle ölçüldü (191). Reaksiyon karışımı, 1 cm ışık yollu küvette 0,3 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 6,0), 0,3 ml 0,01 M H₂O₂, 0,5 ml 0,02 M o-dianisidine solüsyonu içerdi. Bu karışıma 10 mikrolitre lökosit homojenatı eklendi. Spektrofotometrede 460 nm' deki absorbans artışı 5 dakika süreyle kinetik modda izlendi. Elde edilen aktivite (U/L), lökosit homojenatının mg protein başına enzim aktivitesine çevrilerek spesifik enzim aktivitesi olarak değerlendirildi ve sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.9.2. NADPH Oksidaz Aktivitesinin Ölçümü

NADPH oksidaz, hidrojen alıcısı olarak rol alan 3-(4,5 dimethyl-2- thiazolyl-2,5-diphenyl-2H diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT), redüksiyonunu katalizler. NADPH oksidaz aktivitesi MTT formazonun maksimum absorbans verdiği 560 nm'de kinetik modda izlendi (192). Reaksiyon ortamı 2,3 ml 130 mmol/L potasyum fosfat tamponu pH 7,6, 0,5 ml 1 mg/ml MTT; 0,1 ml 10 mg/ml NADPH içerdi. Reaksiyon 0,1 ml lökosit homojenatının reaksiyon ortamına ilavesiyle başlatıldı. Dakikalık absorbans değişimi izlenip, sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.9.3. Lipit Hidroperoksit Düzeyi Ölçümü

Lipit hidroperoksit (LOOH) ölçümü, modifiye FOX2 Assay yöntemiyle gerçekleştirildi (193). Bu yöntemde lipid hidroperoksitler, reaksiyon ortamındaki ferröz iyonu ferrik iyonla oksitlerler. Ortamdaki ferrik iyon kromojeni xyleneol orange, ferrik iyonla renkli mega kompleks molekül oluşturur ve oluşan bu renkli molekülün absorbansı 560 nm'de end point modda ölçülür. Kalibratör olarak konsantrasyonu bilinen taze hazırlanmış *t*-butylhydroperoxide standardı kullanılır. Sonuçlar lökositler için mg protein başına olarak ifade edildi.

3.9.4. Malondialdehit Düzeyi Ölçümü

Malondialdehid (MDA) ölçüm yönteminin prensibini ilk ısıtma ile ortamdaki proteinlerin asit ortamda ısı ile denatüre edilerek MDA' nın serbest hale getirilmesi ve ikinci aşamada serbest haldeki total MDA' nın TBA ile reaksiyona sokularak oluşan renkli kompleksin absorbandsınının 532 nm' de ölçülmesi ve standart olarak hazırlanan 1,1,3,3 tetraetoksipropan çözeltisi ile kalibre edilmesi esasına dayanır (194).

3.9.5. Nitrik Oksit Düzeyi Ölçümü

Nitrik oksit (NO) ölçümü için Roche marka ticari kit kullanıldı. Yöntemde örneklerde bulunan nitrat, nitrat redüktaz enzimi aracılığı ile nitrite dönüştürüldü ve nitrit düzeyi de Griess metoduyla ölçüldü. NO, nitrat ve nitritin toplamı olarak ifade edildi (195).

3.9.6. Toplam Oksidan Status (TOS) Düzeyi Ölçümü

Örneklerin toplam oksidan status (TOS) düzeylerini ölçmek için, testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntem kullanıldı (196).

3.9.7. Caspase 3 Enzim Aktivitesi Ölçümü

Caspase 3 enzim aktivitesi Sigma marka (Catalog Number CASP3F) ticari kit kullanılarak ölçüldü. Caspase 3 fluorometric Assay kitinin çalışma prensibi caspase 3' ün Acetyl Asp-Glu-Val-Asp 7-amido-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) substratını hidroliz etmesi ve açığa çıkan 7-Amino-4 Methylcoumarin (AMC) ürünününün 360 nm eksitasyon ışığında 460 nm' deki emisyon düzeyinin ölçülmesi esasına dayanır (197). Enzimin 1,0 ünitesi, bir mikromol Ac-DEVD-AMC substratını bir dakikada yıkan enzim miktarıdır.

3.10. Antioksidan Parametrelerin Ölçümü

3.10.1. Katalaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

Güçlü bir antioksidan enzim olan katalaz, katalitik aktivitesi ile hidrojen peroksidi suya ve moleküler oksijene çevirir. Katalaz tayini için Goth tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntem kullanıldı (198).

3.10.2. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Ölçümü

Antioksidan bir enzim olan glutasyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesi ölçümü Randox marka ticari kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem Paglia ve Valentine tarafından geliştirilen reaksiyonu esas almaktadır (199). Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), kumen peroksit (ROOH) varlığında indirgenmiş glutasyonun (GSH) yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) dönüşmesini katalizler. Kümen peroksidin bulunduğu ortamda oluşan GSSG, glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH yardımıyla GSH' a indirgenir. GSH-Px aktivitesi, NADPH'ın NADP⁺ye yükselmesi sırasında absorbans farkınının 340 nm'de okunması ile ölçülür.

3.10.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Ölçümü

Lökosit Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesinin ölçümü; Lökosit homojenatlarının SOD enzim aktivitesi Randox kiti kullanılarak çalışılmış ve enzim aktivitesi U/mg protein olarak verilmiştir. Bu yöntemin prensibi ksantin oksidaz kullanarak ksantinden süperoksit radikalleri oluşturulup bu radikallerin 2-(4 iyodofenil)-3-(4 nitrofenol)-5 fenil tetrazolium klorid (INT) ile kırmızı bir formazon boyası oluşturması esasına dayanmaktadır (200). Daha sonra SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülmektedir (Randox laboratories, Ardmore, U.K.).

3.10.4. Toplam Antioksidan Status (TAS) Düzeyi Ölçümü

Örneklerin total antioksidan status düzeyi ölçüm yöntemi, örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS* katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır (201). Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox denk olarak ifade edilir.

3.10.5. Total Tiyoil Ölçümü

Örneklerin içerdiği sülfidril gruplarının toplam miktarı olarak ölçüldü. Testin prensibi, -SH grubunun Ellman reaktifi 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate) (DTNB) kullanılarak oluşan renkli ürünün absorbansının 412 nm de ölçülmesi esasına dayanır (202). Kalibratör olarak GSH kullanıldı.

3.10.6. Oksidatif Stres İndeksi Ölçümü

Örneklerin oksidatif stres indeksi (OSI), örneklerin toplam oksidan status (TOS) düzeylerinin, örneklerin toplam antioksidan status (TAS) oranına yüzdesi olarak belirtilir (203). Hesaplamadan önce TAS testinin birimindeki mmol değeri TOS testindeki gibi mikromol birimine çevrilir.

3.10.7. Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

HDL-Kolesterole bağlı lipofilik, hidrofobik yapılı antioksidan bir enzim olan paraoksonaz aktivitesi ticari Rel Assay marka kit kullanılarak ölçüldü. Yöntemde paraoksonaz enzimi paraoxon (O,O-diethyl-O-pnitrophenylphosphate), substratını hidroliz ederek renkli *p*-nitrophenol ürününün oluşmasına yol açar. Oluşan ürünün absorbansı 412 nm de kinetik modda izlenerek enzim aktivitesi U/L olarak ifade edilir (204). Bu enzim lökosit homojenatlarında bulunmaz, plazma örneklerinde ölçülür.

3.10.8. Arilesteraz Aktivitesi Ölçümü

Antioksidan bir enzim olan paraoksonaz enziminin arilesteraz aktivitesi de ticari Rel Assay marka kit kullanılarak ölçüldü. Bu test, örneğin içerdiği enzim tarafından fenilasetat substratından enzimatik aktiviteyle açığa çıkarılan fenolün, kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (205). Sonuçlar enzim aktivitesi çok yüksek düzeylerde olduğu için kU/L olarak ifade edilir.

3.11. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS Versiyon 11.0 (SPSS Inc. Chicago USA) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Grupların ortalamaları arasındaki farkın önemi Student's *t* testi ile karşılaştırılmıştır. Parametreler arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile araştırılmıştır.

4. BULGULAR

Demografik ve karakteristik bilgiler Tablo 2’de verilmektedir. Tablo 2’de hasta ve kontrol gruplarında yaş, ağırlık, cinsiyet ve BMI değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmektedir.

Tablo 2. Hasta ve Kontrol gruplarının Demografik ve Karakteristik bilgilerinin Karşılaştırılması

	<i>Kontrol (n=18)</i> <i>Ortalama ± S.D.</i>	<i>Hasta (n=18)</i> <i>Ortalama ± S.D.</i>	<i>P</i>
Cinsiyet (E/K)	9/9	9/9	> 0,05
Yaş (Yıl)	28.94 ± 6.15	27.11 ± 7.13	> 0,05
Ağırlık (Kg)	65,3 ± 9,18	63,5 ± 8,51	> 0,05
Uzunluk (cm)	165 ± 14	163 ± 15	> 0,05
BMI (kg/m ²)	22,5 ± 6,5	23,8 ± 5,4	> 0,05

Tablo 3 Sıtma hastalarının ve kontrol grubunun lökosit sayıları ve lökositlerin oksidan - antioksidan parametrelerini göstermektedir. Tabloda da görüldüğü gibi sıtma hastalarında lökosit sayısı düşük bulundu. Hastaların lökositlerinin oksidan parametreleri olan myeloperoksidaz ve NADPH oksidaz enzim aktivitelerinde, TOS, MDA, LOOH ve NO düzeylerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde yükseklik saptandı. Antioksidan enzimler olan GSHPx , SOD ve katalaz aktiviteleri de yüksekti. Bu yüksekliklerde SOD ve GSHPx değerleri istatistiksel olarak anlamlı iken, katalazın

yüksekliğinin istatistiksel anlamı yoktu. Buna karşın hastaların antioksidan parametreleri olan TAS ile toplam tiol düzeyleri düşük bulundu. Toplam tiyol düşüklüğünün istatistiksel olarak anlamı vardı. Toplam oksidan statusun, toplam antioksidan statusa oranının yüzde ifadesi olarak hesaplanan oksidatif stres indeksi (OSI) sıtma hastalarının lökositlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksekti. Hastaların lökosit caspase 3 aktiviteleri de kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti. Sıtma hastalarının lökosit sayıları ile plazma MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde negatif korelasyon saptandı ($r = -0,70$, $p < 0,001$). Lökosit sayıları ile caspase 3 aktiviteleri arasında negatif korelasyon vardı fakat istatistiksel olarak önemsizdi.

