

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Tüberküloz (TB), başta akciğer olmak üzere, vücudun tüm organlarında M. tuberculosis complex olarak tanımlanan bir grup mikobakteri tarafından oluşturulan, çok değişik klinik görünümlere sahip kronik, nekrozitan bir enfeksiyondur. Hastalığın oluşumundan %97-99 oranında M. tuberculosis sorumludur. Tüm organları tutabilmesine karşın, TB denildiğinde daha çok akciğer tüberkülozu hatta, Yayma Pozitif Akciğer Tüberkülozu akla gelmektedir. Aslında böyle bir çağrışım, hastalığın sadece bireyi değil, toplumu ilgilendiren bir sorun olmasından kaynaklanmaktadır. Yayma pozitif akciğer tüberkülozlu vakalar hastalığı sağlam kişilere bulaştırarak toplum içinde yayılmasına neden olmaktadırlar 1882 yılında etkenin (M. tuberculosis) bulunmasına, 1921 yılında bir aşının geliştirilmesine ve 1950'li yılların ortalarından beri etkili bir şekilde tedavi edilebiliyor olmasına karşın TB, tüm dünyada, geçen binlerce yıllık süre içinde insidansında artış ve azalmalarla seyretmiş dünya da ve ülkemizde halk sağlığı açısından kalıcı bir tehdit olma özelliğini her zaman sürdürmüştür. Geçmişte çiçek, veba veya kolera gibi hastalıklarla birlikte birçok dramatik salgınlara neden olan tüberküloz, günümüzde AIDS ile birlikte benzer bir salgın sergilemektedir. Tüm dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri TB basili ile enfektir ve her yıl 8 milyon yeni hasta ortaya çıkmakta ve 3 milyon kişi tüberkülozdan ölmektedir (81).

Oksidatif stres, aşırı oksidana maruz kalma ve/veya antioksidan kapasitenin azalmasıdır. Biyolojik sistemlerde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküllere oksidan veya serbest radikal denmektedir. Oksidanlar hücre yapısını, hücre dışı matriksin yapısını, silia fonksiyonunu ve DNA hasarı yaparak genetik yapıyı bozmaktadırlar. Mitokondrial, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Serbest radikaller DNA, protein ve hücre fosfolipidlerinin çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere birçok organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girerler. Özellikle DNA'yı etkileyen serbest radikaller önemli zararlara neden olurlar. Bu zararlarda karsinojenik mutasyonlara neden olabilmektedir. Bu radikallerin oluşumunu ve meydana getireceği hasarı önlemek için vücutta bir çok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Eğer bu radikaller savunma mekanizmalarının

kapasitesini aşarlarsa hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli bileşenlerinde hasara neden olurlar. Antioksidatif savunma mekanizmaları; A, E, C vitaminleri,  $\beta$ -karoten, indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi bazı vitamin ve kimyasal maddeler ile çeşitli antioksidan enzimlerden oluşur. Serbest radikaller, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, alerji, diabet, katarakt gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynayan ve bu nedenle son zamanlarda üzerinde en çok çalışılan konular arasında yer almaktadır (83,84). Akciğer oksidanlardan en çok etkilenen organdır çünkü hava kirliliği ve kan kaynaklı oksidanların etkisindedir. Ayrıca en fazla oksijen ile karşılaşan organdır. TB da oksidatif stresin arttığı gözlenmiş, yapılan araştırmalarda özellikle kronik akciğer tüberkülozlu hastalarda akciğer kanser insidansının daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte akciğer tüberkülozlu hastalarda kanser oluşum mekanizması ile ilgili araştırmalar oldukça azdır (55).

Komet assay olarak ta bilinen alkalin hücre elektroforez yöntemi hücrelerde oluşan DNA hasarını ve kanser oluşum riskini gösteren kolay, güvenilir ve ucuz bir yöntem olup, DNA hasar çalışmalarında son yıllarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (55).

Bu çalışmada kronik akciğer tüberkülozlu hastalarda mononükleer lökosit DNA hasarı, plazma protein oksidasyonu (PO), total oksidant seviye (TOS), antioksidant kapasite (TAK), lipid peroksidasyonu (MDA) ve oksidan/antioksidan oranı incelenerek, DNA hasarı ve oksidatif stress parametreleri ile akciğer tüberkülozu arasındaki ilişki araştırıldı.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1.Tüberküloz**

90'dan fazla antijene ve değişik virülans faktörlerine sahip TB, Mycobacterium tuberculosis basili ile konağın mononükleer fagositleri ve T lenfositlerinin ilişkisine bağlı olarak gelişen kronik granümatöz bir infeksiyon hastalığıdır (33,34,35). Tüberkülozda hastalık oluşumunun temeli, basil ile konak arasındaki savaşın seyrine bağlıdır. Her ikisinin birbirine karşı kuvvetli ve zayıf tarafları vardır. Dünya nüfusunun üçte biri M.tuberculosis basili ile infekte olmuş durumdadır. M. tuberculosis ile infekte olan kişilerin %90 kadarında mikroorganizmalar sessiz kalan odaklarda tutulur ve klinik belirti vermezler, yani hastalık oluşturmazlar. Basille infekte kişilerin %3-4 kadarında basille karşılaşma sonrasındaki bir yıl içinde hastalık gelişebilir; %5-15 olguda hastalık hayatın her hangi bir devresinde “geç nüks” biçiminde görülür (41,42). Basil solunum, sindirim, deri, genitoüriner sistem, konjuktivadan girebilir. Sıklıkla solunum yoluyla alveole ulaşan basil burada alveolar makrofajlarca fagosit edilir, aktif olmayan makrofajlarda ürer, sonunda bu hücreler parçalanır, yeni hücreler infekte olur. Bu dönemde mikobakterilerin yıkılarak yok edilmesi alınan mikobakterilerin virulansı ve konak fagositlerinin intrinsek mikrobisidal kapasitelerine bağlıdır. Başlangıçtaki hücre içi yıkımdan kaçabilen mikobakteriler çoğalıp makrofajların parçalanmasına yol açacaktır. Basiller, hücre debris, konak kemotaktik faktörleri (C5a...) ile dolaşımdan monositleri ve lenfositleri bu bölgeye çekilir. Bölgeye gelen monositler makrofajlara diferansiye olur; bunlar basilleri daha kolay fagosit eder, ama tahrip edemez. Bu devrede mikobakteriler logaritmik olarak çoğalır, monositler birikmeye devam eder. Basiller lenf yoluyla komşu lenf bezlerine taşınır kan akımına karışan basiller kemik iliği, dalak, böbrek, karaciğer, kemik, merkezi sinir sistemine (MSS) yayılır (36,44,70,71). Olayın başlangıcından 2-4 hafta sonra kendilerine sunulan antijen ile aktive olan CD4+T hücreleri bölgeye gelir ve erken lezyonlarda çoğalırlar. Bu yardımcı T hücreleri saldıkları değişik sitokinlerle makrofajları aktive edip basilleri öldürebilme yeteneği kazandırır. Bu devrede basillerin logaritmik çoğalması durur. Bu primer lezyonlardaki merkezi solid nekroz mikobakterilerin hücre dışı üremesini inhibe eder. Sonuçta infeksiyon stasyonere veya dormant hale geçebilir. İmmun denetim yetersiz kalırsa hastalık ilerler (primer infeksiyon); veya dormant

hale gelen lezyonlar sonraki dönemlerde (yıllar sonra) immun sistem her hangi bir nedenle zayıflarsa yeniden aktive olur(post primer tüberküloz). Özetle basil akciğere ulaştıktan sonra farklı konak mekanizmaları ile karşılaşır. M.tuberculosis ile infeksiyonun sonucu, basilin üreme ve öldürülmesi ile doku nekrozu, fibröz ve rejenerasyon arasındaki dengeye bağlıdır (49,53,54,56).

### **2.1.1.Tarihçesi**

Tüberkülozun tarihçesi insanlık tarihi kadar eskidir. Eski Mısır medeniyetinde firavunlara ait mumyaların incelenmesinde M.Ö. 4000 yılındaki mumyalarda spinal tüberkülozun karakteristik bulgularına ve Cristoph Colomb'un Amerika kıtasını buluşundan evvelki devirlere ait Peru mumyalarında da primer akciğer tüberkülozunun kalsifikasyonlarına rastlanmıştır (13). Eski Yunan medeniyetinde Hipokrat (M.Ö. 460-375) tüberküloz hastalarının klinik bulgularını tarif etmiş ve Fitizis (eriyip tükenmek, aşırı zayıflama) diye adlandırmıştır. 19. Yüzyılın başlarında büyük Fransız hekim, Laennec'in o zamana kadar ayrı birer antite zannedilen tüberküloza ait çeşitli lezyonların aslında aynı hastalığın değişik anatomopatolojik safhaları olduğunu göstermesi tüberküloz konusuna ilk bilimsel yaklaşım olmuştur. 1865'te Villemin hastalığın enfeksiyöz tabiatlı olduğunu ve hayvana inoküle edilebileceğini göstermiş ve 1882'de Robert Koch'un tüberküloz basilini bulması yeni bir çağın açılmasına neden olmuştur. 1895'te Roentgen'in X ışınlarını keşfiyle ve 1898'de Bouchard ve Beclere'nin bunu akciğer radyodiagnostiğine uygulamasıyla yine önemli bir adım atılmıştır. 1941-43'de Waksman'ın streptomisini keşfi ve izonikotinic asit hidrazid'in tedavi safhasına girmesiyle bu asrın ortalarına kadar daha ziyade hijyenodiyetik kültürle sınırlanan tüberküloz tedavisi, yeni ve etkili bir yöne girmiştir. Bununla beraber tüberkülozda kemoterapi devrinin açılmasıyla beliren tüberkülozun çok kısa bir sürede dünyanın her tarafında kontrol altına alınacağı ve ortadan kaldırılacağı konusundaki aşırı iyimser tutumların gerçekleşmediği zamanla görülmüştür (14). Türkiye'de tüberkülozla savaş çalışmaları 1918'de Prof.Dr. Besim Ömer Akalın Paşa'nın "Veremle Mücadele Osmanlı Cemiyeti"ni kurmasıyla başlamıştır. Daha sonra 1923'te Dr. Behçet Salih Uz "İzmir Veremle Mücadele Cemiyet'i Hayriye"sini kurmuştur. 1948'de İstanbul'da Ulusal Verem Savaş Derneği kurulması

kararlaştırılmıştır. Derneğin başkanlığına Prof.Dr. Tefvik Sağlam seğilmiştir(15). 1953 yılında BCG aşı kampanyalarına başlanmıştır. 1950-70 yılları arasında sŸrdŸrŸlen bu çalışmalar sonucunda tŸberkŸlozla mŸcadelede önemli adımlar atılmıştır. Ancak; 1980’li yılların sonuna gelindiğinde; bu alandaki yatırımların azalması sonucu, çalışmaların etkinliğinin azaldığı ve tŸberkŸloz enfeksiyon riskinde belirgin artış olduğu grŸlmŸřtŸr. Bununla birlikte gelişmiş Ÿlkelerde 1970’lerin sonunda eradike edileceği dŸřŸnŸlen tŸberkŸloz hastalığı, HIV enfekte erişkinlerin artmasıyla tekrar grŸlmeye başlamış, hastalık sıklığı ve lŸm oranlarındaki ciddi artışlar tŸm dŸnyanın gzŸnŸ tekrar tŸberkŸloz basiline çevirmesine yol açmıştır (14, 16).