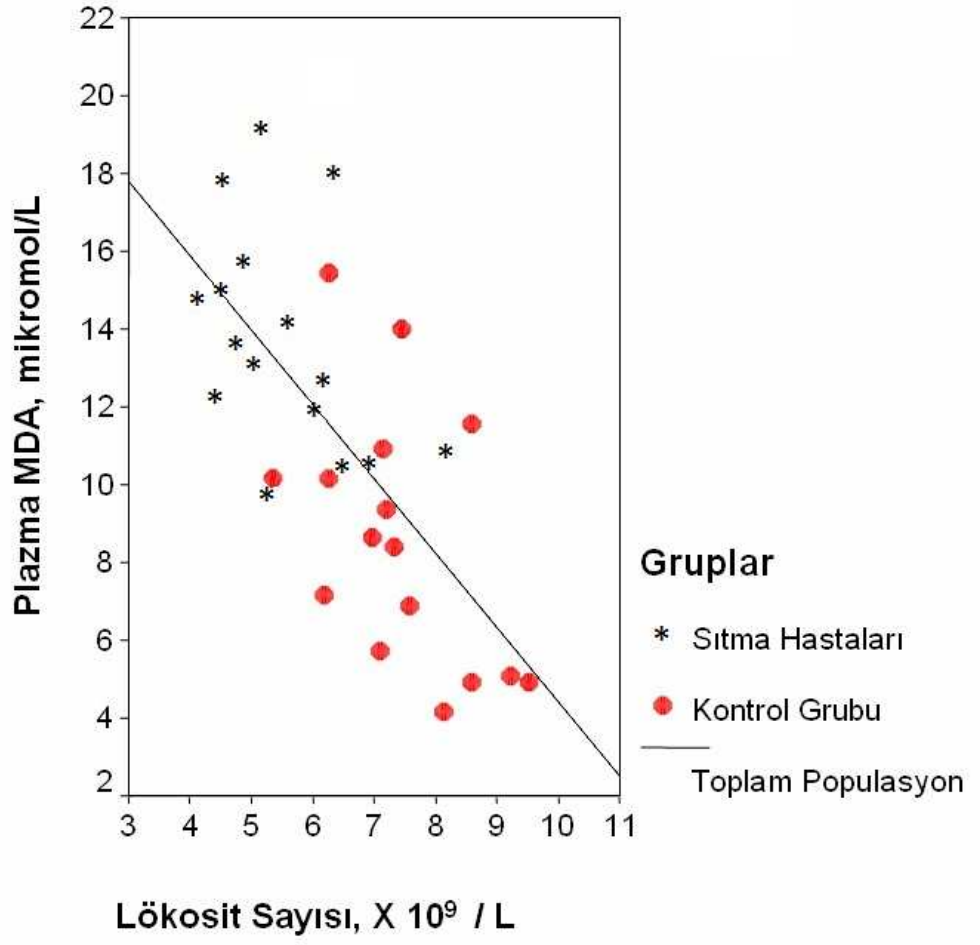
Tablo 3. Sıtma hastaları ve kontrol grubunun lökosit sayıları ve lökositlerin oksidan - antioksidan parametreleri.

Testler	Hasta Grubu (n=18) Ortalama ± S.D.	Kontrol Grubu (n=18) Ortalama ± S.D.	P
Lökosit Sayısı X 10 ⁹ Hücre / L	5,48 ± 1,27	7,78 ± 2,04	0,01
Myeloperoksidaz, U/mg protein	1,03 ± 0,53	0,45 ± 0,37	0,001
NADPH oksidaz, U/mg protein	0,729 ± 0,413	0,332 ± 0,174	0,03
TOS, nM H ₂ O ₂ denk /mg protein	18,03 ± 6,25	13,07 ± 2,64	0,007
LOOH, nM <i>t</i> -BHP denk/mg protein	13,99 ± 4,38	10,84 ± 2,33	0,01
MDA, nM / mg protein	13,95 ± 6,67	5,88 ± 3,34	<0,001
NO, nM / mg protein	26,22 ± 15,9	13,19 ± 4,73	0,004
Caspase 3, mU/ mg protein	1,12 ± 0,37	0,86 ± 0,18	0,03
SOD, U/mg protein	0,863 ± 0,211	0,427 ± 0,154	<0,001
GSHPx, U/mg protein	1,42 ± 0,44	1,15 ± 0,21	0,03
Katalaz, mU/mg protein	10,73 ± 6,96	10,49 ± 4,88	0,91
Tiyol, µM/ mg protein	0,266 ± 0,051	0,353 ± 0,117	0,01
TAS, µM Trolox denk/mg protein	2,31 ± 1,45	2,34 ± 1,19	0,64
OSI, Arbitrary Unit	0,78 ± 0,41	0,54 ± 0,26	0,04

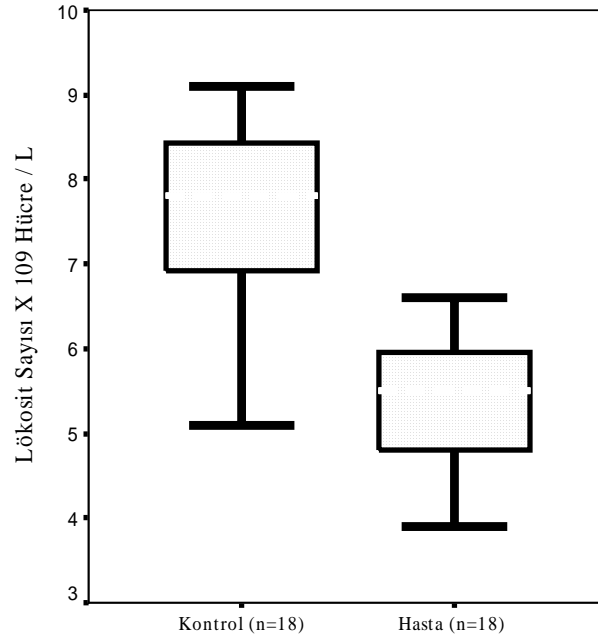
Sıtma hastalarının plazmalarının oksidatif parametreleri olan, TOS, MDA, LOOH, NO ve OSI düzeyleri yüksek, antioksidan parametreler olan paraoksonaz, arilesteraz enzim aktiviteleri ve TAS, toplam tiyol düzeyleri de düşük bulundu (Tablo 4).

Tablo 4. Sıtma hastaları ve Kontrol grubunun plazmalarının oksidan - antioksidan parametreleri.

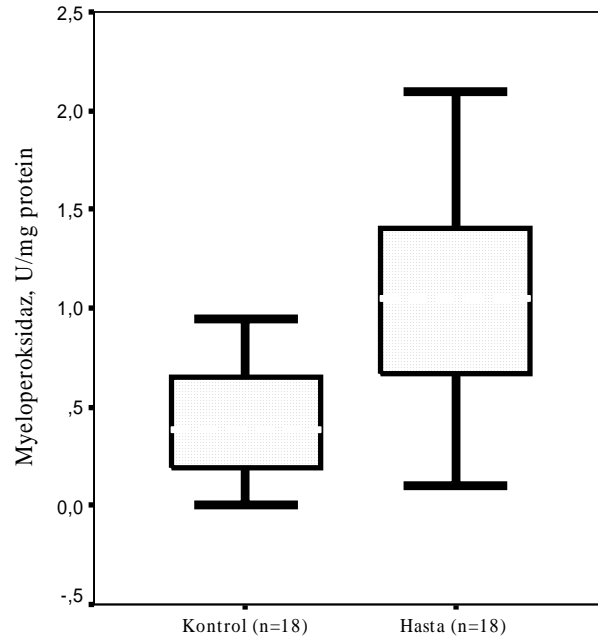
Testler	Hasta Grubu (n=18)	Kontrol Gubu (n=18)	P
	Ortalama ± S.D.	Ortalama ± S.D.	
Arilesteraz, kU/L	88,3 ± 11,8	146,2 ± 34,3	<0,001
Paraoksonaz, U/L	101,5 ± 55,9	170,4 ± 79,2	0,008
TAS, mmol Trolox denk/L	0,87 ± 0,18	1,09 ± 0,25	0,01
Tiyol, mM/ L	0,246 ± 0,016	0,293 ± 0,019	<0,001
MDA, µM / L	6,11 ± 1,87	4,54 ± 1,50	<0,01
LOOH, µM t-BHP denk/L	5,98 ± 1,15	5,93 ± 1,77	0,91
TOS, µM H ₂ O ₂ denk/L	10,46 ± 3,64	9,61 ± 2,67	0,57
NO, µM / L	27,11 ± 10,74	20,19 ± 5,14	0,02
OSI, Arbitrary Unit	1,21 ± 0,38	0,88 ± 0,24	0,04



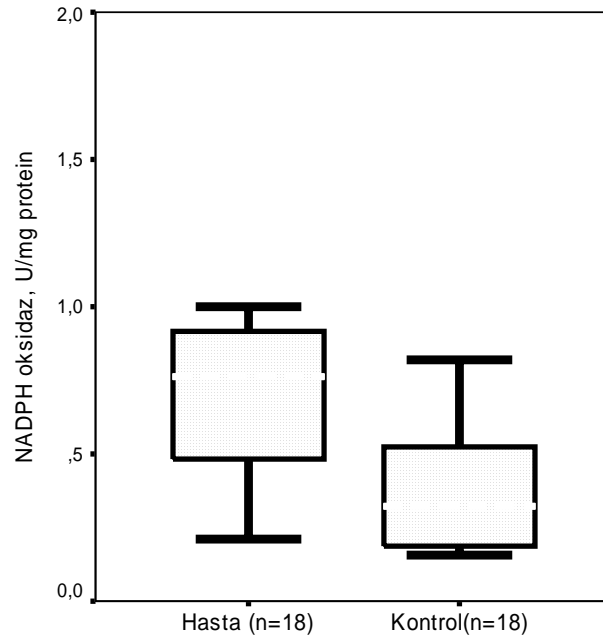
Şekil 3. Lökosit sayıları ile plazma malondialdehit düzeyleri arasındaki ilişki ($r = -0,70$ $p < 0,001$).