### **2.1.2. TŸberkŸloz Etkeni**

TB, Mycobacterium Tuberculosis, Mycobacterium Bovis ve nadir olarak da Mycobacterium Africanum’un yol açtığı kronik seyirli bir hastalıktır (11). TB basiller Mycobacteriaceae’ların Actinomycetales sınıfındandır (24). Mycobacterium cinsi içinde aerop, sporsuz, hareketsiz basiller bulunur. HŸcre duvarları lipitten zengindir ve bu nedenle bakteriler hidrofobik özellik kazanırlar. Bu da birçok dezenfektana dirençli olmalarını sağlar ve ayrıca bu nedenle Mycobacteriumlar Gram, Giemsa gibi rutin bakteriyolojik boyalarla boyanmazlar. Bazı zel yöntemlerle boyandıklarında, boyayı asit ile yıkanmalarına rağmen bırakmazlar. Bu nedenle aside dirençli bakteriler arasında yer almaktadırlar. İdentifikasyonları Ziehl Neelsen tekniği adında özel bir boyama tekniği ile yapılır. Mikobakterilerin hŸcre duvarı diğer bakterilerde farklılık gösterir. HŸcre duvarında peptidoglikan tabakanın çevresinde arabinogalaktan-mikotik asit tabakası, en dışta da serbest yağlar (mikozytler, kord faktör, balmumu yapısındaki maddeler) ve polipeptidler yer alır. HŸcre duvarındaki polipeptidler, hŸcre sel immun yanıt gelişimine yol açarlar ve bu protein derivelerin ekstraksiyonu ve purifikasyonu ile elde edilen maddeler deri testlerinde kullanılırlar (PPD) (25). Mikobakteriler zel besiyerlerinde ortalama 21 gŸnde Ÿrerler. Basit sentetik vasatı, oleik asit-albumin vasatı, kompleks organik vasat olmak Ÿzere Ÿ tip kŸltŸr ortamı vardır. Kompleks organik vasatı diğer bakterileri ve dolayısıyla kontaminasyonu inhibe eden penisilin veya malasit yeşili içerir

(Lowenstein-Jensen besiyeri). Bazen kolonilerin görülmesi 6 haftayı bulabilmektedir (26).

### **2.1.3.Epidemiyolojisi**

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre halen dünya nüfusunun 1/3'ünü oluşturan yaklaşık 1.7 milyar insan TB basili ile enfekte durumdadır (16). Tüberkülozun klinik seyrindeki iki gelişme, gelişmiş ülkelerdeki halk sağlığı kuruluşlarının BCG aşısı ile yeniden ilgilenmesine neden olmuştur. Bunlardan biri; HIV enfeksiyonu olan kişilerde her yıl % 5-10 tüberküloz enfeksiyonu gelişmesi diğeri de; söz konusu mikobakterinin klasik tüberküloz ilaçlarına direnç kazanması, multidrug rezistan suşların artış göstermesidir (17). Dünyada her yıl tüberküloza bağlı 2.3 milyon ölüm ve 8 milyonun üstünde yeni olgu meydana gelmekte ve 15 yaş altı 450.000 çocuk tüberküloza bağlı olarak hayatını kaybetmektedir (3). Çocuklardaki tüberküloz enfeksiyon riski; yakın çevresinde, özellikle aynı evdeki yetişkinlerdeki bulaşıcı tüberküloz gelişimine bağlıdır. Fakirlik, kalabalık evde yaşama, malnutrisyon, yetersiz tüberküloz kontrol programları, evsizlik, temel sağlık hizmetlerine erişim güçlüğü tüberküloz enfeksiyonu için önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır. Kalabalık evlerde yaşayan çocuklar diğer çocuklara göre 5-6 kat daha fazla aktif tüberküloza yakalanma riskine sahiptirler (1, 18, 19, 20). Süt çocukları başta olmak üzere 4 yaş altı çocuklar, immun yetmezliği olan çocuklar, lenfoma, diabetes mellitus, kronik böbrek yetmezliği gibi kronik hastalığı olan çocuklarda enfeksiyonun hastalığa ilerlemesi daha sık görülen bir durumdur (6).

### **2.1.4.Bulaşma**

M.Tuberculosis havadaki damlacık çekirdekleri ile taşınır. Enfeksiyonun vücuda giriş yolu genellikle solunum yolu ile olur. M.Bovis'in geçişi ise genelde sindirim sistemi yoluyla olabileceği gibi; havayolu ile bulaşabileceği de bilinmektedir. Ayrıca anneden fetusa transplasental veya enfekte amnios sıvısı yoluyla da M.Tuberculosis bulaşabilmektedir. İntrauterin bulaşma çok nadir bir durumdur, ancak annede plasentayı da ilgilendiren yaygın tüberküloz hastalığında oluşabilir (24, 27). 1-5 µm çapında olan 2-3 bakteri taşıyan damlacık çekirdekleri akciğer ve larinks tüberkülozu olan hastaların konuşma, hapşırma, öksürüğü

sırasında etrafa saçılıp havada asılı kalırlar ve sağlam insanlar tarafından inhale edilirler (31, 29). Çapı daha büyük olan partiküller, havada uzun süre kalamayacağı ve inhale edilse bile alveollere ulaşamayacağı için bulaşmada etkili değildir (29). M.Tuberculosis, kuru havada canlı kalmaz, güneş ve ultraviyole ışınları bulaştırıcılığını kaybetmesine yol açar. Bulaştırıcılıktan en çok suçlanan hastalar doğrudan yapılan balgam yaymasında basil görülen hastalardır. Yetişkin ve adolesan hastaların çoğunun bulaştırıcılığı, uygun tedavi başlandıktan sonra 2 hafta içinde kaybolur; balgam yaymasında basil görülse bile, düzenli ve yeterli tedavi alan hastalar bulaştırıcı değildirler (6,32). Primer pulmoner tüberküloz bulunan 12 yaş altındaki hastalar akciğer lezyonları küçük olduğundan, öksürük olmadığı veya çok hafif olduğu ve hemen hiç basil çıkartmadığı için bu hastaların genelde bulaştırıcı olmadığı kabul edilmektedir (6). Toplumda çocuklar için bulaştırıcı kaynak erişkinlerdir. Hasta erişkinin bulaştırıcılığını; balgamdaki mikroorganizma miktarı, öksürük varlığı, yetersiz tedavi gibi bazı faktörler etkileyebilmektedir. Kontamine sütlerin GIS yoluyla alınmasıyla oluşan M.Bovis enfeksiyonları oldukça nadirdir. Bunun yanı sıra deri temasıyla, enfeksiyon yoluyla; konjktiva yoluyla bulaşmaya da ender olarak rastlanmaktadır (24, 31).

### **2.1.5.Bakteriyoloji**

Mycobacterium cinsi bakterilerin temel özellikleri yavaş üremeleri, aside dirençli olmaları (yani arilmetan boyalarla bir kez boyandıktan sonra asit ve alkol ile dekolorize edilemezler), hücre duvarlarında bol miktarda lipid içermeleri ve genomlarında %59-65 GC içermeleridir. Bu asitler hücre duvarı kalınlığından ve büyük oranda da hücrenin aside dirençli olmasından sorumludur. Mikolik asitler, trehaloz gibi bir şekere bağlanarak ip faktörü (cord factor) oluşturabilirler. En dış tabaka ise bir grup heterojen peptidoglikolipidler ve/veya fenolik glikolipidden oluşmuştur ve mikozidler olarak adlandırılırlar M. tuberculosis dışında 70'in üzerinde tür tanımlanmıştır. Bunların içinde major 2 patojen:

M. tuberculosis (Koch, 1882)

M. leprae (Hansen, 1874)

Bakteriyolojik özellikleri ve DNA benzerlikleri nedeniyle birbirleriyle yakın ilişkili türler "complex" başlığı altında toplanmaktadırlar. Klinik açıdan

bakıldığında hastalık yapma potansiyeli ve halk sağlığı ile yakın ilişkisi nedeniyle *M. tuberculosis* cinsin en önemli üyesidir ve günümüzde insanlarda görülen tüberkülozun esas nedenidir. Çok az sayıda (%1-2) olguda *M. bovis* ve *M. africanum* etken olarak saptanır. *M. microti* ise kemiriciler için patojen olup insanlarda hastalık yapmaz.

*M. tuberculosis* kompleks dışındaki mikobakterilere "tüberküloz dışı mikobakteriler" veya "atipik mikobakteriler" denmektedir. Bunlar doğada, toprakta, suda bolca bulunurlar, insandan insana geçişi çok enderdir ve çoğu patojen değildir. Bu grubun üyeleri ender olarak hastalık oluşturur ve anti tüberküloz ilaçların çoğuna dirençlidirler. İmmun sistemi zayıflamış konakta ciddi infeksiyonlara neden olabilirler. Mikobakteriler karbol fuksin gibi bir anilin boyası ile boyandıktan sonra asit ve alkol ile yapılan renk giderme işlemine dirençlidir ve bu nedenle asit ve alkole dirençli basil (ARB) olarak adlandırılmaktadır. Bu özellik hücre duvarındaki peptidoglikan ve arabinomannan'ın oluşturduğu ağ tabakası ile ilişkilidir. Anilin boyası bu tabaka ile bağ oluşturarak asit ve alkol etkisine karşın yerinde kalır. Bu yöntem son 60 yıldır kullanılan Ehrlich-Ziehl-Neelsen (EZN) tekniği ile klinik örneklerde ARB'nin saptanmasını sağlar. *M. tuberculosis*'in üremesi yavaş olup ancak 18-24 saatte kendini eşler ve standart kültür ortamında üremesi ortalama 4-6 haftada gerçekleşir. Olumsuz koşullara oldukça dayanıklıdır ve uzun süre canlılığını sürdürebilir. Aerob olan bakteri +4°C'de haftalarca, -70°C'de yıllarca canlılığını koruyabilmesine karşın, 60°C'de 20 dakikada, 70°C'de beş dakikada ölür (81).

### **2.1.6.Patogenez**

Basilin virulansı ve konağın genetik duyarlılığı, enfeksiyonun patogenezinde rol oynamaktadır. Dannenberg, basilin vücuda girmesiyle başlayan enfeksiyon oluşumunu 4 evrede incelemiştir (31,68).

**Birinci evre:** İnhale edilen damlacık çekirdeğindeki basiller konağın alveollerinde depolanır. Hastalığın oluşabilmesi için 5-200 kadar basilin dahi alınması yeterlidir (25,68). Makrofajlar alveollere ulaşan tüberküloz basilini yutarlar, hiler veya mediastinal lenf nodlarına taşırlar. Basiller burada organizmanın virulansına ve makrofajların öldürücü aktivitesine bağlı olarak baskılanabilir, yok



edilebilir ya da çoğalmaya devam edebilirler. Makrofajlar basili yok edemezse; basiller makrofajın ölümüne sebep olur (31).

**İkinci evre:** Basil içeren makrofajların ölümü sonucunda ortaya çıkan hücre artıkları diğer alveoler makrofaj ve dolaşımdan gelen henüz aktive olmamış makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Basiller hücre içinde çoğalarak logaritmik olarak artar. Makrofajlar basillerin çoğalmasını durduramaz ve bu evre “simbiotik” veya “logaritmik çoğalma evresi” olarak bilinir. Lezyon bölgesinde daha fazla makrofaj ve basil birikir (31,68).

**Üçüncü evre:** Hücresel bağışıklığın başladığı dönemdir. Alveoler makrofajlar mikobakteriye karşı spesifik olarak aktive olur. Aktive makrofajlar sayesinde basil sayısındaki artış azaltılır(31,68,69).

**Dördüncü evre:** Makrofajların aşırı tepkisi nedeniyle granülomanın likefaksiyonu, yırtılması ve kavite oluşumunun olduğu dönemdir. Bu dönemde çocuklarda hematojen yayılım olabilir, pulmoner yaygın hastalık ya da ekstrapulmoner tüberküloz oluşabilir. Basil nekroz ve parçalanmış doku artıkları içinde ilk kez hücre dışında logaritmik olarak çoğalabilir. Hastalar basilleri damlacık enfeksiyonu ile etrafa yayabilir (68,69).

### 2.1.7. İmmünoloji

Tüberküloz enfeksiyonu hücresel immün yanıt (T lenfositler, makrofajlar ve bunlardan salınan sitokinler) ile kontrol edilebilen hücre içi enfeksiyonların tipik bir örneğidir. Zengin bir antikor yanıtının oluşmasına rağmen humoral immünitinin konakçı savunmasına anlamlı katkısı yoktur. Makrofajlarca fagosite edildikten sonra bir şekilde kurtulmayı başaran virülen basiller fagozomlarda çoğalmaya başlarlar. İmmün yanıtın henüz gelişmediği ilk iki haftada basiller makrofaj içinde, alveol boşluğunda ve bu sırada lenfohematojen olarak yayıldıkları odaklarda serbestçe çoğalırlar. Makrofajlar içinde parçalanmış basillerin bazı antijenik kısımları (epitoplar) işlenerek majör histokompatibilite antijenlerine (MHC) bağlanır ve bu şekilde makrofaj yüzeyine taşınarak T lenfositlerine sunulur. Antijenler CD4+ lenfositlere MHC class II ile, CD8+ lenfositlere ise MHC class I ile taşınabilmektedir. Gamma-delta T lenfositler ise MHC’den bağımsız olarak basilleri tümüyle tanıyabilmektedir. Antijen-MHC kompleksini alarak aktive olan T

lenfositleri ürettikleri IL-2 ile benzer şekilde reaksiyon veren bir T lenfosit klonu oluştururlar. Bu klon basil antijenleri ile uyarıldığında koruyucu immünite, gecikmiş aşırı duyarlılık, sitoliz, antikor üretimi ve bellek hücrelerinin uyarılması veya supresyonu gibi değişik immünolojik olaylara katılır. Ayrıca CD4+ lenfositler basil ile infekte makrofajların lizisine aracılık etmekte ve bu sitotoksik etkiler enfeksiyonun başlamasının 6. Haftasında en üst düzeye çıkmaktadır. T helper lenfositlerinin alt grubu olan TH1 lenfositleri IFN-gamma, IL-2 ve TNF-beta gibi lenfokinler salgılayarak makrofajların antijenin kaynağında toplanıp aktive olmasını sağlarlar, makrofajların mikrobisidal gücünü de arttırırlar. Aktive olan makrofajlar büyür, mitokondri ve lizozomların sayısı ve süperoksit üretimi artar. Yüksek düzeyde biriken litik enzimler ve reaktif oksijen ve nitrojen metabolitleri (özellikle NO) mikrobisidal yeteneği arttırır. Fagositoz sonrası birçok sitokin makrofajlardan salgılanır. Bunlardan IL-1, IL-8, TNF ve GM-CSF proinflamatuvar moleküllerdir ve lenfosit ve monositlerin lezyon bölgesinde toplanmasını kolaylaştırır. IL-1 pirojendir ve tüberküloza özgü ateşin oluşumuna katkıda bulunur. IL-6 aktive B lenfositlerden immünglobulin salınımını arttırarak tüberkülozlu hastalarda sıkça görülen hiperglobulinemiye neden olur. TNF-alfa ise IFN-gamma ile birlikte bakterisidal nitrik oksit metabolitlerinin üretimini arttırır ve granülom oluşumuna katkıda bulunur. Ayrıca TNF, ateş, kilo kaybı ve tüberküloza özgü doku nekrozları gibi birçok immünopatolojik olaya neden olur. İmmüsupresif etkili IL-10 lenfosit ve monositlerden sitokin salınımını inhibe ederken, TGF-beta (transforming growth factor-beta) ise T hücre proliferasyonunu ve makrofaj fonksiyonlarını inhibe eder. Bu iki sitokin kontrol edilemeyen inflamatuvar yanıtta aşırı inflamasyon ve doku nekrozunu önleyebilir.

Tüberküloz enfeksiyonu sırasında aktive lenfosit topluluğu belirli bir büyüklüğe ulaşıncaya kadar aşırı duyarlılığı veya tüberkülin deri testi pozitifliği oluşur (enfeksiyonun başlangıcından 3-9 hafta sonra). Aynı dönemde hücre aracılıklı immün yanıt da ortaya çıkar. Hücresel immünitenin bu iki yanıtının aynı mekanizmanın birbirine zıt iki ucunu mu gösterdiği, yoksa bu yanıtların birbirine paralel ve yakından ilişkili farklı süreçler mi olduğu henüz bilinmemektedir (77,80,81).

### 2.1.8.Patoloji

Tüberkülozda gözlenen patolojik değişimler büyük oranda yerel basil antijen konsantrasyonuna ve aşırı duyarlılık reaksiyonunun derecesine bağlıdır. Yerel antijen yükünün ya da doku hasarlayıcı immün yanıtın fazla olduğu durumlarda eksüdatif lezyonlar, antijen yükünün ve doku hasarlayıcı yanıtın az olduğu durumlarda proliferatif lezyonlar ortaya çıkar. Çoğu olguda bu iki lezyon tipinin bir arada olduğu karışık lezyonlar daha yaygındır. Yerel antijen yüküne göre lezyonlar ilerleyebilir, tip değiştirebilir, stabil kalabilir hatta gerileyebilir. Tek bir lezyonun bir kısmı ilerlerken diğer bir kısmı gerileyebilir.

Proliferatif veya prodüktif lezyonlar, tüberküloz granülasyon dokusu ile karakterizedir. Akciğerlerde lenfohematojen yayılım odaklarında oluşan ilk lezyonların yayılımını önlemek için konakçı tarafından bu lezyonların etrafına inaktif makrofajların toplanmasıyla tüberküloza özgü granülomlar (tüberküller) oluşturulur. Böylece lezyonlu bölge sağlam olan komşu dokudan ayrılarak hem basillerin çoğalması hem de yayılması önlenir. Burada merkezde yan yana dizilen makrofajlar ve bunları çevreleyen fibröz doku ve lenfositler bulunur. Zamanla makrofajlar epitelooid hücreye dönüşürken, iki veya daha fazla makrofajın birleşmesiyle Langhans tipi dev hücreler oluşur. Basillerin yok edilme gücüne bağlı olarak granülom merkezinde değişik büyüklükte kazeifikasyon nekrozu gelişebilir (yumuşak tüberkül) veya gelişmeyebilir(sert tüberkül). Tipik bir tüberkülden merkezde bulunan (veya bulunmayan) bir kazeifikasyon alanı, bunu çevreleyen epitelooid hücreler ve Langhans tipi dev hücrelere sahiptir. Daha dışta monosit ve lenfositler, en dışta da fibroblastlar bulunur. Epitelooid hücreler, mononükleer hücreler, fibroblastlardan oluşan bu üç tabakalı yapıya granülasyon dokusu denilir. Proliferatif lezyonların tipik örneği olan sert tüberküllerde bağ doku hücreleri de yer alır ve bu lezyonlar sıklıkla fibrozis veya skar gelişimi ile iyileşirler. Eğer lezyonlardaki basil yükü ve aşırı duyarlılık reaksiyonu fazla ise, kazeifikasyon nekrozu giderek genişleyecektir. Sonuçta ya genellikle birbirleriyle birleşen küçük, gevşek bir organizasyon gösteren, yumuşak tüberküller ortaya çıkacak (miliyer veya dissemine tüberküloz) ya da küçük ve geniş tüberküloz pnömonisi odakları gelişecektir. Oluşan bu eksüdatif lezyonlarda, gevşek bir durumda yerleşmiş lenfositler, makrofajlar ve granülositler görülürken, epitelooid hücreler ve dev hücreler ya seyrek olarak görülecek ya da hiç

görülmecektir. Bu lezyonlarda yaygın eksudasyon ve doku nekrozu olacak, eriyen doku nekrozları sonucunda kavite gelişecektir (79,80).

### **2.1.9.Tüberkülozda Semptomlar**

Tüberkülozda semptomlar tipik olarak sinsi bir başlangıç gösterir, erken dönemde hiçbir semptom vermeyebilir ve tesadüfen saptanabilir. Hastalık kronik seyirlidir ve haftalar aylar içinde semptomlar gelişir. En sık görülen genel semptomlar iştahsızlık, yorgunluk, kilo kaybı, öğleden sonra çıkan ateş ve gece terlemeleridir. Bu semptomlar yavaş gelişir ve hasta tarafından iyi tolere edilir ve genellikle önemsenmez. Solunum sistemi semptomları hastalığın ilerlediğini gösterir. En sık görülen semptom öksürüktür. Kaviteden hava yoluna materyal boşalması hafif bir öksürüğe yol açarken, bronşiyal tutulum gelişince öksürük şiddetlenir. Üç haftadan uzun öksürüğü olan hastalarda ve/veya hemoptizi olan hastalarda tüberkülozdan kuşkulunmalı ve gerekli tanısal incelemeler yapılmalıdır. Öksürükle beraber mukoid balgam görülebilir.

Tüberküloza bağlı özgün fizik muayene bulguları yok gibidir. Hasta soluktur, kilo kaybı nedeniyle zayıftır. Küçük hava yollarında meydana gelen kalıcı bozukluklar nedeniyle apekslerde öksürük sonrası raller duyulabilir. Daha geniş lezyonlarda konsolidasyona özgün bulgulara rastlanır. Plörezi ve plevral kalınlaşmaya ait bulgular olabilir. Yerel büyümüş lenf bezinin bronşa basısı sonucu wheezing duyulur. Yaygın lezyonlar varsa çomak parmak gelişebilir (148).

### **2.1.10.Tüberküloz Kliniği**

Tüm tüberküloz olgularının %80-90'ında hastalık akciğerlerde ortaya çıkar. Diğer organ tüberkülozlarının birçoğu da akciğerlerdeki tüberküloz enfeksiyonunu takiben meydana gelir. Akciğer dışı tüberküloz türlerinde bakteri sayısı akciğer tüberkülozuna göre daha az olmasına rağmen tutulum yerine göre ortaya çıkan hastalık ağır klinik sorunlara yol açabilmektedir. Tüberküloz hastalığının sık görüldüğü diğer organlar, lenfatik sistem, plevra santral sinir sistemi, genitoüriner sistem, kemikler ve eklemlerdir; ya da yaygın olarak tüm organları tutabilir ki buna milier tüberküloz ya da dissemine tüberküloz adı verilir. Semptom ve bulgular, tutulan organa göre değişim göstermektedir. Örneğin böbrek tüberkülozunda idrarda

kan, omurga tüberkülozunda sırt ağrısı, plevra tüberkülozunda yan ağrısı, omuz ağrısı olabilir. Akciğer tüberkülozu bulaştırıcılık nedeniyle tüberküloz türleri arasında halk sağlığı açısından en önemlisidir (81).

#### **2.1.10.1.Primer Tüberküloz**

Türkiye gibi tüberkülozun yaygın olduğu ülkelerde tüberküloz basili ile karşılaşmanın yaşamın erken yıllarında olması dolayısıyla primer tüberküloz daha çok çocukluk çağında izlenir ve çocuk tüberkülozu da denmektedir. Primer enfeksiyonu izleyen 5 yıl içinde tüberküloz gelişmesi primer tüberküloz, 5 yıldan sonra gelişen tüberküloz ise sekonder tüberküloz(erişkin tüberkülozu) olarak adlandırılabilir. İnfeksiyonun 0-4 yaş arasında alınması durumunda özellikle de yenidoğan döneminde hastalık gelişme riski yüksek olarak bildirilmiştir. Primer enfeksiyondan sonrası primer tüberküloz gelişme riskinin arttığı diğer iki dönem adolesan ve genç yetişkinlik dönemi ile yaşlılık dönemidir. En sık görülen semptomlar ateş, öksürük, kilo kaybı, gece terlemesidir (81).

#### **2.1.10.2.Sekonder tüberküloz:**

Primer enfeksiyon geçiren ve tüberkülin deri testi pozitifleşen kişilerde, enfeksiyondan en az beş yıl sonra, yaşamlarının her hangi bir döneminde gelişen tüberküloz, sekonder tüberküloz veya yetişkin tipi akciğer tüberkülozu olarak tanımlanır. Sekonder tüberküloz, en yaygın görülen akciğer tüberkülozu olup, hastalığı sağlam kişilere bulaştırmaktan sorumlu olduğu için halk sağlığı açısından büyük önem taşır. Bu tüberküloz şekli endojen reaktivasyonla veya ekzojen reinfeksiyonla gelişebilir. Yetişkin akciğer tüberkülozu konusunda hangi mekanizmanın belirleyici olduğu konusu tartışmalıdır (81).