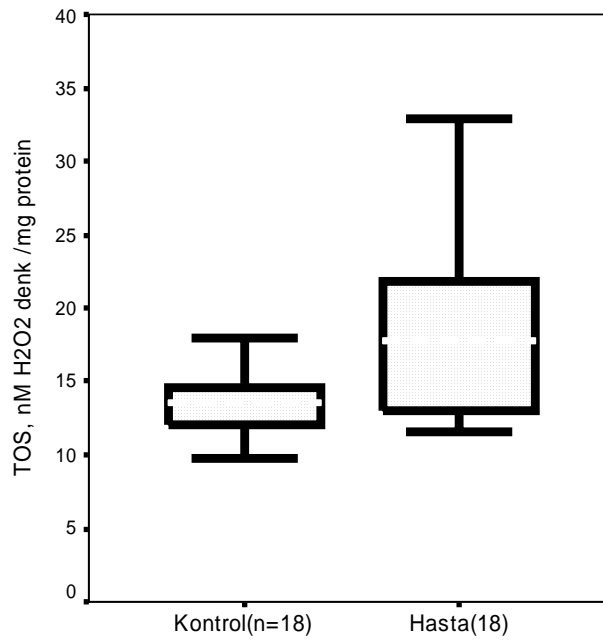
Şekil 4. Hasta ve kontrol gruplarının Lökosit sayıları arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



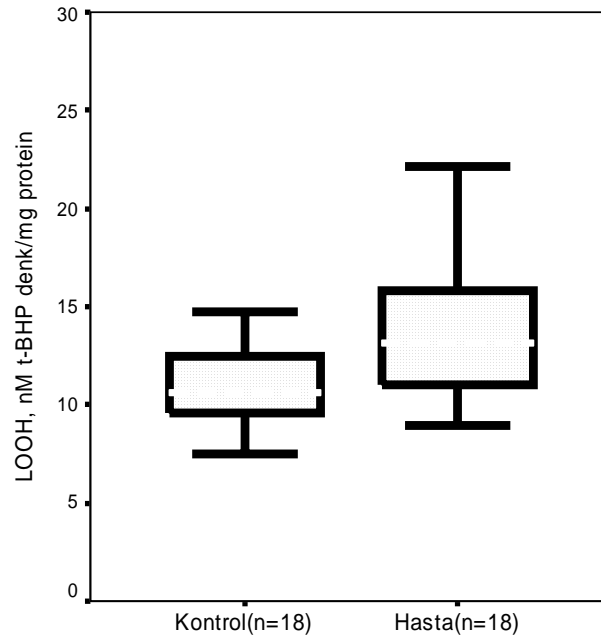
Şekil 5. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Myeloperoksidaz enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



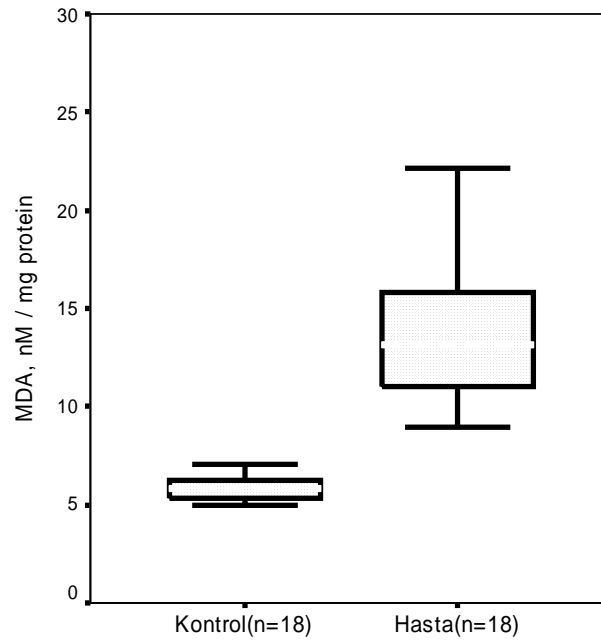
Şekil 6. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde NADPH oksidaz enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



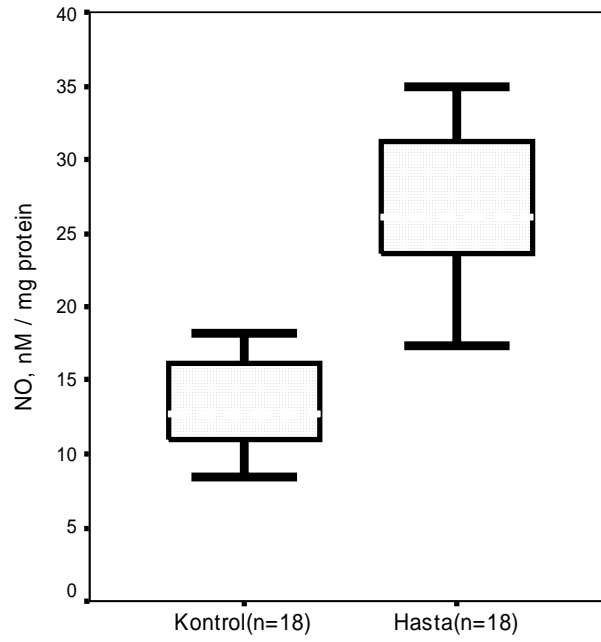
Şekil 7. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Total Oksidatif Stres kapasitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



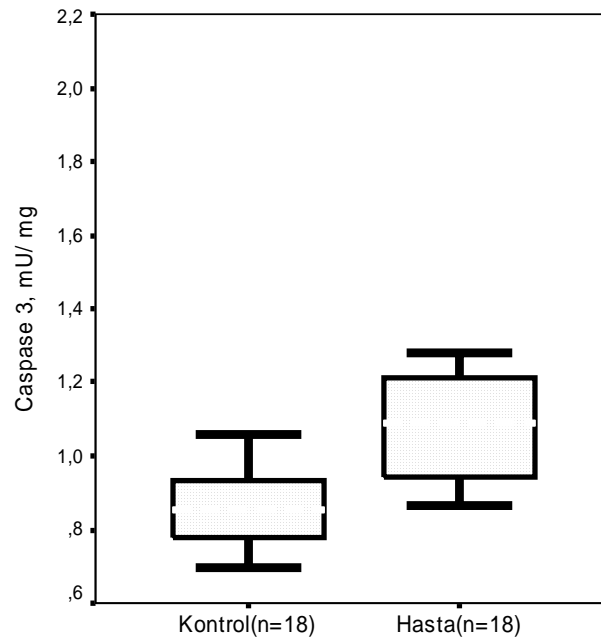
Şekil 8. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Lipit Hidroperoksit düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



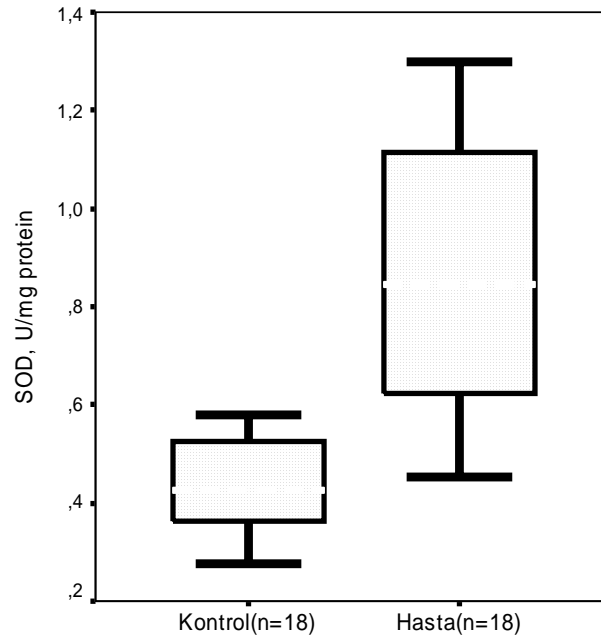
Şekil 9. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Malondialdehit düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



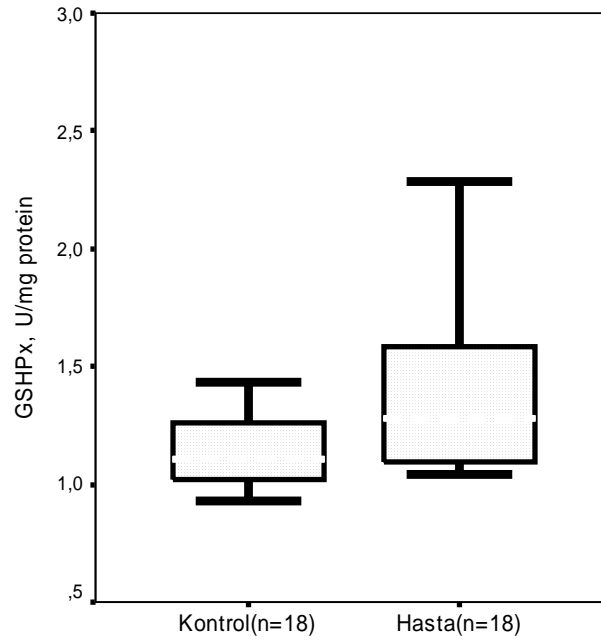
Şekil 10. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Nitrik Oksit düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