##### **2.1.10.2.1.Endojen Reaktivasyon:**

Primer enfeksiyon sırasında lenfo-hematojen yolla akciğerlerden diğer organlara yayılan basiller, bu organların retikuloendotelial sisteminde tutulurlar ve yayılım odaklarında küçük tüberküller oluştururlar. Bu lezyonlardaki basiller belli bir sayıya ulaştığında aktive T lenfositleri lezyonlara girerek kazeifikasyon nekrozu oluştururlar ve yayılım odaklarının çoğu kontrol altına alınır ve yok edilir. Fakat oksijen parsiyel basıncının

yüksek olduğu kemik, böbrek, meninksler ve özellikle de akciğer apeksi gibi bazı organlarda geride kalan az sayıda basil, makrofajlar, kazeöz odaklar ve kalsifiye odaklarda canlılıklarını sürdürürler. Dormant basiller olarak tanımlanan, canlı fakat çoğalmayan bu basiller uzun yıllar buldukları odaklarda canlı kalırlar. Primer infeksiyondan sonra kapalı kazeöz odakların %50'sinde ve kalsifiye odakların %15'inde canlı basillerin bulunduğu gösterilmiştir. Geçirdikleri primer infeksiyon nedeniyle tüberkülin deri testleri pozitif olan bu kişilerde, yaşamlarının ilerleyen yıllarında stres, steroid tedavisi, kanser kemoterapisi veya AIDS infeksiyonu gibi hücrel immün yanıtta geçici supresyon yapan olaylar gelişmesi durumunda, yayılım odaklarındaki dormant basiller çoğalmaya başlarlar. Hücrel immün yanıtın tekrar düzelmesiyle bu odaklarda kazeöz nekroz ve erimeler oluşur. Bu olay akciğer dışı organ tüberkülozu ve kaviter akciğer tüberkülozu gelişimine neden olmaktadır. Apikal akciğer tüberkülozu meydana gelmesindeki bu süreç endojen reaktivasyon olarak tanımlanır (37).

**2.1.10.2.2.Ekzojen Reinfeksiyon:** Tüberkülin pozitif kişilerde, inhalasyonla aldıkları yeni basillerin oluşturduğu hastalık gelişim süreci ekzojen reinfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. Daha önce primer infeksiyonu geçirmiş ve tüberkülin deri testi pozitif olan eğer tüberküloz basili ile yeniden karşılaşılırsa, mevcut hücrel immünite bu basillerin alveole tekrar yerleşmesini büyük ölçüde önlemektedir, fakat bu koruma tam değildir. Eğer tüberküloz basilleriyle yeniden karşılaşma yoğun ve sıkça tekrarlanıyorsa basiller hava yoluyla geldikleri akciğer apeksine yerleşebilirler. Bu basiller düşük virulans özelliği gösterirler. Akciğer apeksine yerleşen bu basiller çoğalarak belli bir sayıya ulaşınca immün T lenfositler üzerinden lezyon bölgesine gelerek kazeifikasyon nekrozu oluştururlar. Böylece basilin büyük çoğunluğu yok edilirken az sayıda basil dormant konuma geçer. Daha sonra hücrel immünitenin zayıfladığı bir anda basiller tekrar çoğalmaya başlar ve aynen endojen reaktivasyonda olduğu gibi kaviter akciğer tüberkülozu gelişimine neden olurlar. Gelişmiş ülkelerde ekzojen reinfeksiyon çok küçük bir öneme sahiptir (AIDS'li hastalar gibi). Gelişmekte olan ülkelerde ise tüberküloz gelişiminde ekzojen reinfeksiyonun önemli rolü olduğuna inanılmaktadır.

### **2.1.10.3.Miliyer Tüberküloz**

Miliyer tüberküloz, primer infeksiyon sırasında ya da bundan uzun bir süre sonra tüberküloz basillerinin yoğun hematogen yayılımına bağlı olarak oluşmaktadır. Basilyemi miktarı ve konağın immün durumu bu yayılımın şiddetini belirlemektedir. Primer infeksiyon geçiren çocukların %1-3'ünde enfeksiyonun 3.-6. aylarında gelişmektedir. Genellikle sinsi başlayan hastalıkta kilo kaybı, iştahsızlık, hafif ateş gibi bulgular vardır. Birkaç hafta içinde çocukların %50-70'inde yaygın lenfadenopati ve hepatosplenomegali gelişir. Nadiren hastalık gürültülü başlar. Radyografide 3-4 hafta sonra akciğerin tüberküllerle dolduğu izlenir. Solunum sıkıntısı ve yaygın raller veya "wheezing" gelişebilir. Ciltte papülonekrotik tüberküller veya nodüller oluşabilir. Miliyer tüberkülozda birkaç hafta içinde menenjit tüberküloz gelişebilir. Miliyer tüberkülozlu hastaların %30'unda tüberkülin testi negatiftir. Karaciğer ve kemik iliği biyopsileri tanı koydurabilir. Kültür olguların %33'ünde tanı koydurmaktadır. İyileşme uygun tedavi ile yavaş olmaktadır.

### **2.1.10.4.Ekstrapulmoner Tüberkülozlar**

Ekstrapulmoner tüberküloz lenfohematojen yayılım veya direkt invazyonu sonucu gelişebilir. Bir de yüksek derecede infeksiyöz partiküller içeren solunum yolları sekresyonlarının sindirim kanalına yayılması sonucu infeksiyon gelişebilir ki bu üçüncü yola intracanalicular yayılım denmektedir. Birçok organı tutabilir ve özgün olmayan semptomlara neden olarak bir çok hastalıkla karışabilir. Tüm tüberküloz olgularının %85'i pulmoner tüberküloz, geri kalan %15'ini tüm ekstra pulmoner tüberküloz olguları oluşturmaktadır.

Ekstrapulmoner tüberkülozların dağılımı ise şu şekildedir: Lenf nodu tüberkülozu %28, Plevral tüberküloz %22, Genitoüriner tüberküloz %15, Kemik eklem tüberkülozu %9, Miliyer tüberküloz %9, Meninks tüberkülozu %4, Periton tüberkülozu %4, Diğer formları %9 şeklinde bir dağılıma sahiptir (148).

#### **2.1.10.4.1.Tüberküloz Lenfadenit**

"Scrofula" olarak da isimlendirilir. Yaklaşık 3000 yıl önce tanımlanmıştır. En sık rastlanan ekstrapulmoner tüberküloz formudur. Hastalık primer pulmoner

odaktan hematojen yayılan tüberküloz basilleriyle meydana gelmektedir. En sık tutulan lenf nodları anterior servikal ve supraklaviküler lenf nodlarıdır (1,2,3).

#### **2.1.10.4.2.Plevra Tüberkülozu**

Ekstrapulmoner tüberkülozların en sık rastlanan ikinci klinik şeklidir. Effüzyon sıklıkla primer parankimal odağın bulunduğu taraftadır. Nadir olarak hematojen yayılıma bağlı olarak bilateral effüzyon şeklinde görülür. Plevral boşlukta toplanan sıvı %98 oranında plevral membranın spesifik allerjik reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Halsizlik, iştahsızlık, kilo alamama, gibi belirtilerin yanı sıra effüzyonun derecesine bağlı olarak göğüs ağrısı ve dispne en sık görülen semptomlardır. Fizik incelemede tutulan alanda solunum seslerinde azalma ve kaybolma oluşur (148).

#### **2.1.10.4.3.Genitoüriner Tüberküloz**

Basilin uzak bir odaktan hematojen yayılımı ile oluşmaktadır. Genellikle her iki böbrek de infektidir. Fakat yalnız birinde hastalığın ilerlediği kabul edilmektedir. İlk lezyon kortikomeduller birleşme yerinde olur. Hipertonik olması nedeniyle immün mekanizmaların etkin olmadığı medulla bölgesi infeksiyonun yerleşmesine uygun bir ortamı oluşturur. Alt üriner infeksiyon kaçınılmazdır. Prostat, vezikoseminalis, vas deferens, epididim, testis, fallop tüpleri, vagina, over ve üretra da infeksiyona katılabilir. Hastalık sinsi gidişatlı olup olguların çoğu asemptomatiktir. Noktüri, pollakiüri, hematüri, ve steril piyüri görülebilir. Üç gün sabah ilk idrarın incelenmesi ile olguların %90 ında pozitif sonuç alınabilmektedir.

#### **2.1.10.4.4.İskelet Sistemi Tüberkülozu**

Hematojen yayılımla vertebra cisminin ön kısmına veya uzun kemiklerin metafizlerine yayılım sonucu oluşur. Siyah ırkta daha fazla görülür. Sinsi bir hastalık olan osteoartiküler tüberkülozda ağrı en erken ortaya çıkan bulgudur. Tutulan alandaki lokal iltihabi bulguları haftalar hatta aylar sonra radyolojik değişimler izler (81).



#### **2.1.10.4.5.Tüberküloz Perikardit**

Genellikle komşu lenf bezlerinden direkt yayılım ile ortaya çıkmaktadır. En sık geçiş yol mediastinal lenf bezleridir. Başlangıcı genellikle sinsi olmaktadır. Klinik olarak öksürük, göğüs ağrısı, kilo kaybı ve ateş gözlenir. Göğüs ağrısı ve ateş giderek artabilir. Ayak bileğinde ödem, gece terlemesi, efor kapasitesinde azalma, karında distansiyon eşlik eden bulgulardır. Fizik incelemede ateş, hepatomegali, taşikardi, ayak bileğinde ödem, paradoksal nabız, perikardiyal sürtünme sesi, disritmi, siyanoz gibi bulgular görülür. Ölüm genellikle tamponad sonucu olmaktadır. Geç sekeli konstrüktif perikardittir (81).

#### **2.1.10.4.6.Tüberküloz Menenjit**

Tüberkülozun en ağır klinik formudur. Her yaşta görülebilir de özellikle 5 yaş altında siktir. Primer infeksiyonun erken veya geç komplikasyonu olarak gelişir. Primer infeksiyonda ki basil hematojen yolla basil meninkslere ulaşmaktadır. Tüberküloz menenjitte basiller daha çok beynin bazal yüzünde bulunan meninkslere tutmaktadır. Konveks kısmı pek etkilemez. Kalın bir eksüda intrapedinküler ve pontin sisternaları dolaşır. Halsizlik, depresyon, konfüzyon, kişilik değişiklikleri ile başlayabilir. Meninks irritasyon belirtilerinin başlaması ile oluşan baş ağrısı ve kusma, hastanın en önemli şikayetlerini oluşturur. Değişik derecede ateş, ense sertliği, Kernig ve Brudzinski işaretleri pozitifleşir. %20-30 kranial sinir tutulumu vardır. En sık tutulan sinir altıncı sinir olup bunu üç ve dördüncü kranial sinirler izlemektedir. Paralizi tek veya çift taraflı olabilir. Tanı için BOS incelemesi esastır. Hücre artışı genelde 500 mm<sup>3</sup> civarında ve çoğunluğunu lenfositler oluşturmaktadır. Protein seviyesi artar, şeker seviyesi düşer. BOS sedimentinin ARB boyanmasıyla %10-40 arasında pozitiflik elde edilir. Ard arda dört BOS örneğinin incelenmesi ile ARB pozitifliği %87 'ye ulaşabileceği bildirilmiştir. Kesin tanı BOS kültüründe tüberküloz basilinin üretilmesi ile konulur (1,2).

#### **2.1.11.Tüberkülozda Tanı**

Klinik, radyolojik ve/veya histolojik bulgularla bir hastada tüberkülozdan şüphelenilebilir. Fakat hastalığın kesin tanısı yalnızca klinik örneklerden tüberküloz basilinin gösterilmesi ile konabilir. Mikobakteriyoloji laboratuvarının tüberküloz tanı

ve tedavisine katkısı, mikobakterilerin saptanması, ve izolasyonu, mikobakteri türlerinin tür tayini, ve üretilen basillerin tüberküloz ilaçlarına karşı duyarlılığını saptamayı içerir. Bunun için de incelenen örneğin (balgam, bronş lavajı, BAL, plevra sıvısı, kan, idrar, BOS vb) uygun şekilde elde edilmesi ve yine uygun şekilde laboratuara gönderilmesi, gönderilen örneğin laboratuarda organik atıklardan temizlenmesi, yayma ve kültürünün yapılması, üretilen basilin biyokimyasal veya diğer yöntemlerle tip tayininin yapılması ve son olarak antibiyotiklere direnç özelliklerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Tüm bu süreç 2-8 haftayı almaktadır. Tüberküloz tanısında son 100 yıldır kullanılan geleneksel bakteriyolojik yöntemler yerine, daha hızlı, daha duyarlı yeni tanı yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır. Radyometrik sistemin kullanımı, klinik örneklerden mikobakteri saptanması ve tip tayini için gereken süreyi önemli oranda kısaltmıştır. DNA problemleri basilin izolasyonundan sonra tip tayini için gereken süreyi 4-6 hafta kısaltabilir. Halen kullanılmakta ve araştırılmakta olan bir çok kromatografik yöntem, polimeraz zincir reaksiyonu, immünolojik ve serolojik yöntemler, hibridizasyon metodları ümit verici yöntemler olarak görülmektedir. Günümüzde hızlı tanı yöntemlerinin gerekliliği tartışılmaz. Fakat bu yöntemlerin çoğu henüz araştırma aşamasındadır. Gelişmekte olan ülkelerde rutin kullanıma girebilmeleri için hem duyarlı hem de özgül olduklarının kanıtlanması, hem de maliyetlerinin düşük olması gerekmektedir. TB hastalığında hastalığın ayırıcı tanısı açısından fiziksel de muayene gereklidir. Ancak akciğer tüberkülozunda genellikle belirgin bir fiziksel muayene yoktur. Hastalık ilerleyene kadar minimal ek sesler duyulur. Plevra sıvısı ya da plevra kalınlaşması bulguları olabilir. Hepatomegali, splenomegali erişkin tip tüberkülozda nadir olarak görülür. Uzun süren hastalıklarda çomak parmak olabilir. Öksürük akciğer tüberkülozunun en sık rastlanan, ayrıca en önemli semptomudur. Önemi, her öksürükle etrafa çok sayıda basil içeren damlacığın yayılmasından gelmektedir. Bu nedenle üç haftadan uzun süren öksürük yakınması olan hastalarda, mutlaka tüberküloz araştırılmalıdır. Öksürük başlangıçta balgam ile birlikte olmazken, dokuda inflamasyon ve nekrozun ilerlemesiyle birlikte, balgam da eşlik etmeye başlarken hastalığın tanısında balgam muayenesi en önemli araçtır. Halsizlik, çabuk yorulma, iştahsızlık, kilo kaybı, çocuklarda kilo almada duraklama, ateş, gece terlemesi tüberkülozlu hastalarda görülen genel bulgular arasındadır. Ateş genel

olarak intermittandır; sabahları yoktur, öğleden sonra ürperek yükselir, gece terleyerek düşer (1,2,3,81).

Akciğer tüberkülozunda akciğer filmi hemen daima bulgu vermekle birlikte, yalnızca radyoloji ile de tüberküloz tanısı konulamaz. Akciğer radyolojisinde, lezyonlar tüberkülozu düşündürebilir; fakat tüberkülozda görülen lezyonlar başka bir çok hastalıkta da vardır. Akciğer filmlerinin aktif TB tanısında duyarlılığı%70-80 dir.Özgüllük (spesifite) ise nispeten daha azdır,%60-70 dir. Endobronşiyel tüberküloz ve HIV pozitifliği ile birlikte olan tüberkülozda film normal görülebilir. Akciğer grafilerinin değerlendirilmesinde, filmin uygun teknikle çekilmiş olmasına, akciğer filmini okumadan önce film kalitesinin değerlendirilmesine çok dikkat etmek gerekir. Filme ait teknik sorunlar yanlış okumalara neden olabilir. Filmin dansitesi iyi olmalı, simetrik çekilmeli, akciğerleri içermelidir. Filmin kalitesi değerlendirmeye engel ise tekrar çekilmelidir. Grafilerin değerlendirilmesindeki bir diğer sorun ise okuyucular arasındaki farklı değerlendirmelerdir. Kavite darlığı, lenfadenopati ve aktif hastalık olup olmadığı konularında okuyucular arasında uyum azdır (81).

#### **2.1.11.1.Uygun Örnek Alma Esasları**

Tüberkülozun değişik organ sistem tutulumları ile seyredebilme özelliği nedeniyle tanıda balgam, gastrik aspirasyon sıvısı, BAL, akciğer dokusu, plevral sıvı ve biyopsi örneği, lenf nodu, kemik iliği, karaciğer, peritoneal sıvı, idrar, dışkı, BOS ve kan gibi çeşitli klinik örnekler kullanılabilir. Örneklerin steril ağız kapaklı kaplara uygun koşullarda alınması ve en kısa zamanda laboratuara ulaştırılması doğru tanı için önem taşıyan ilk basamağı oluşturur (81).

#### **2.1.11.2.Tüberkülin Deri Testi**

M. tuberculosis ile oluşan infeksiyonu göstermede kullanılan tüberkülin deri testleri geleneksel bir yöntem olmakla birlikte %100 duyarlı ve özgün değildir. Tüberkülozda primer infeksiyonun 2-3. haftasından sonra gelişen immün yanıt tüberkülin adı verilen basil antijenlerine karşı gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonunun gelişmesine yol açmaktadır (81). Tüberkülin deri testi immüniteyi değil aşırı duyarlılık reaksiyonunun derecesini göstermektedir. Bu nedenle de pozitif

test sonucu hastalığın varlığını değil yalnızca kişinin tüberküloz basili ile önceden karşılaştığını ve infekte olduğunu gösterir. Günümüzde tüberkülin testlerinde en sık PPD kullanılır. Deriye tüberkülin enjeksiyonu lenfositleri uyarır ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtına yol açan olayları aktifler. Deri reaksiyonu antijen verilen bölgede vazodilatasyon, ödem ve mononükleer hücre infiltrasyonundan oluşur (24, 149,54). İnflamasyon 1-4 günlük peryod boyunca artar. Kişi; ilk kez test ediliyorsa, reaksiyon daha yavaştır ve en yüksek seviyeye 72 saat sonra ulaşır. Hücresel infiltrasyon veya endürasyon alanı gecikmiş tip aşırı duyarlılık aktivitesini yansıtır. Enjeksiyon yapılan yerde inflamasyon nedeniyle eritem de oluşmaktadır. Ancak eritem, vazodilatasyon ve kapiller konjesyon nedeniyle oluştuğu için tek başına pozitif yanıt anlamına gelmez (35).

### **2.1.11.3.Boyama ve Mikroskopik İnceleme**

Balgam incelemesi en kolay, en ucuz, en sık kullanılan ve tanısal değeri oldukça yüksek bir yöntemidir. Boyanmış yayma preparatların mikroskopla incelenmesi, aside dirençli bakteri (ARB) aranmasında ilk aşamadır. Yaymada ARB saptanması, klinik örnekte mikobakteri varlığını gösteren ilk bakteriyolojik kanıttır. Günümüzde halen balgam ve diğer klinik örneklerden yayma ile ARB aranması ve bunun kültür ile doğrulanması tüberküloz teşhisinde altın standarttır. Nekrotik kanla karışık partikülleri içeren balgamın doğrudan yayılması veya klinik örneğin işlenmesi ve santrifüje edilmesinden elde edilen çökeltinin lama yayılması (teksif) ile yayma preparatlar elde edilir. Hazırlanan yaymaların aside dirençli boyalarla boyanmasında E. Z. N (Ehrlich-Ziehl-Neelsen), Kinyoun ve Auramin-rhodamine gibi boyalar kullanılmaktadır. Türkiye'de bu amaçla yaygın olarak EZN boyama kullanılmaktadır. Burada Ziehl Neelsen ile boyamadan sonra yayma preparatta ışık mikroskobunda immersiyon objektifinde incelenmektedir. Karşı boya olarak metilen mavisi kullanıldığında aside dirençli basiller mavi zeminde pembe-kırmızı ince çubuklar halinde görülmektedir. Her gün çok sayıda yayma incelemesi yapan laboratuarlarda floresans mikroskobu kullanılmaktadır. Florokrom boyamalarda yaymalar, daha kolay ve hızlı olarak taranabilmektedir. Auramin boyasıyla boyanan preparat floresans mikroskopta 25 veya 40 büyütmede incelenir. Aside dirençli bakteriler siyah zeminde parlak sarı renkte görülür. Hangi boyama yöntemi

kullanılırsa kullanılsın yaymada gözlenen aside dirençli basil (ARB) sayısı rakamsal olarak rapor edilmelidir. Bu durum hem tedavi öncesi hastalığın ağırlığını ve basil yükünü tayinde hem de hastanın tedaviye verdiği yanıtı değerlendirmede önemlidir. Balgam yaymasının ARB pozitif olması için her iki boyama yönteminde de balgamın mililitresinde en az 5-10 bin basil bulunmalıdır. O nedenle balgam yayması pozitif olan hastalar bulaştırıcı özelliği en fazla olan hastalar olarak kabul edilmektedir. Balgam örneklerinin yoğunlaştırıldıktan sonra incelenmesinin testin pozitif prediktif değerini arttırdığı değişik kaynaklarda bildirilmiştir. Bu amaçla çok değişik yöntemler tarif edilmiştir. Bu yöntemlerden bazıları asetilsistein, sodyum hidroksit, zefiran trisodyum fosfat yöntemleri gibi çeşitli yöntemler tarif edilmiştir. Yine kültür yapamayan fakat balgamı yoğunlaştırmak isteyen laboratuvarlar için çamaşır suyu (%5 sodyumhipoklorit) kullanarak yoğunlaştırma yapılması tavsiye edilmiştir (81).

#### **2.1.11.4.Kültür**

Mikobakterium türlerine bağlı infeksiyonların mikrobiyolojik tansında kültürün mutlak bir yeri vardır. Bunun nedeni, direkt mikroskopiden daha duyarlı olması, tür tayini ile antimikrobiyal duyarlılık testlerine olanak sağlamasıdır. Bu yöntemin duyarlılığı %76, özgüllüğü %100'dür. Uzun süreli inkübasyon gerektirmesi en önemli olumsuz özelliği olmakla birlikte, henüz gelişmekte olan testlerin güvenilirlikleri de kültür sonuçlarıyla karşılaştırılarak değerlendirilmektedir. Mikobakterium türlerinin izolasyonunda kullanılmakta olan bir çok besiyeri vardır. Bu besiyerleri genellikle üç grupta toplanır. BCG aşısı hazırlamakta kullanılan ve sentetik besiyerleri olarak adlandırılan Long, Sauton, Beck, Proskauer besiyerleri, muayene maddelerinden ilk izolasyonu sağlamak için kullanılan organik madde içeren yumurtalı besiyerleri ki bunlardan en sık kullanılanları Lowenstein-Jensen (LJ), Petragnani, Trudeau, Dorset besiyerleridir, ve agarlı besiyeri olarak da şeffaf olduklarından temel olarak antibiyotik direncinin belirlenmesinde kullanılan yarı sentetik besiyerleridir, Dubos, Kirschner, Middlebrook besiyerleri gibi.

Klasik kültür yöntemleriyle mikobakterinin üretilmesi ve biyokimyasal testlerle tür düzeyinde tanınması için gereken süre ortalama 34 gündür. Direnç testleri için gereken 2-3 haftalık süre de eklendiğinde kesin sonuç ortalama olarak

sekiz haftada verilebilir. Oysa çoğul ilaç dirençli tüberküloz sorunu nedeniyle, isimlendirme ve direnç sonuçlarını bir an önce verecek hızlı testlere gerek vardır. CDC bu işlemler için gereken sürenin üç hafta olması gerektiğini belirtmiştir. Bu nedenle tüberküloz tanısında son 100 yıldır kullanılan geleneksel bakteriyolojik yöntemler yerine daha hızlı, daha duyarlı yeni tanı yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır. Bakteriyolojik bir yöntem olan BACTEC, mikobakteri üreme inkübatör tüpü, haberci mikobacteriofaj yöntemi adıyla bilinen Lusiferaz testi, mikroorganizmaların varlığını saptamak amacıyla DNA sıralarını kullanan Polimeraz zincir reaksiyonu bu yöntemlerden bazılarıdır.