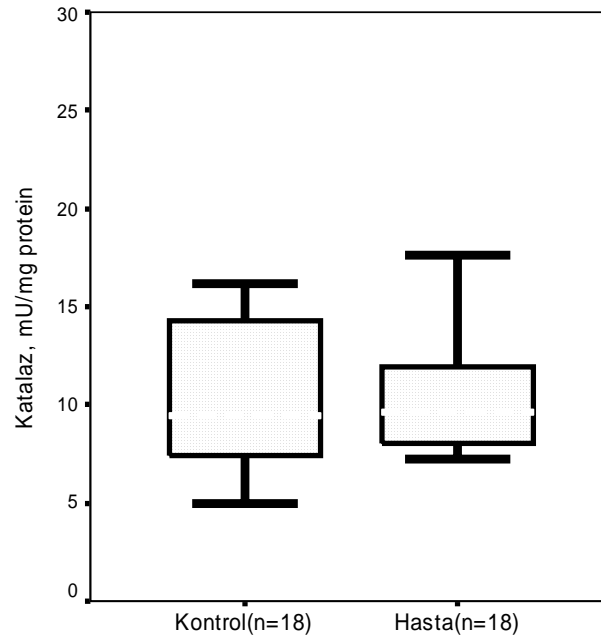
Şekil 11. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Caspase 3 enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



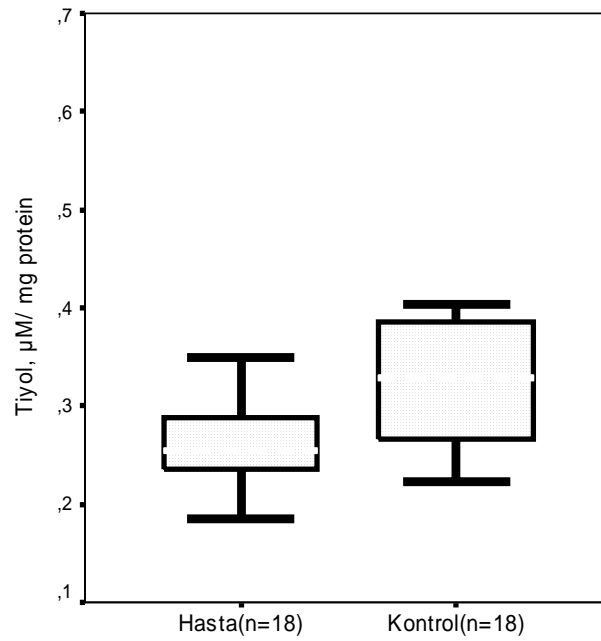
Şekil 12. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Süperoksit Dismutaz enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



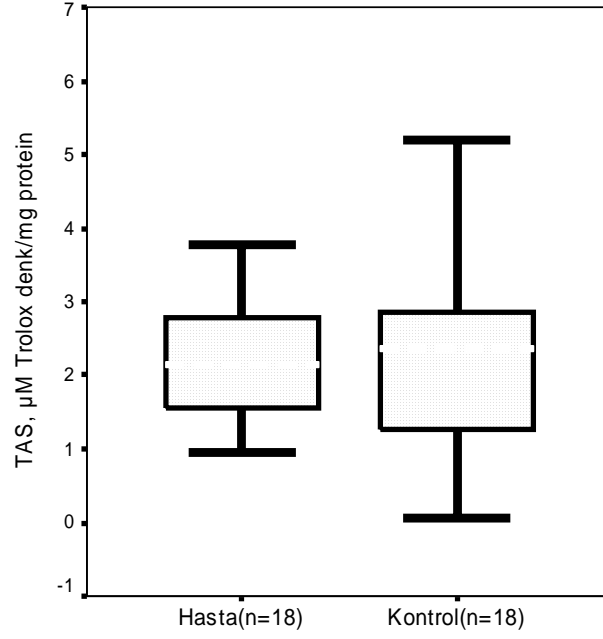
Şekil 13. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Glutasyon Peroksidaz enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



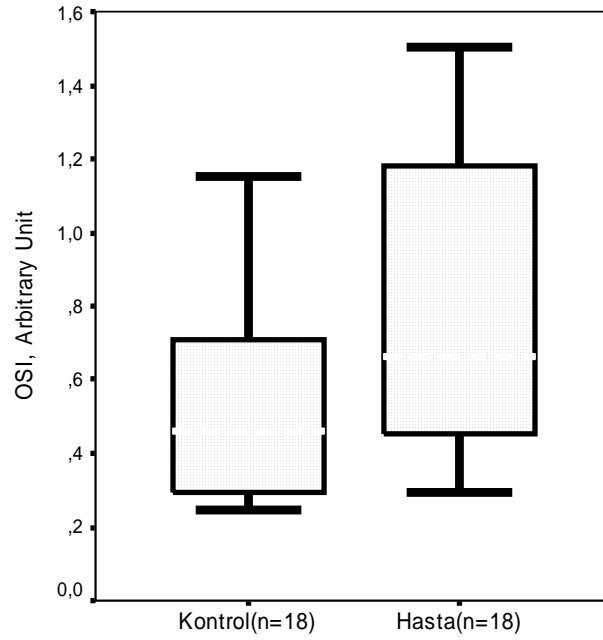
Şekil 14. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Katalaz enzim aktivitesi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



Şekil 15. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Tiyol düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



Şekil 16. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Total Antioksidan düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



Şekil 17. Hasta ve kontrol gruplarının lökositlerinde Oksidatif Stres İndeksi düzeyi arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

5. TARTIŞMA ve SONUC

Sıtma çok eski tarihlerden beri bilinen bulaşıcı bir hastalıktır. Gelişmekte olan ülkelerde yılda 200 milyon morbiditeye ve 1,5-3 milyon mortaliteye yol açmaktadır (206). Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) nin faaliyete geçmesiyle birlikte bölgemizde sıtma olgularının görülme riskide gün geçtikçe artmaktadır. Ülkemizde en sık görülen sıtma tipi vivaks malarya çeşidi olup, bu tip malaryada kültür sistemlerinin yetersizliği nedeniyle yapılan çalışma sayıları da azdır (207).

Sıtma hastalarında lökosit sayısı düşmektedir. Dale ve arkadaşları yaptığı araştırmada vivaks malarya hastalarında lökosit sayısını $3,0 \pm 1,7$, Kassa ve arkadaşları $5,5 \pm 2,0$, Taylor ve arkadaşları, $6,5 \pm 2,1$, McKenzie ve arkadaşları $6,2 \pm 2,0 \times 10^9$ hücre / L olarak bulmuşlardır (208,209,210,211). Mert ve arkadaşları 48 vakadan 16'sının lökosit sayısını $4,0 \times 10^9$ hücre/L nin altında bulmuşlardır (211). Bizim çalışmamızda vivax malaryalı hastalarda lökosit sayıları $5,48 \pm 1,27$ Lökosit sayısı $\times 10^9$ hücre/L olarak saptanmıştır. Sıtmada lökopeninin nedeni ve mekanizması henüz yeterince aydınlatılabilmemiş değildir (212). Lökopeninin oksidatif stresle ilişkisi bilgilerimize göre şimdiye kadar hiç rapor edilmemiştir. Çalışmalarımızda sıtma hastalarında lökosit sayısını istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük, oksidatif stres indeksini yüksek bulduk. Lökosit sayıları ile plazmanın oksidatif stresinin bir markeri olan lipid peroksidasyonunun son ürünü malondialdehit düzeyi arasında istatistiksel olarak çok anlamlı negatif korelasyon saptadık. Şekil 3'de açıkça görüldüğü gibi plazmanın oksidatif stres düzeyi yükseldikçe, lökosit sayısı düşmektedir.

Sıtma hastalığında lökositlerin değişik biçimlerde etkilendiği belirtilmekte olup, bunlar arasında; nötropeni, immatür nötrofiller (sola kayma), nötrofil toksik

granülasyonu, lenfopeni, lenfositosis, atipik lenfositosis, monositosis, eosinopeni gibi durumların geliştiği, lökositlerin kan dolaşımından çevreye özellikle de enflamasyon bölgelerine ve dalağa yerleştikleri bildirilmiştir (212). Lökopeninin etyopatogenezinde çeşitli etmenler sıralanmış fakat oksidatif stresin rolü hep atlanılmıştır. Çalışmamızda sıtmada lökositlerin oksidatif parametrelerinin düzeylerinin yükseldiğini ve oksidatif stresle lökosit sayıları arasında önemli ilişkinin olduğunu malaryada gözlemlenen lökopeninin patogenezinde oksidatif stresin de rolünün olabileceğini ileri sürmekteyiz.

Malaryada konakçının immün savunma sisteminde, hem hücresel hem de humoral mekanizmalar rol almaktadır (7,8). Malaryada fagositik hücrelerdeki, oksidatif yanma reaksiyon hızı çok artmaktadır. Konakçının malaryaya karşı ortaya koyduğu önemli savunma mekanizmalarından birisi olarak reaktif oksijen türlerinin üretimi artırılmaktadır. Biz de çalışmamızda lökositlerde, bu oksidan ve fagositik rolü olan enzimlerin aktivitelerini yüksek bulduk. Fagositik hücrelerde en önemli iki fagositik enzim, myeloperoksidaz ve NADPH oksidaz enzimleridirler. NADPH oksidaz enzimi, pentoz fosfat yoluyla üretilen NADPH'ı oksitleyip, güçlü bir oksidan molekül olan hidrojen peroksit üretir. Bu oksidan molekül hem çevredeki molekülleri oksitler hem de çok güçlü oksidan bir molekül olan hipoklorit molekülüne myeloperoksidaz enzimi tarafından çevrilir. Çalışmamızda, sıtma hastalarının lökositlerinde hem myeloperoksidaz hem de NADPH oksidaz enzim aktivitelerini çok yüksek bulduk. Bu bulgu bilgilerimize göre literatürdeki ilk rapordur ve yine sıtmalı hasta lökositlerinde artmış olan şiddetli oksidatif stresi göstermektedir.