#### **2.1.11.5.PCR**

PCR; Örneklerden mikobakteriyi direkt olarak belirleyen bir DNA amplifikasyon testidir (23,47). Bu teknikte pozitif sonuç için örnek en az 10 mikobakteriyi içermelidir. İstenilen DNA parçaları çoğaltıldıktan sonra DNA elektroforezi ile gösterilir. Referans laboratuvarlar arasında testin verimliliği değişkenlik gösterir. Çocuklarda PCR'ın kullanımı sınırlıdır. Pahalı olmasının yanı sıra laboratuvarlarda kontaminasyon ile yanlış pozitif sonuçlar da verebilmektedir. Klinik veya epidemiyolojik olarak kolay tanı konamayan belirgin akciğer hastalığı olan çocuklarda, immun yetmezlikli hastalarda ve ekstrapulmoner tüberkülozda faydalı olabileceği düşünülmektedir (8,37,43,49).

#### **2.1.11.6.DNA'nın Parmak İzi (DNA finger printing)**

Bu amaçla RFLP (Restricted Fragment-Length Polymorphism) yöntemi kullanılır. Özgül enzimlerle DNA belli bölgelerden kesilerek mikobakteri DNA'sı saptanması ve tiplendirilmesi mümkün olmaktadır (43).

#### **2.1.11.7.Seroloji**

M.Tuberculosis'e karşı oluşan antikorları saptamak için en sık ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testleri uygulanmıştır. Çalışmalarda; PPD, AGO, 5,6,5T, lipoarabinomannan gibi antijenlere karşı oluşan antikorlar aranmaktadır. Çocuklarda yapılan çalışmalarda testin duyarlılığı ve özgüllüğü ile

ilgili çok farklı sonuçlar alınmıştır. Bu yüzden tanı için henüz bir standardizasyon ve geçerliliğe sahip olmadıkları düşünülmektedir (50,51,52).

### **2.1.12.Korunma**

M.tuberculosis enfeksiyonunun sonlandırılması infekte makrofajlar ile T lenfositleri arasındaki ilişkinin başarısına bağlıdır. Primer veya sekonder bağışıklık yetmezliklerinde ve özellikle AIDS'te tüberkülozda hücrel immunitenin önemi açıkça gösterilmiştir. Basil antijenleriyle uyarılma sonrasında esas olarak  $\gamma$ -interferon( $\gamma$ -IFN) olmak üzere CD4+T hücreleri sitokinler salarak koruyuculuk oluşturur. CD8+ T hücreleri ve diğer T hücre alt grupları da sitokinler salarak veya infekte hücreleri eriterek savunmada katkıda bulunur. T hücre cevabı ağırlıklı olarak antijen özgüdür. Kazanılmış T hücre cevabı ağırlıklı olarak MHC ile ilişkilidir ve MHC polimorfizmi hastalık duyarlılığı ve sonuçları arasında farklılık olmasından sorumludur. T hücrelerinin fonksiyonel çeşitliliği de farklılıkla ilişkili olabilir. Mikobakteriyel enfeksiyonlarda Th1 yanıtı koruyucu bağışıklık için esastır. Nitekim  $\gamma$ -IFN geni çalışmasına engel olunmuş fareler M.tuberculosis enfeksiyonuna oldukça duyarlıdır ve  $\gamma$ -IFN reseptörü olmayan kişilerde tekrarlayan ve bazen öldürücü mikobakteri enfeksiyonları gelişir. Th2 tipi sitokinler (IL-4)  $\gamma$ -IFN uyarımını ve makrofaj aktivasyonunu in vitro inhibe eder; buna göre konak yanıtını zayıflatabilir. Tüberküloz hastalarında Th2 tipi sitokinlerde artış saptanmıştır. Bu konu henüz tam netleşmemiş olup daha ayrıntılı bilgilere ihtiyaç vardır (33,35,36).

### **2.1.13.Tüberküloz da Tedavi**

Tüberküloz uzun süreli tedavi gerektiren, kompleks ve toplum sağlığını yakından ilgilendiren bir hastalıktır. Genelde tüberkülozlu hastaların sosyoekonomik şartlarının düşük toplumlarda olduğu da bir diğer gerçektir. Bu şartlar altında tüberkülozlu hastaları başarılı bir şekilde tedavi etmek için bu konuda iyi eğitim almış, sorunun uzun vadede çözümü olduğuna inanan, hastaların devamlı takibini yapabilecek ve sadece tüberküloz ile ilgilenen hekimler ve yardımcı personele ihtiyaç vardır. Tüberküloz muayene hekimliği şartlarında takip ve tedavi edilebilecek bir hastalık değildir. Tüberküloz ilaçlarına direnç gelişiminde bir diğer önemli faktörün yanlış tedavi uygulamaları olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir.

Bunlardan en sık yapılan hatalar sıralanacak olursa tedaviye tek ilaçla başlamak, dirençli bir tüberküloz olgusuna veya direnç düşünerek tek ilaç ilave etmek (ekleme sendromu =addition sendromu), ikinci seçenek ilaçlarla tedaviye başlamak, ilaçların uygun olmayan doz ve sürede verilmesi, dirençli olduğu halde o ilaçla tedavi etmek, yetersiz takip ve her ay yapılmayan hasta ziyareti sayılabilecek belli başlı hatalardır. 1950'den önce tüberküloz için etkin bir tedavi bulunmamaktaydı. Akciğer tüberkülozlu olguların yaklaşık %50'si 2 yıl içinde ölmekte, ¼'ü iyileşmekte kalan ¼'ü ise kronik hastalıkları ile yaşamlarını sürdürmekte idi. Bu dönemde uygulanan sanatoryum tedavisi ilerlemiş olgulara etkisizdi. 1950'lerin ortalarında hastaların ilaç tedavisi ile hemen tamamı tedavi edilebilir hale gelmiştir. Günümüzde eğer hastaya doğru bir tedavi şeması önerilir ve hasta da bu şemayı uygun bir şekilde uygularsa hemen tüm hastalar tedavi edilebilir hale gelmektedir. Tedavinin başarılı olabilmesi için gerekli en önemli faktörlerin başında tedaviye uyum gelir. Hastanın tedaviye uyumu yakından izlenmelidir. Tüberküloz tedavisinde intrasellüler ve ekstrasellüler yerleşimli basillerin yok edilmesi, ilaca rezistan suşların gelişiminin önlenmesi için kombine ilaç tedavisi uygulanır. En önemli bakterisidal ilaçlar: izoniazid (INH) ve rifampisin'dir (RIF). Pirazinamid (PZA) makrofaj içi basillerin öldürülmesine katkıda bulunurken; streptomisin (SM) açık kaviteleredeki basillere karşı etkilidir. Etambutol, etiyonamid, para aminosalisilik asit gibi ilaçlar ise bakteriyostatik olarak etki göstermektedir (56). BCG aşısı dünyada 170 kadar ülkede uygulanıyor olmasına karşın, aşının etkinliği konusunda çok farklı sonuçlar bildiren çalışmalar vardır. Çok sayıda çalışmayı kapsayan bir meta-analizde BCG aşısının tüberkülozdan ölüme karşı % 71, disemine hastalığa karşı % 78, menenjitte karşı ise % 64 koruyucu olduğu saptanmıştır. Akciğer hastalığından koruyuculuğun ise % 50 civarında olduğu bildirilmektedir (67).

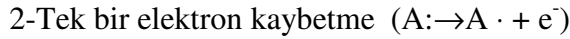
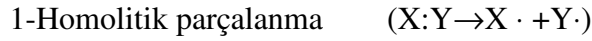
## **2.2.Serbest Radikaller**

Atomlardaki elektronlar orbital denilen bölgelerin içinde yer alır. Her orbital birbirine zıt yönde yerleşimli en fazla iki elektron içerebilir. Serbest radikaller ise en dış orbitalinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan kısa ömürlü bileşiklerdir. Bu nedenle kararsız bir yapı özelliği gösteren serbest radikaller diğer organik ve inorganik moleküllerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahiptirler.



Elektronlar orbitallerde çiftler halinde bulunurken daha stabil olduklarından, radikaller genel olarak non-radikallere göre daha aktiftirler ancak aktivitelerinde kayda değer farklılıklar vardır. Eğer iki radikal karşılaşırsa çiftleşmemiş elektronları ( $\cdot$  ile sembolize edilir) birleşir ve paylaşılan bir çift elektronla kovalent bir bağ oluşur. Tek çiftleşmemiş elektronu bulunan hidrojen atomu radikalidir ve hidrojen atomunun iki tanesi kolaylıkla diatomik hidrojen molekülünü meydana getirir ( $H\cdot + H\cdot \rightarrow H_2$ ) (127,133).

Radikaller radikal olmayan bileşiklerle çeşitli şekillerde reaksiyona girebilirler. Bir radikal elektronunu non-radikale devredebilir (redükten radikal), veya bir molekülden elektronunu çift oluşturmak üzere alabilir (oksidan radikal). Bir radikal bir başka non-radikale de katılabilir. Bu üç reaksiyondan hangisi gerçekleşirse gerçekleşsin, non-radikal türler bir radikale dönüşür. Serbest radikallerle non-radikal reaksiyonlarının bir özelliği de zincir reaksiyonu oluşturma eğilimidir, bir serbest radikal diğerini oluşturur (120,129). Kararlı bir molekül üç yolla serbest radikal halini almaktadır:



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn$  ve  $Mo$  gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat, bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (133).

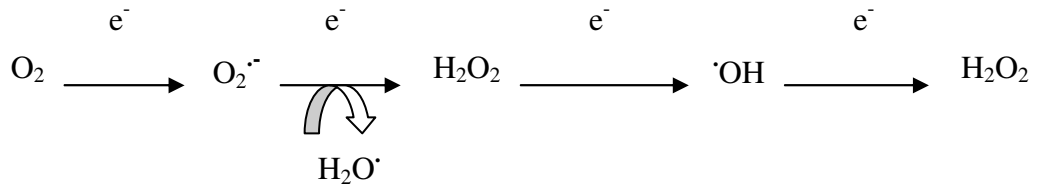
### 2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri (ROS) biyolojide genel bir terim olarak kullanılır. Sadece oksijen merkezli serbest radikalleri ( $OH\cdot$ ,  $O_2\cdot$  gibi) değil aynı zamanda radikal olmayan toksik oksijen türlerini de ( $H_2O_2$ ,  $HOCl$ , Singlet  $O_2$  gibi) içine alır. Oksijen, canlıların hayatlarını devam ettirebilmesi için mutlak gerekli bir elementtir. Çünkü oksijenin yapısal ve fonksiyonel olmak üzere iki görevi vardır. Organizmayı oluşturan moleküllerin yapısında bulunduğu gibi besin kaynağı olan maddelerinde

yapısında bulunan başlıca elementlerden birisidir. Oksijenin diğer bir görevi fonksiyoneldir ve aerobik canlılar için hayati önemi vardır. Çünkü oksijen oksidasyon tepkimeleriyle solunum sisteminde rol alır. Elektron Transport Zincirinde (ETZ) oksijen son elektron akseptörü olarak kullanılmaktadır.

Aerobik organizmalarda serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Oksijen moleküllerinin %95-99'u oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondrial stokrom oksidazları ile 4 e<sup>-</sup> olarak suya dönüştürülmekte ve sonuçta ATP elde edilmektedir. Fakat bu süreçte oksijenin % 1-3 kadarı tam olarak suya dönüşmez ve hidroksil radikali ile süperoksit anyon radikali meydana gelir.

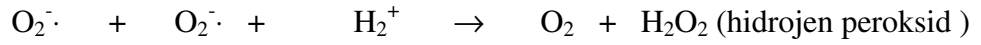
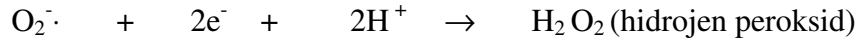
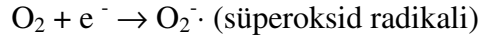
İnsan vücudunda oluşan radikallerin büyük bir kısmı oksijenden türemektedir. Zira oksijen elektronlarının ikisi eşleşmemiş şekilde dağılmıştır. Bu yüzden oksijen “diradikal” olarak değerlendirilmektedir. Oksijen bu özelliğinden dolayı diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilir (128).