Sıtmada açığa çıkarılan bu oksidanların toplam düzeyini TOS testi aracılığı ile ölçtük. Bu testte, çeşitli oksidan moleküllerin oksidatif etkileri kümülatif olarak ölçülmektedir. Oksidan moleküller yeterli düzeyde ortamdan uzaklaştırılmadığı takdirde, çevredeki molekülleri oksitlerler. Bu moleküllerden en hassas olanı lipitlerdir. Lipitler oksidasyona karşı çok duyarlıdır. Oksitlenen lipitler, oksidasyonun orta basamaklarında lipid hidroperoksit türevlerine çevrilirler. Eğer oksidasyon ortamdan kaldırılamayıp etkisi uzun sürerse, bu lipid hidroperoksitler de lipitlerin oksidatif reaksiyonlarının son aşaması ve yıkım ürünü olan malondialdehid dönüşürler. Biz de çalışmamızda, lökositlerin lipitlerinin hidroperoksit ve malondialdehit düzeylerini çok yüksek düzeyde bulduk. Nitrik oksit malaryanın immünokimyasal mekanizmalardaki rolü bilinmektedir (213). Çalışmamızda sıtmada lökositlerde ve plazmada nitrik oksit

düzeyleri yüksek bulunmuştur. Sıtmalı hastaların lökositlerinde oldukça yükselmiş bulunduğumuz oksidatif harabiyet bu hücrelerin yapıtaşlarını oluşturan biyomoleküllerde olduğu gibi hücrelerin harap olup sayıca da oldukça azaldığını göstermektedir.

Hidrojen peroksite ve Caspase 3 enziminin apoptozisi hızlandırdığı bilinmektedir (214). Yapılan çalışmalarda, sıtmada hapatik hücrelerin ve serebral malaryada da bazı nöronal hücrelerin apoptozise gittiği rapor edilmektedir (215,216). Bizim çalışmamızda kullandığımız TOS testi, hidrojen peroksiti de kümülatif kapsamında ölçmektedir. Malarya hastalarında saptadığımız TOS düzeyinin ve caspase 3 aktivitesinin yüksekliğinden dolayı lökositlerin apoptozise gidişlerinin artmış olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda caspase 3 aktivitesi ile lökosit sayıları arasında negatif korelasyona meyil saptanmıştır. Sıtma hastalarındaki lökositopeninin etyopatogenezinde apoptozisin de rolünün olabilir, bu durumun somut olarak ortaya konulabilmesi ileri çalışmalara gereksinim vardır. Ancak bu öncül çalışma ile şunu ifade edebiliriz ki; sıtmalı hastalarda lökosit sayısının azalmasında bu hücrelerin sadece oksidatif hasarla hasarlanmaları değil aynı zamanda hücrede apoptozisinde artarak daha kısa sürede ölmelerine neden olabilmektedir.

Organizma, gelişen oksidatif hasara karşı kendini koruyabilecek antioksidan mekanizmaya da sahiptir (217). Bu antioksidan sistem kabaca enzimatik ve non enzimatik olarak sınıflandırılabilir. Enzimatik antioksidan parametrelerden en önemlileri, SOD, GSHPx ve katalaz enzimleridir (218). SOD enzimi süperoksit molekülünü hidrojen peroksit molekülüne çevirir. SOD ve GSHPx ortamdaki hidrojen peroksidi uzaklaştırırlar. Düşük düzeylerde hidrojen peroksit varlığında GSHPx öncelikli olarak iş görür. Bu enzimin Km düzeyi katalazinkine göre daha düşük, hidrojen perokside afinitesi daha yüksektir. GSHPx hidrojen peroksidi ortamdaki glutasyonu oksitleyerek uzaklaştırır. Katalaz ise, ortamdaki hidrojen peroksidi suya ve moleküler oksijene çevirir. Sıtma hastalarında GSHPx enzim aktivitesinde belirgin yükseklik ve katalaz enzim aktivitesinde yükselmeye meyil saptanmıştır.

Enzimatik olmayan parametreler antioksidan vitaminler, tiyoller ve daha küçük oranlarda yer alan redüktant maddelerdir. Bu molekülleri ayrı ayrı ölçmek, çok uzun zaman, yoğun emek ve profesyonel ekipmanlar gerektirir. Ayrıca çok masraflıdır. Oysa bunların etkisi toplamsaldır. Bu etki TAS testi ile tek bir test kullanılarak ölçülebilir

(201). Sıtma hastalarında TAS düzeyini lökositlerde düşmeye meyilli ve plazmada çok belirgin olarak düşük düzeyde saptadık. TAS düzeyinin TOS düzeyine yüzde oranı olarak ifade edilen OSI sıtma hastalarında yüksekti.

Toplam tiyol düzeyini, çok az bir miktarı serbest glutatyondan gelmekle birlikte esas olarak başta albümin olmak üzere proteinlerde bağlı sülfidril gruplarından oluşmaktadır. Bu gruplar oksidasyona karşı çok hassas olup, oksidatif stresle disülfide dönüşmektedirler (219). Biz de çalışmamızda sıtma hastalarında gerek lökositlerde gerekse plazmada toplam tiyol düzeyini istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşük bulduk.

Paraoksonaz enzimi plazmanın antioksidan enzimlerindedir. Bu enzim kısaca PON1 olarak ifade edilir. Karaciğerden sentezlenip, HDL kolesterole bağlı olarak sistemik dolaşıma verilir. LDL kolesteoldeki lipid hidroperoksitleri hidroliz ederek yağların ileri oksidasyonunu önler, dolayısıyla atheroskleroza karşı da önemli rol oynar (220). Bu enzimin aktivitesini ölçerken paraokson substratı kullanılırsa aktivite paraoksonaz aktivitesi olarak, substrat olarak fenilasetat kullanılırsa arilesteraz aktivitesi olarak ifade edilir. Arilesteraz aktivitesi paraoksonaz aktivitesinden yaklaşık 100 kat hızlıdır. Sıtma hastalarında diğer antioksidanlar gibi paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivitelerini de çok düşük bulduk. Bu bulgu bilgilerimize göre ilk ve tek rapordur.

Sıtma hastalarında görülen lökopeninin nedenini araştırmaya yönelik yaptığımız bu çalışmada sıtmalı hastaların lökositlerinde oksidanlar artarken antioksidan cevap yetersiz kalmakta, şiddetli oksidatif stres gelişmekte ve oksidatif stres indeksi lökopeniyle negatif ilişki gösterdiğini tespit ettik. Bu sonuçlara göre oksidatif stresin sıtmada gözlemlenen lökopenin etyopatogenezinde rolü olabileceği düşünülebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Reiter P. Global warming and malaria: knowing the horse before hitching the cart. *Malar J.* 2008; 11;7 Suppl 1:S3. 1-9.
2. Mills A, Lubell Y, Hanson K. Malaria eradication: the economic, financial and institutional challenge. *Malar J.* 2008; 11;7 Suppl 1:S11.doi:10.1186/1475-2875-7-S1-S11.
3. Suh K.N., Kain K.C., Keystone J.S. Malaria. *Canadian Medical Association Journal.* 2004;170(11):1693-1702.
4. Suh KN, Keystone JS. Malaria and babesiosis. In: Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR, eds. *Infectious Diseases.* Philadelphia: Lippincott Williams, 2004; 2290-308.
5. DSÖ. <http://www.un.org.tr/who/bulten/turk/bul5gap.htm>.
6. Akdur R. Sıtmanın epidemiyolojisi. *T Parazitoloji Derneği Yayını No: 16.* İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1999; 51-74.
7. Beeson JG, Osier FH, Engwerda CR. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria *Trends in Parasitology* 2008; Vol.24 No.12. 576-583.
8. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends Parasitol*, 2009;doi:10.1016/j.pt..02.003.
9. Dey S, Guha M, Alam A, Goyal M, Bindu S, Pal C, Maity P, Mitra K, Bandyopadhyay U. Malarial infection develops mitochondrial pathology and mitochondrial oxidative stress to promote hepatocyte apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2009; 15;46(2):271-81.

10. Araujo CF, Lacerda MV, Abdalla DS, Lima ES. The role of platelet and plasma markers of antioxidant status and oxidative stress in thrombocytopenia among patients with vivax malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2008; 103(6):517-21.
11. Erel O, Vural H, Aksoy N, Aslan G, Ulukanligil M. Oxidative stress of platelets and thrombocytopenia in patients with vivax malaria. *Clin Biochemistry* 2001; 34(4):341-4.
12. Erel O, Kocyigit A, Avcı S, Aktepe N, Bulut V, Oxidative stress and antioxidative status of plasma and erythrocytes in patients with vivax malaria. *Clin Biochemistry* 1997; Dec;30(8):631-9.
13. Mckenzie FE, , Prudhomme WA, Magill AJ, Forney JR, Permpnich B, Lucas C, Gasser RA Jr, Wongsrichanalai C. White blood cell counts and malaria. *J. Infect Dis*, 2005; 15;192(2):323-30.
14. Unat. E K, Yücel A, Altas K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları, Yayın No: 15. Beşinci Baskı, 1995; 623-660.
15. Brown W H. Basic Clinical Parasitology. Fo-urth Edition. Appleton Century Crofts, New York, 1975; 75-87.
16. Özcel M A. Sıtma. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:16, 1999; 1-190.
17. Lynne S. Garcia, David A. Bruckner. Diagnostic Medical Parasitology. Third Edition. ASM Pres, Washington, 1997.
18. Blanc F., Blanc F.-P., Blanc-B. Geschichte der Tropfenmedizin. Band 5, Vaduz 1992; 2539-2579.
19. Özcel M.A. Sıtma. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 16, İzmir, 1999.
20. Fleischer B. Editorial: 100 years ago: Giemsa's solution for staining of Plasmodia. *Tropical Medicine and International Health*. 2004; 9:755-756.
21. Aktuglu Y. Sıtma; İç Hastalıkları Ders Notları. 3. basım, 2. cilt, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 1992; 124-135