**Şekil 1 :**Oksijenin normal metabolizması sonucu oluşan radikaller

### 2.2.1.1.Süperoksid radikali

Redükthan ve orta derecede oksidandır. Süperoksid bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermemesine rağmen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumuna kaynaklık etmesi ve geçiş metal iyonlarının redükthanı olması nedeniyle zararlıdır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, membran lipidlerinde lipid peroksidasyona, süperoksid dismutazın inaktivasyonuna, DNA hasarına neden olmaktadır (3,21,31). O<sub>2</sub><sup>·-</sup>'nin yarı ömrü uzundur ve lipofilik özellik taşımasından dolayı uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmektedir. O<sub>2</sub><sup>·-</sup> daha sonra spontan veya enzimatik (süperoksid dismutaz, SOD) olarak dismutasyona uğrayabilir (116,135,136).



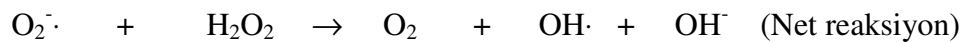
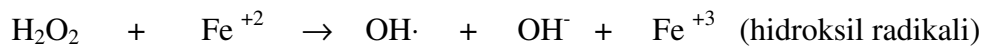
**Tablo1:** Aerobik metabolizması olan canlılarda oksijen kaynaklı reaktif oksijen türleri yukarıdaki tabloda verilmiştir.

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil (OH $\cdot$ )	Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Süperoksit (O <sub>2</sub> $\cdot$ <sup>-</sup> )	Singlet oksijen (1O <sub>2</sub> )
Nitrik oksit (NO $\cdot$ )	Peroksinitrit (ONOO <sup>-</sup> )
Azotdioksit (NO <sub>2</sub> $\cdot$ )	Ozon (O <sub>3</sub> )
Alkoksil (RO $\cdot$ )	Hipoklorid asit (HOCl)
Peroksil (ROO $\cdot$ )	Lipid peroksit (LOOH)

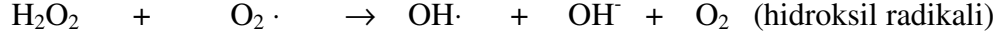
### 2.2.1.2.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen Peroksid)

Mitokondrial membranlar, peroksizomal mebranlar ve plazma membranından kolayca difüze olarak, toksik etkisini açığa çıktığı noktadan daha uzak hücre bölümlerinde gösterebilir ve molekül yüksüz kovalent yapıya sahiptir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eşleşmemiş e<sup>-</sup> olmadığı için aslında bir radikal değildir ancak süperoksid radikali veya Fe gibi geçiş metalleri ile reaksiyona girerek hidroksil radikalinin oluşmasına neden olarak toksik etki gösterebilir. Bu dönüşümler Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak bilinmektedir.

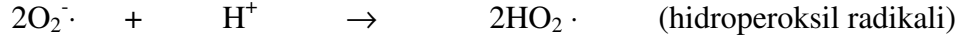
#### Fenton reaksiyonu:



## Haber-Weiss reaksiyonu



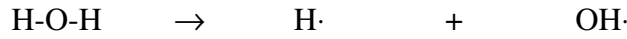
İleri derecede reaktif bir radikal olan hidroksilin biyomoleküllerle reaksiyonu, hidrojen eklenmesi veya çıkartılması yada e<sup>-</sup> transferi şeklinde olur. Hidroksilin özellikle membranlar üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Membran lipidlerin yapısına girerek membran harabiyetine neden olmaktadır. Hidroksilin DNA üzerindeki etkileri mutajenik ve onkojenik olabilmektedir.



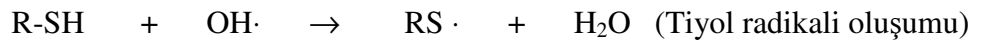
O<sub>2</sub> · nin protonlanmasıyla da hidroperoksil ( HO<sub>2</sub> · ) radikali oluşur. Bu radikalın herhangi bir biyolojik sistemde sitotoksik rolü kanıtlanmamasına rağmen, biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleriyle direkt etkileşime girebilmesi yönünden önemlidir (123,136,119).

### 2.2.1.3.Hidroksil Radikali

Hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesi ile (Fenton reaksiyonu) oluşur. Suyun yüksek enerjili iyonizasyonundan oluşan gerçek üründür.

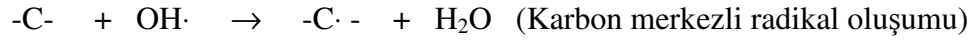


Bu radikallerden biri hidrojen (H<sup>·</sup>) ve diğeri ise hidroksil (OH<sup>·</sup>) radikalidir. Hidroksil radikalleri en reaktif radikal olarak bilinir ve OH<sup>·</sup> her moleküle hücum ederek hasar meydana getirir. Oldukça reaktif OH<sup>·</sup> 'nin biyolojik moleküllerle reaksiyonu nonradikal bir tepkimedir. OH<sup>·</sup> Reaksiyonları DNA'nın pürin ve pirimidin bazıları ile etkileşir, ayrıca tiol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu çıkarabilir. Örneğin;



Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O<sub>2</sub> ile kombine olabilir ve oksijen sülfür radikallerini oluşturur. RSO<sub>2</sub><sup>-</sup> ve RSO<sup>·</sup> gibi bunların birçoğu da biyolojik moleküllerde hasara neden olurlar (örneğin bazı proteinlerde hasar oluşturma özelliği gibi).

Hidroksil radikali, biyolojik moleküllere saldırabilen çok agresiv oksidan bir ajandır. Tiyol ve karbon içeren moleküllerden hidrojen atomu kopararak su oluşturmak üzere tiyol radikalleri ve karbon merkezli radikallerin oluşumuna neden olurlar. Yarı ömrü kısa olmakla birlikte, aşırı reaktif olması nedeniyle çok yüksek doku hasarları oluşturur. Hidroksil radikalının suya indirgenmesi büyük enerji açığı oluşturur ve yarı ömürleri uzun, daha kararlı, daha az reaktif bileşimlerin oluşmasına neden olur. OH' ın sebep olduğu en iyi karakterize edilmiş olan biyolojik hasar lipid peroksidasyon olayıdır. OH', membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle araşidonik asitleri gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinin karbon atomunun birinden H atomunu çıkartır ve sonuçta su oluşumunu sağlar (111,121).



#### **2.2.1.4.Singlet Oksijen**

Ortaklanmamış bir elektron içermediği için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Moleküler oksijenden serbest radikal reaksiyonları ile oluşur ve serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Hipoklöröz asid ve hidrojen peroksidin reaksiyonu ile de üretilebilir. Patofizyolojik önemi hala tartışmalıdır (122).

#### **2.2.1.5.Nitrik Oksit ve Türevleri**

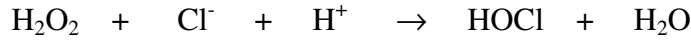
Nitrik oksit (NO), lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir (109). Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO, bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür (110,112,109). Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir. NO ve nitrojendioksit (NO<sub>2</sub>) tek sayıda elektronlara sahiptirler, bu yüzden serbest radikaldirler. Nitrözoksit (N<sub>2</sub>O) ise serbest radikal değildir. NO vücutta özellikle endotel hücreleri olmak üzere pek çok hücre tarafından üretilir. NO yan esansiyel bir amino asid olan L-Argininden, moleküler oksijen ve kofaktör olarak NADPH varlığında, nitrik oksit sentaz (NOS) etkisiyle L-Sitrulin ile birlikte sentezlenir.



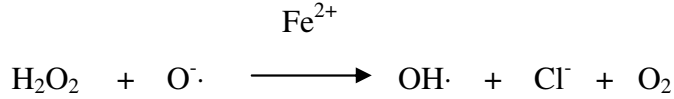
NO, süperoksit gibi diğer endojen serbest radikallerle reaksiyona girebilir ve reaktif bir ara ürün olan peroksinitrit(ONOO<sup>-</sup>) meydana gelir. Peroksinitrit güçlü bir oksidan olup, DNA ve proteinler gibi biyolojik moleküllerde hasar oluşturabilir ve uygunsuz pH'larda metal katalizörlerden  $\text{NO}\cdot + \text{O}_2\cdot^- \rightarrow \text{ONOO}^-$  ve  $\text{ONOO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{OH}\cdot + \text{NO}\cdot$

### 2.2.1.6.Hipoklöröz Asid

Aktif nötröfillerde oluşan güçlü bir oksidandır. Fagosit stoplazmasında bulunan, hem içeren myeloperoksidaz enzimi (MPO), klor iyonu ve hidrojen peroksitten hipoköröz asid (HOCl) oluşumunu katalize eder.



Hipoklöröz asid Fe<sup>+2</sup> bağımlı ve bağımsız bir reaksiyon ile hidroksil radikali oluşumunu arttırabilir.



Serbest oksijen radikalleri, özellikle hidroksil radikali, tüm hücrel makromoleküller ile reaksiyona girebilir. Çeşitli patolojik durumlarda normalden daha fazla serbest oksijen radikali oluşumu, ya da organizmanın antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması sonucu artan serbest radikaller, hücrenin değişik bileşenleri ve hücre dışı yapılar ile etkileşerek; hücrede metabolik, yapısal ve fonksiyonel bir bozukluğa yol açabilir ve bu da hücre ölümüyle sonuçlanabilir (114,113).

### 2.2.1.7. Ozon

Atmosferde solar radyasyona karşı global bir antioksidan görevi yapmasına rağmen yeryüzü seviyesinde toksiktir ve okside olabilen bir kirleticidir. Ozon, bazı fotokopi makinalarında ve bilimsel ekipmanlarda kullanılan şiddetli ışık kaynağı vasıtasıyla oluşur ve şehir havasını kirletir. Ozon, akciğerde lipidleri, çabuk okside olan proteinleri ve DNA'yı aşırı derecede zedeler (115,117,111).

### 2.2.2.Serbest Radikal Kaynakları

Hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı,elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondrial süperoksid radikal üretimi artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokramların oksidasyonundan kaynaklanır (109,110,118) .

Serbest radikaller organizmada, normal metabolik reaksiyonlar sırasında veya çevresel faktörlerin organizma üzerine etkisi ile oluşabilirler.

Çevresel faktörler direkt olarak veya hücre hasarı yoluyla hücrenel kaynakları aktifleyerek reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırırlar. Oluşan radikaller, çözünen oksijen veya hücrenel kimyasal maddelerle sekonder reaksiyonlara girebilirler (122,115).

### **2.2.2.1.Endojen Kaynaklar**

Endojen kaynaklar hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğindedirler. Radikal oluşumu hücre tiplerine göre değişiklik göstermesine rağmen, tüm aerobik hücrelerde belirli düzeylerde radikal oluşmaktadır. Bunlar:

1) Mitokondri iç membranındaki elektron transport zinciri, başta süperoksid radikali olmak üzere hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksid oluşumuna yol açar.

2) Serbest radikaller, endoplazmik retikulum ve nükleus membranında membrana bağlı sitokramların oksidasyonundan meydana gelir. Oluşan radikaller, sitokrom P<sub>450</sub> ve P<sub>5</sub> ansatüre yağ asitleri ve ksantotikler okside edebilir veya dioksijeni indirgeyebilir.

3) Peroksidomlar hücrenel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynağıdır. D-amino asid oksidaz, urat oksidaz ve L- $\alpha$ -hidroksiasid oksidaz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler.

4) Ksantin oksidaz, oksijenin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e redüksiyonu sırasında süperoksid radikalini meydana getirir.

5) Çözünbilir özelliği olan ve nötral sıvı ortamda oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına girebilen hücre komponentlerinden pek çoğu (tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler, tetrahidtoproteinler) dioksijenin redüksiyonunu sağlarken primer olarak süperoksid radikallerinin meydana gelmesine neden olurlar.

6) Plazma membranına bağlı lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimler serbest radikaller açığa çıkarmaktadır (110,126,130).

### 2.2.2.2.Serbest Radikallerin Eksojen Kaynakları

Diyet, çevresel etkenler ve bazı ilaçlar organizmada serbest radikal oluşturmada etkilidirler.