22. Özcel M. GAP ve Parazit Hastalıkları, Sıtma. 1. baskı, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayım, 1993: 29-52.
23. Onul B. İnfeksiyon Hastalıkları, Sıtma. 4.baskı, 1971; 803-825.
24. Sağlam T. İç Hastalıkları Ders Kitabı, Sıtma. 3. baskı 1. cilt, Cumhuriyet Matbaası 1953; 308-323.
25. Wilke TA, Söyletir G, Doganay M. İnfeksiyon Hastalıkları, Sıtma. 1. baskı, Nobel, 1996; 511-525.
26. Merdivenci A. Türkiye Sivrisinekleri. 1. baskı Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul,1984.
27. Özcel M. GAP ve Parazit Hastalıkları, Sıtma. 1. baskı, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayım, 1993; 29-52.
28. Merdivenci A. Türkiye Sivrisinekleri. 1. baskı Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul,1984.
29. Armstrong D, Cohen J. Infectious Diseases, Malaria. First ed. Springfield Illinois: Mosby Publisher, 1999;1-26
30. Cotran R, Kumar V, Robbins SL. Pathologic Basis of Disease, Malaria. 5th ed. Saunders, 1994; 362-363.
31. Unat EK. Tıp Parazitolojisi, Sıtma. 2.baskı Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul 1984; 569-610.
32. Haslett C, Chilvers ER, Hunter JAA, Boon NA. Davidson's Principles and Practice of Medicine, Malaria. Eighteenth ed. Churchill Livingstone, 1999; 148-153.
33. Humes HD. Keliey's Textbook of Internal Medicine, Malaria. Fourth ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2000; 2210-2215.
34. Mandeli GL, Bennett JE, Dolin Rprinciples and Practice of Infectious Diseases, Plasmodium Species (Malaria). Fifth ed. Churchill Livingstone 2000; 28172831.

35. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji. 2. Baskı. Es-Form Ofset Ltd. Şti., Sivas, 2002.
36. Akdur R. Sıtma Eğitim Notları. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, Cem Ofset Ltd. Şti. Ankara, 1997.
37. Markel E.K., John D.T., Krotoski W.A. Markel and Voge's Medical Parasitology. Eight Edition. W.B. Saunders Company, 1999.
38. Goldman L, Bennett JC. Cecil Text book of Medicine, Malaria. 21st ed. 2000; 1947-1951.
39. Schlossberg D. Current Therapy of Infectious Disease, Malaria. Second ed. Mosby, 2001; 676-680.
40. Ledingham JGG, Warrel DA. Concise Oxford Textbook of Medicine, Malaria. First ed. Oxford, 2000; 1735-1750
41. Hanscheid T. Diagnosis of malaria; a review of alternatives to conventional microscopy. Clinical and Laboratory Haematology. 1999; 21: 235-245.
42. Lee S.H., Kara U.A.K., Koay E., Lee M.A., Lam S., Teo D. New strategies for the diagnosis and screening of malaria. International Journal of Hematology. 2002; 76(1): 291-293.
43. Moody A.H., Chiodini P.L.: Methods for the detection of blood parasites. Clinical and Laboratory Haematology. 2000, 22:189-201.
44. Craig M.H., Sharp B.L. Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections. Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1997; 91:279-282.
45. Kawamoto F. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter. Lancet. 1991; 337(8735):200-202.
46. Çeber K., Alahverdiyev A., İbrahimov H. *Plasmodium*'ların hızlı tanısında modifiye Quantitative Buffy Coat (QBC) yönteminin araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi. 2001; 25: 330-341.
47. Lema O.E., Carter J.Y., Nagelkerke N., Wangai M.W., Kitenge P., Gikunda S.M., Arube P.A., Munafu C.G., Materu S.F., Adhiambo C.A., Mukunza H.K.

Comparison of five methods of malaria detection in the outpatient setting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 60(2):177-182.

48. Palmer C.J., Lindo J.F., Klaskala W.I., Quesada J.A., Kaminsky R., Baum M.K., Ager A.L. Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998; 36(1):203-206.

49. Araz E., Tanyuksel M., Ardic N., Tabuk C. Performance of a commercial immunochromatographic test for the diagnosis of vivax malaria in Turkey. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000; 94: 55-56.

50. Tjitra E., Suprianto S., Dyer M., Currie B.J., Anstey N.M. Field evaluation of the ICT malaria P.f/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in eastern Indonesia. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37(8): 2412-2417.

51. Erişim: <http://www.users.iafrica.com/m/ma/makromed/id56.htm>

52. Richardson D.C., Ciach M., Zhong K.J., Crandall I., Kain K.C. Evaluation of the Makromed dipstick assay versus PCR for diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in returned travelers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(12):4528-4530.

53. Cropley I.M., Lockwood D.N., Mack D., Pasvol G., Davidson R.N. Rapid diagnosis of *Falciparum* malaria by using the ParaSight F test in travellers returning to the United Kingdom: prospective study. *BMJ*. 2000; 321(7259):484-485.

54. Humar A., Ohrt C., Harrington M.A., Pillai D., Kain K.C. Parasight F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1997; 56(1):44-48.

55. Rubio J.M., Buhigas I., Subirats M., Baquero M., Puente S., Benito A. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria

enhances the need for PCR-based reference laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(7):2736-2737.

56. Xainli J., Baisor M., Kastens W., Bockarie M., Adams J.H., King C.L. Age-dependent cellular immune responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in humans. *Journal of Immunology*. 2002;169(6):3200-3207.

57. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology*. 1997; 27(10):1135-1145.

58. Snounou G., Viriyakosol S., Jarra W., Thaithong S., Brown K.N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1993; 58(2):283-292.

59. Tierney LMJ, McPhee SJ, Papodakis MA. *Current Medical Diagnosis and Treatment, Malaria*. Fifth ed. Appleton and Lange, Copyright 2001: 1433-1444.

60. Miller, J.H., Warell, D.A.: Prophylaxis Against Malaria. *BMJ.*, 1995; 310: 401-402.

61. Kavas GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri, *Türkiye Klin. Dergisi*, 1989; 9, 1, 1-8.

62. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working?, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1995;35, 21-29.

63. Karafakoğlu YS. Tütün çalışanlarında oksidan - antioksidan durum. *The Medical Journal of Kocatepe*. 2004; 5: 7-10.

64. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 1982;4: 412-426.

65. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.* 1991; 161: 488-503.

- 66.** Aslan R, Şekeroğlu MR, Bayıroğlu F, Gültekin F. Blood lipoperoxidation and antioxidant enzymes in healthy individuals: relation to age, sex, exercise, air pollution and life habits. *J. Environ. Sci. Health*, 1997; 32: 2101-2109.
- 67.** Bagasa HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem et Biophysica Acta*, 1990; 1047: 255-263.
- 68.** Hinder RA, Stein HJ. Oxygen-derived free radicals. *Arch. Surg.* 1991; 126: 104-108.
- 69.** Kargın F, Fidancı U R. Serbest oksijen radikalleri ve oksidatif hasar. *Türk Vet. Hek. Derg.* 1997; 9: (2) 26-28.
- 70.** Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya., 1995
- 71.** Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry, *Br. Med. Bull.* 1993; 49, 3, 481-493.
- 72.** Halliwell B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc. Nutr. Soc. Feb.*, 1987; 46(1):13-26.
- 73.** Fortone JC, Word PA. Role of Oxygen-derived free radicals and metabolites in leucocyte dependent inflammatory reaction, *Am. J. Pathol.*, 1982; 107, 3, 397-413.
- 74.** Kalyanamaran B, Perez E, Mason R P. Spin trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anti-cancer drugs. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1980; 630: 119-120.
- 75.** Slater T F. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.*, 1984; 222: 1-15.
- 76.** Janoff A, Pryor WA, Bengali ZH. Effect of tobacco smoke components on cellular and biochemical process in the lung. *Am. Rev. Respir. Dis*, 1987.; 136(4): 1058-64.
- 77.** Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am. Rev. Respir. Dis*, 1989.; 140: 531-554.
- 78.** . Rahman I, Macnee W. Oxidant / antioxidant imbalance in smokers and chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 1996; 51: 348-350.

- 79.** Norton ID, Apte MY, Lux O, Haber PS. Chronic ethanol administration causes oxidative stress in the rat pancreas. *J. Lab. Clin. Med.*, 1998; 131: 442-446.
- 80.** Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med. Sci. Monit.*, 2004; 10: 141-147.
- 81.** Wang, L.H., Wu, S.H., Hou, L.A., Ma, H., Tsai, L.Y. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clinica Chimica Acta*, 2005; 25:175-181
- 82.** Stahl, M., Bouw, R., Jackson, A., Pay, V. Human. Microdialysis. *Curr Pharm Biotechnol*, 2002; 3(2): 165-78. Review. Stampfer, Mj., Osborn.
- 83.** Meister A. Glutathione Ascorbate and cell cycle regulation *FEBS letters*. 1994: 1-4.
- 84.** Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J. Mayo Clin. Proc.* 1988; 63 (3): 381 - 8.
- 85.** Karabulut Bay A. Hepatit B'li hastalarda eritrosit ve lenfosit antioksidan enzimler, nitrik oksit düzeyleri ve plazma stokinleri. Doktora Tezi, Malatya. 2001
- 86.** Halliwell B., Packer L., Cadenas E. *Handbook of Antioxidants*. Taylor and Francis Groups. 2002; 9-10.
- 87.** Tanırğan G., Koldaş M., Uras F. Serbest radikaller: An introduction to free radical biochemistry. *Haseki Tıp Bülteni.*, 1994; 32(4):304-308.
- 88.** Kılınç K., Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Temel Tıptan Kliniği. Hacettepe Tıp Derg.*, 2002; 33(2):110-118.
- 89.** Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect*, 1994; 102(10):17-24.
- 90.** Jialal, I., and Fuller, C. J., Oxidized LDL and Antioxidants. *Clin Cardiol.* Apr; 1993; 16(4 Suppl 1):16-19.
- 91.** Yanbeyi, S., Aspirin ve Antioksidant Butylated Hydroxyanisole'ün Tavşanlarda Eritrosit Total Katalaz, Süperoksit Dismutaz ve Glutasyon

Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Etkileri. Ondokuz Mayıs Üni. Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun, 1999; 88s

92. Dizdaroğlu M. Chemical Determination of Free Radical-Induced Damage to DNA. *J Free Radical Biology & Medicine*. 1993; 61(3): 225-242.

93. Fırat, S., Kobaylarda Radyasyonla Oluşan Akciğer Hasarında Doku Glutasyon , Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon- S-Transferaz Düzeyleri ve N-Asetil Sistein'in Bu Sistem Üzerindeki Etkisi. Gazi Üni. Tıp Fak. Biyokimya A.B.Dalı, Uzm.Tezi, Ankara, 1997; 95s.

94. Uysal, M., Serbest Radikaller, Lipid Peroksitleri ve Organizmada Prooksidan-Antioksidan Dengeyi Etkileyen Koşullar. *Klinik Gelişim II*, 1998; 336-341.

95. Wheeler, C. R., and Salzman, J. A., Automated Assays for Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase Activity. *Analytical Biochemistry.*, 1990; 184:193-199

96. Tappel AL, Dillard JC. İn vivo lipid peroxidation measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *J. Federation proceedings* 1981; 40(3):174-8.

97. Halliwell B., Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, significance. *Am J Clin Nutr.*, 1993; 57:715-25.

98. Moncada S, Palmer RMJ, Higs EA. Nitric oxide. Physiology, patophysiology, and pharmacology. *J. Pharmacol Review* 1991; 43(29): 109-37.

99. Lancaster J. Nitric oxide, principles and and actions. Copyright by Academic Press. Inc. California/USA. 1990.

100. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *J. Biochem.* 1994; 298(12):249-58.

101. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(7):123-5.

- 102.** Myatt L, Rosenfield RB, Eis ALW. Nitrotyrosine residues in placenta: Evidence of peroxynitrite formation and action. *J. Hypertension* 1996; 28(21): 488-93.
- 103.** Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem* 1995.; 41(12):1819-28.
- 104.** Pal Yu B., Cellular defenses against damage from reactive oxygen species . *Physiol Rev.*, 1994; 74: 13962.
- 105.** Mead, J. F., Free radical mechanism of lipid damage and consequence for cellular membranes. In Poyor WA, ed *Free Radicals and Biology*. New York., 1989; 176-181
- 106.** Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. and Rodwell, V.W., *Harper's Biochemistry*. 24th Ed., 1996
- 107.** Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E., Sato, K., Membran damage due to lipid oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; 53: 201
- 108.** Tekkes, Y., Streptozotisin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve e vitamininin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 2006; 66s.
- 109.** Craig Ve Aust, E.T., Aust, S.D., Free radicals and environmental toxins. *Annals of Emergency Medicine*, 1986; 15,9.
- 110.** Porter, N. A., *Methods Enzymol.*, 1984; 105:273-282.
- 111.** Gardner, H. W., *Free Radical Biol. Med.*, 1989; 7: 65-86.
- 112.** Barclay, C. W., Root resorption: aetiology, classification and clinical management. *Dent. Update.*, 1993; 20(6):248-50
- 113.** Hasegawa, K. Ve Patterson, L. K., *Photochem. Photobiol.*, 1978; 28:817-823.
- 114.** Buettner, G. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993; 300:535-543.
- 115.** Koppenol, W. H., *FEBS Lett.*, 1990, 264:165-167.

- 116.** Nair, V., Cooper, Cs., Vietti, De., Turner, Ga., The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids*. Jan., 1996; 21(1):6-10.
- 117.** Rice-Evans, C. A., Miller, N.J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20:933-56.
- 118.** Ripine JE, Bast A, Lankharst. Lipids I, and The Oxidative Strees Study Graup: Oxidative strees in chronic obstructive pulmorary disease. *J. Respir Crit Care Med.* 1997; 156(26): 341-347.
- 119.** Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *J. Biochem* 1992; 286(35): 607-11.
- 120.** Mccord JM. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26(4): 351-7.
- 121.** Halliwell, B., Gutteridge, J. M., Lipit peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*, 1984; 1(8391):1396-7.
- 122.** Ames, B.N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M., Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1993; 90(17):7915-22.
- 123.** Halliwell, B., Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.*, 1994; 344(8924):721-4.
- 124.** Burçak, G., Andican, G., Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med*, 2004; 35: 159-169.
- 125.** Oğuz, M., Oksijen radikalleri. *C.Ü.Tıp Fak.Der.*, 1990; 12,2.
- 126.** Dizdaroglu, M., Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res*, 1992; 75: 331-342.
- 127.** Bonnefont Rousselot D., Bastard, J. P, Jaudon, M. C., ve Delattre, J. Consequences of The Diabetic Status on The Oxidant/Antioxidant Balance. *Diabetes and Metabolism*, 2000; 26:163-176

- 128.** Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O., Tanaka, Y. ve Takahashi, H., Glucose Toxicity in Cell: Type II Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and The Glutathione Connection. *Diabetes*, 2003; 52:581-587.
- 129.** Frei, B., Stocker, R., Amans, B., Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 9748-9752.
- 130.** Bast, A., Haenen, G. R. M. M., Cees, J. A. D., Oxidants and antioxidants: State of the art. *The American Journal of Medicine*, 1997; 91,(Suppl 3C),30,3C-2S_3C-13S.
- 131.** Halliwell, B., Gutteridge, J. M., The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.*, 1990; 280(1):1-8.
- 132.** Cross, Ce., Halliwell, B., Borish, Et., Pryor, Wa., Ames, Bn., Saul, Rl., Mccord, Jm., Harman, D., Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med.*, 1987; 107(4):526-45.
- 133.** Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., Siest, G., Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem.*, 1991; 37(1932-7).
- 134.** Maxwell, S. R., Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs.*, 1995; 49(3):345-61.
- 135.** Byung, P. Y., Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiological Reviews*, 1994; 74(1):139-172
- 136.** Maccord, J.M. ve Fridovich, I., Superoxide dismutase, an enzymic function of Erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 1969; 244:6049-6055
- 137.** Fridovich, I., Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*, 1975; 44:147-59
- 138.** Henry, L.E.A., Halliwell, B., Hall, D.O., The superoxide dismutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new and rapid assay technique. *Febs Letters*, 1976; 66,2.
- 139.** Flohe, L., Otting, F., Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol*, 1984; 105:93-104.

- 140.** Gonzales, R., Auclair, C., Voisin, E., Gautero, H., Dhermy, D., Boivin, P., Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Res.*, 1984; Sep. 44(9):4137-9.
- 141.** Cerutti, A. P., Mc Cord, J. M., Fridovich, I., Oxy-radicals in molecular biology and pathology. Alan R. Liss. Inc., 1988; 183-193. New York.
- 142.** Criolo, M. R., Fışkın, K., Martino, A. D., Corasaniti, M. T. Et Al., Age-Related Changes Cu-ZnSOD. Se-Dependent And-Independent Glutathione Peroxidase And Catalase Activities in Specific Areas of Rat Brain. *Mechanism of Ageing And Development*, 1991; 61:287-197.
- 143.** Asada, K. Kanematsu, S., Okada, S. And Hayakawa T., Chemical and biological aspects of superoxide and superoxide dismutase, Elsevier, Amsterdam, 1980; 136-153.
- 144.** Allen, R. G., Farmer, K. J., Newton, R. K., Sohal, R. S., Effects of paraquat administration on longevity, oxygen consumption, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides and glutathione in the adult housefly. *Comp Biochem Physiol C*, 1984; 78(2):283-8.
- 145.** Rousseau, P., Amstrong, M., Superoxide Dismutases-Production and Therapeutic Potential Pharmacological Technolooi Loruil., 1990.
- 146.** Smirnoff, N., Pallanca, J. E., Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 1995; 24:16.
- 147.** Marklund, S. L., Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J.*, 1984; 220(1):269-72.
- 148.** Matsuo, M., and Kaneko, T., The Chemistry of Reactive Oxygen Species and Related Free Radicals, Free Radicals in Exercise and Aging (Radak, Z., Eds), Human Kinetics, USA, 200; 1-33.
- 149.** Deby, C. And Goutier, R., New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol*, 1990; 39: 399-405.
- 150.** Leeuwenburg, C., and L. L. J., Alteration of Glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. *J. Nutr*, 1990; 126:1833-1843

- 151.** Breckta, A., Greenstock, C. L., Tambo, M., Advances on oxygen radicals, and radioprotectors: Mavelli, I: Ratalio, G: Enzymatic Protection Against Intracellular Oxidative Processes., 1984; 65-80.
- 152.** Kılınç, K., Serbest oksijen radikallerinin biyokimyasal etkileri ve metabolizması. *Biyokimya Dergisi.*, 1985; 2:60-89.
- 153.** Tudhope, G.R., Red cell catalase in health and in disease , with reference to the enzyme activity in anaemia. *Clin. Sci*, 1967; 33:165-182.
- 154.** Palmer, T., *Understanding Enzymes.*, 1990
- 155.** Halliwell, B., Gutteridge, J. M., Production of hydroxyl radicals in living systems. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford. Clarendon Press, 1989; 254-300.
- 156.** Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Okan, E., Samuni, A., A novel antiulserogenic stable radical prevents gastric mucosal lesions in rats. *Gut*, 1994; 35:1181-1188.
- 157.** Powers S. K, Lennon S. L., Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc.*, 1999; 58(4): 1025-33.
- 158.** Imai H, K. Narashima, M. Arai, H. Sakamoto, N. Chiba and Y. Nakagawa., Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipit hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem.*, 1998; 273.
- 159.** Ding L, Z., Liu, Z., Zhu, G., Luo, D., Zhao and J. Ni., Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochem J*, 1998; 332: 251-255.
- 160.** Yan, H. and J. J. Harding., Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J*, 1997; 328, 599-605
- 161.** Ketterer, B., Tan, K.H., Meyer, D.J., Coles, B., Glutathione tranferases: a possible role in the detoxification of DNA and lipit hydroperoxides. In: Mantle, T.J., Pickett, C.B., Hayes, J.D., eds. *Glutathione S-transferases and carcinogenesis.* New York: Taylor & Francis, 1987; 149-163.

- 162.** Mills, G.C., Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.*, 1957; 229: 189-197.
- 163.** Mannervik, B., Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 1985; 113:490-5.
- 164.** Peters, W.H., Purification and partial characterization of human intestinal glutathione s-transferases. *Biochem. Pharmacol.*, 1988; 37(11):2288-2291
- 165.** Vermeulen, N.P.E., Analysis of mercapturic acids as a tool in biotransformation, biomonitoring and toxicological studies. "Glutathione-S-transferases and Drug Resistance" Taylor and Francis London, 1990; 1: 141-153.
- 166.** Snel, C.A.W., Zhao, Y., Mulder, G.J., Pang, K.S., Methods for the quantitation of bromosulphophthalein and its glutathione conjugate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, 1993; 212: 28-34.
- 167.** Zhao, Y., Snel, C. A. W., Mulder, G. J. and Pang, K. S., Localization of glutathione conjugation activities toward bromosulphophthalein in perfused rat liver: Studies with the multiple indicator dilution technique. *DrugMetab. Dispos.*, 1993; 21: 1070-1078.
- 168.** Carlberg I., Mannervik, B., Glutathione reductase. *Methods Enzyme.*, 1985; 113: 448-490.
- 169.** Mann, P.J.G., The reduction of glutathione by a liver system. *Biochem. J.*, 1932; 26: 785-790.
- 170.** Akyol, Ö., Şizofrenide Oksidatif Stres. *Kocatepe Tıp Dergisi*, Cilt 5, Ek Sayı 1., 200
- 171.** Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., Yagi, K., Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonolactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem*, 1994; 269:13685-13688.

- 172.** Nishikimi, M., Yagi, K., Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. *Subcell Biochem*, 1996; 25:17-39
- 173.** Dündar, Y., Aslan, R., Oksidan Antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 1999; 9(1-2) : 32-39.
- 174.** Meister, A, Anderson, M.E., Glutathione. *Annu RevBiochem*, 1983; 52: 711-60.
- 175.** Meister, A., Glutathione metabolism. *Methods inEnzymology*, 1995; 251:3-7.
- 176.** Ji, L. L., Oxidative Stress During Exercise: İmplications of Antioxidant Nutrients. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; 18:1079-1086.
- 177.** Ji, L. L., Exercise, oxidative stress, and antioxidants. *Am J Sports Med*, 1994; 24:20-S24.
- 178.** Flohe, L., Loschen,G., Mechanism of the therapeutic effect of exogenous superoxide dismutase:findings and prospects. *Eur J Rheumatol Inflamm.*, 1981; 4(2):183-200.
- 179.** Lew, A. S., Ganz, W., Thrombolysis during acute myocardial infarction. *Acute Care.*, 1985; 11(1):3-39.
- 180.** Halliwell B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. *J. The American Journal of Medicine*. 1991; 91(3C): 14-22.
- 181.** Berger SJ, Gosky D, Zberowska E. Sensitive enzymatic cycling in diabetes. *J. Diabetes* 1991; 46(4): 405 - 12.
- 182.** Burton G, Traber M. Vitamin E : antioxidant activity biokinetics and bioavailability. *J. Annu. Rev. Nutr.* 1990; J. 10: 357-82.
- 183.** Pabo'n A, Carmona J, Burgos LC, Blair S. Oxidative stress in patients with non-complicated malaria. *J. Clinical Biochemistry* 2003; 36(5): 71-78.
- 184.** Ladislav, F , Vera, P., Karel, tulika and Karel, Volkab, *Current Analytical Chemistry*, 2005; Vol. 1, No.1

- 185.** Mortensen, A., Skibsted, L. H, Truscott, T. G, The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch Biochem Biophys*, 2001; 385, 13-19.
- 186.** El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G., Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *ArchBiochem Biophys*, 2004; 430, 37-48.
- 187.** Yazıcı, C., Köse, K., Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2004; 13(2):56-65.
- 188.** Guyton&Hall. *Tıbbi Fizyoloji*. 10. Edisyon. Nobel yayınları, 2001; s.392-400
- 189.** M Slifkin and R Cumbie. Comparison of the Histopaque-1119 method with the Plasmagel method for separation of blood leukocytes for cytomegalovirus isolation. *J Clin Microbiol*. 1992 October; 30(10): 2722–2724.
- 190.** Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951; 193: 265-275
- 191.** Doğan P, Tanrikulu G, Soyuer U, Köse K. Oxidative enzymes of polymorphonuclear leucocytes and plasma fibrinogen, ceruloplasmin, and copper levels in Behçet's disease. *Clin Biochem*, 1994; 27(5):413-8.
- 192.** Boetling RS, Weaver TL. A new assay for diaphorase activity in reagent formulations, based on the reduction of thiazolyl blue. *Clin Chem*, 1979; 25: 2040-2.
- 193.** Arab K, Steghens JP. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. *Anal Biochem*, 2004; 325:158-63.
- 194.** Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 1990; 186:421–31.
- 195.** Nims RW, Cook JC, Krishna MC, Christodoulou D, Poore CM, Miles AM, Grisham MB, Wink DA. Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds. *Methods Enzymol*, 1996; 268:93-105.

- 196.** Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.*, 2005; 38(12):1103-11.
- 197.** Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 1999; 6(2):99-104.
- 198.** Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*, 1991; 196(2-3):143-51.
- 199.** Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 1967; 70: 158-69.
- 200.** Sun Y, Oberlay LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 1988; 34:497–500.
- 201.** Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 2004; 277– 285
- 202.** Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hydrochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med*, 1993; 121:257-62.
- 203.** Harma M, Harma M, Erel O. Oxidative stress in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2005; 192:656-7.
- 204.** Eckerson HW, Wyte MC, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1983; 35:1126–38.
- 205.** Haagen L, Brock A. A new automated method for phenotyping arylesterase (E.C.3.1.1.2.) based upon inhibition of enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate by phenyl acetate. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1992; 30:391–5.
- 206.** Rathod DA, Patel V, Kaur AA, Patel VD, Patel DD. Diagnosis of acute malaria by laser based cell counter with comparison of conventional and recent techniques in Indian scenario. *Indian J Pathol Microbiol*, 2009; 52(2):185-188.
- 207.** Tuğluoğlu F. Malaria control in Turkey. *Turkiye Parazitol Derg.*, 2008; 32(4):351-359.

- 208.** Dale DC, Wolff SM. Studies of the neutropenia of acute malaria. *Blood*, 1973; 41(2):197-206.
- 209.** Kassa D, Petros B, Mesele T, Hailu E, Wolday D. Characterization of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with acute *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria infections at Wonji Sugar Estate, Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol*, 2006; 13(3):376-9.
- 210.** Taylor WR, Widjaja H, Basri H, Ohrt C, Taufik T, Tjitra E, Baso S, Fryauff D, Hoffman SL, Richie TL. Changes in the total leukocyte and platelet counts in Papuan and non-Papuan adults from north-east Papua infected with acute *Plasmodium vivax* or uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar J*, 2008; 18;7(1):259.
- 211.** Mert A, Ozaras R, Tabak F, Bilir M, Ozturk R, Aktuglu Y. Malaria in Turkey: a review of 33 cases. *Eur J Epidemiol*, 2003; 18(6):579-82.
- 212.** Tangpukdee N, Yew HS, Krudsood S, Punyapradit N, Somwong W, Looareesuwan S, Kano S, Wilairatana P. Dynamic changes in white blood cell counts in uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. *Parasitol Int*, Dec, 2008; 57(4):490-4.
- 213.** Wang QH, Liu YJ, Liu J, Chen G, Zheng W, Wang JC, Cao YM. *Plasmodium yoelii*: assessment of production and role of nitric oxide during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. *Exp Parasitol*, 2009; 121(3):268-73.
- 214.** Kikuyama A, Fukuda K, Mori S, Okada M, Yamaguchi H, Hamanishi C. Hydrogen peroxide induces apoptosis of osteocytes: involvement of calcium ion and caspase activity. *Calcif Tissue Int*, 71(3):243-8
- 215.** Guha M, Kumar S, Choubey V, Maity P, Bandyopadhyay U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. *Faseb J*, 2006; 20(8):1224-6.
- 216.** Potter S, Chan-Ling T, Ball HJ, Mansour H, Mitchell A, Maluish L, Hunt NH. Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *Int J Parasitol*, 2006; 36(4):485-96.

- 217.** Sohal RS, Orr WC. Relationship between antioxidants, prooxidants, and the aging process. *Ann N Y Acad Sci*, 1992; 21;663:74-84.
- 218.** Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 1994; 17(3):235-248.
- 219.** Karthikeyan K, Sinha I, Prabhu K, Bhaskaranand N, Rao A. Plasma protein thiols and total antioxidant power in pediatric nephrotic syndrome. *Nephron Clin Pract*, 2008; 110(1):10-14.
- 220.** Gur M, Aslan M, Yildiz A, Demirbag R, Yilmaz R, Selek S, Erel O, Ozdogru I. Paraoxonase and arylesterase activities in coronary artery disease. *Eur J Clin Invest*, 2006; 36(11):779-787.