#### 1) DiyetSEL

- a.Çok doymamış yağ asitlerince zengin beslenme
- b.Alkol
- c.Fazla kalorili beslenme (obezite)
- d.Hayvansal proteinlerce zengin beslenme
- e.Aşırı demir ve bakır alınması
- f.Az sebze ve meyve yenmesi
- g.Yiyeceklerin uygun olmayan koşullarda saklanması ve hazırlanması
- h.Yiyeceklerin pişirme yöntemlerindeki hatalar

#### 2)Çevresel

- a.Sigara dumanı
- b.Hava kirliliği(O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, hidrokarbonlar)
- c.Diğer kirleticiler (Asbest, pestisitler)
- d.Radyasyon

#### 3)İlaçlar

- a.Antikanser ilaçlar
- b.Glutasyon tüketen ilaçlar(Asetaminofen, kokain)

**4)Metaller:** Metal iyonları, süperoksit anyonları ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile biyolojik sistemlerde hidroksil serbest radikali ve metal-oksijen kompleksleri gibi çok reaktif türleri üretmek için reaksiyona girerler ve sonuçta oksidatif DNA hasarı oluşur. Kimyasal karsinogeneze, metallerin aracılık ettiği oksidatif DNA hasarı önemli rol oynar (107,106).

Serbest radikallerin hücre çekirdeği ve DNA'da etkileri genetik ve mutajenik değişikliklere yol açar. OH· radikali oluşumu pürin ve primidinlerin modifikasyonuna veya DNA ipliklerinin kırılmasına neden olur. Serbest radikaller DNA polimerazı inhibe ederler.

### 2.3.Serbest Radikallerin Hücre Düzeyinde Etkileri



Çeşitli patolojik durumlarda normalden fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşmasıyla veya organizmanın antioksidan sisteminin yetersiz kalmasıyla artan serbest radikaller; hücrenin çeşitli bileşenleri ve hücre dışı makromoleküller ile etkileşerek, hücrede yapısal ve fonksiyonel bozukluğa neden olurlar. Oksijen radikallerinden etkilenebilecek başlıca vücut kimyasal maddeleri arasında; proteinler, nörotransmitterler, nükleik asitler, DNA ve hücre membranlarının başlıca bileşenleri olan yağ asitleri bulunmaktadır (125,127).

### **2.3.1.Serbest Radikallerin Enzimlere Etkisi**

Hücre membranı gibi, mitokondrial ve mikrozomal membranlarında fosfolipidlerinde doymamış yağ asitlerinin fazla miktarda bulunması nedeniyle lipid peroksidasyonuna karşı duyarlı oldukları bilinmektedir. Lipid peroksidasyon hasarı, membran yapı ve fonksiyonunda bozukluklarla sonuçlanabilen bir olaydır.Lizozomal membranların tahribi, hidrolitik enzimlerin salınması ve intrasellüler sindirimle sonuçlanır. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür Enzimler de serbest radikal kaynaklı fonksiyon kaybına uğrayabilirler. Örneğin;  $Ca^{++}$  -ATPaz ve  $Na^{+}$  - $K^{+}$  ATPaz enzimlerinin tiyol gruplarının oksidasyonu aktive kaybına sebep olur ve buna bağlı olarak hücre içi ve dışı iyon dağılımı bozulur. Serbest radikaller glutamin sentetaz , pruvat kinaz, kreatin kinaz, LDH gibi enzimlerde de aktive kaybına yol açarak metabolik fonksiyonel bozukluklara neden olurlar (116,133).

### **2.3.2.Serbest Radikallerin DNA ya Etkileri**

Stabil bir molekül olan DNA da lipidler, karbonhidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde  $10^3$  kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür (73). DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar, sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. Yeni doğan sıçanlarda dahi oksidatif baz modifikasyonunun (8OHdG) olduğu gösterilmiştir (74). ROS oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır. 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 (75,76). Bu lezyonlardan bazıları fizyolojik koşullarda da oluşabilmektedir. Örneğin pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması insan genomunda gün içinde 104 kez meydana gelebilmektedir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikorları oluşmaktadır. İyonize radyasyon, yüksek oksijen konsantrasyonu, otooksidasyona uğrayan kimyasallar (dihidroksifumarat, dopamin, LDOPA, noradrenalin, adrenalin), ksantin oksidaz ve substratları ve TNF- $\alpha$  dir(73). DNA'da oksidatif hasarın oluşumu iki hipotez ile açıklanmıştır. "Fenton Kimyası" hipotezinde OH radikalleri DNA'ya saldırarak hasar oluşturur.  $O_2^-$  gibi  $H_2O_2$ 'de doğrudan DNA'da hasar yapmaz. OH radikalının DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA'da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek olan OH• radikalının hücre içinde diffüze olarak nükleusa geçme olasılıkları azdır. Olası mekanizma membranı kolayca geçebilen  $H_2O_2$ 'in nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyonlaşarak (Haber- Weiss ve Fenton reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmasıdır.

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli kationları 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  $H_2O_2$ 'in hedefi haline getirmektedir. DNA'ya bağlı metal iyonları ile  $H_2O_2$ 'in DNA üzerinde reaksiyonlaşmasından oluşan OH radikalleri, OH radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılamamaktadır. Ayrıca, OH radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir (6). Doku kültür ortamının  $Fe^{3+}$  ve  $Cu^{2+}$  iyon konsantrasyonunun arttırılması ile oksidatif DNA baz hasarının arttığı ve  $H_2O_2$ 'e maruz bırakılan hücrelerde bakır ve/veya demir şelatörlerinin (deferoksamin) kullanımının DNA'daki oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir (73,77). DNA molekülüne bağlanarak transkripsiyon ve translasyonu etkileyen ribozomal proteinlerde çinko parmak yapıların bulunduğu ve bu yapılarda çinko yerine demirin bağlanması ile radikal oluşumunun arttığı saptanmıştır. DNA'nın oksidatif hasardan korunması için demir şelatörleri ve radikal

temizleyicilerinin birlikte kullanılmalarının önemli fayda sağladığı öne sürülmüştür (73). OH radikali dört DNA bazına da saldırı yapabilirken singlet oksijen (O<sub>2</sub>) çok daha seçicidir (75). O<sub>2</sub> dal kırığından daha çok, guanin türevli ürünler olan 8-hidroksiguanin ve FAPyGuanin (FAPyG) oluşturmaktadır (78). Hücrede DNA ile birlikte bulunan Cu<sup>2+</sup> iyonlarının bazı fenollerle reaksiyonlaşması ile ROS oluşmakta ve sonuçta baz modifikasyonları, dal kırıkları ve DNA baz-fenol katılma ürünleri gibi çeşitli DNA lezyonları meydana gelmektedir. In vitro Cu<sup>2+</sup> iyonları varlığında DNA hasarına neden olan fenol bileşikleri 2- hidroksiöstradiol, 2-metoksiöstradiol, dietilstilbestrol ve L-DOPA'dır. Bazı fenolik bileşiklerin bu lezyonların oluşumunda rol oynadıkları için karsinojenik oldukları öne sürülmektedir. Nükleaz aktivasyonu hipotezine göre oksidatif stres, sitozolik Ca<sup>2+</sup> iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olarak nukleusdaki Ca<sup>2+</sup>-bağımlı endonükleazları aktive etmekte ve DNA'nın fragmantasyonuna neden olmaktadır. Nükleaz aktivasyonu DNA bazlarında kimyasal değişikliklere neden olmamaktadır. Ca<sup>2+</sup> şelatörlerinin kullanımı ile DNA hasarının engellenebildiğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır. In vivo her iki hipotezin de birlikte geçerli olduğu kabul edilmektedir. Hücre tipine ve oksidatif stres etkenine bağlı olarak mekanizmalardan biri öne çıkmaktadır. Transisyon metal iyonlarının varlığı reaksiyon hızını, mekanizmasını ve baz modifikasyonunun türünü etkilemektedir (77,79).

### **2.3.3.Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri**

Serbest radikallere karşı en fazla hassasiyet gösteren biyomolekül grubu lipidlerdir. Oksijen radikalleri poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek lipid peroksidasyonuna yol açarlar. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilirler. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin poliansatüre yağ asitlerinin metilenik karbonlarından hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atakla başlar ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden

olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (124,137).

#### **2.3.4.Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri**

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır.Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar . Enflamatuar eklem hastalıklarında synovial sıvıya geçen PML'lerden extrasellüler sıvıya salınan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> buradaki mukopolisakkarit olan hyalüronik asidi parçalarlar. Gözün vitröz sıvısında bol miktarda hyalüronik asit bulunur. Bununda oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunur (128,147,146) .

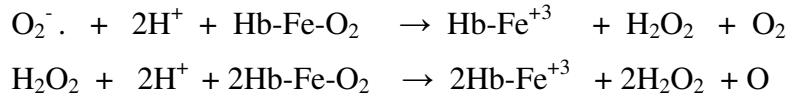
#### **2.3.5.Nükleik Asit'lere Etkileri**

Oksijen radikalleri oksidatif yarıma ile DNA hasarına yol açabilir, pirimidinler (timin) özellikle hassastır. DNA halatlarının kopması, DNA çift sarmalı ayrılması sonucu hücrede mutasyonlar ve ölüm gelişebilir. DNA molekülleri nükleusta bulunur ve sıkı helix yapısında düzenlenmiştir, ayrıca histonlarla da korunur. Bundan dolayı serbest radikallerle temasa bağlı değişiklikler azdır (139,135,139) .

#### **2.3.6. Serbest radikallerin Proteinlere etkileri**

Proteinler oksidanlara maruz kaldıklarında bir çok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir. Pek çok sayıda mekanizmanın protein hasarına neden olduğu bilinmektedir. Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca mekanizmalar; PCO oluşumu ile karakterize edilen metal-iyon katalizli protein oksidasyonu, protein-tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, 3-nitrotirozin (3-NT), ditirozin(diTyr) oluşumu olarak sıralanabilir. Potansiyel olarak bütün amino açıl yan zincirleri oksidatif modifikasyona uğrayabilme özelliğine

sahiptir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinlerde dahil olmak üzere diğer hücrel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artmasına yol açar. Proteinlerin serbest radikal hasarına karşı duyarlılığı, amino asid bileşimine, proteinin aktivasyonundan veya yapısının düzenlenmesinden sorumlu amino asitlerin yerleşimine, hasarlı proteinin onarılabiliğine bağlıdır. Aromatik aminoasitlerde (fenilalanin, tirozin, triptofan) doymamış yapılar olduğundan oksidatif ataklara çok hassastırlar. Sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere duyarlılığı çok fazladır. 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. Serbest radikaller etkisiyle IgG ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozular. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin  $O_2^-$  veya  $H_2O_2$  ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (123,141,142,140) .



#### **2.4.Antioksidan Savunma Sistemi**

Oksijenli yaşamla birlikte aerobik organizmalar oksijen kaynaklı radikalleri oluşturmaya başlamışlardır. Bununla eş zamanlı olarak, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere, organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas dengenin korunamadığı durumlarda, hücre hasarına kadar giden birçok patolojik durum ortaya çıkmaktadır (143).

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, zar yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucu olarak, başlangıçta antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise, antioksidanların tanımı lipidlerin yanısıra

proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece antioksidanlar, hedef molekülleri oksidan hasarı engelleyen ve geciktiren maddeler olarak tanımlamakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir. Memeli hücresinde oksidan ürünlere karşı korunma üç prensip içinde gerçekleşmektedir:

1. Oluşan radikallerin detoksifikasyonu
2. Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi
3. Radikal oluşumunun sınırlandırılması

Oluşan radikallere karşı savunma sistemleri, enzimler ve düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucuları olmak üzere iki grupta toplanırlar. Savunmada öncelikle etkili olan enzim sistemleridir. Antioksidan savunmanın önemli bir kısmını süperoksid ve  $H_2O_2$ 'i temizleyen özel enzimler oluşturur. Bunlar süperoksid dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimleridir. Bu enzimlerin aktivitesi, serbest radikallerin sentez ve yıkılma hızına, beslenme ile eser elementlerin (Mn, Se, Fe, Zn, Cu) alınmasına bağlıdır (144).

Enzimsel savunma dışında düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucularını lipidde eriyebilir özellikte olanlar ve stoplazmada bulunanlar olmak üzere iki grupta toplayabiliriz. E vitamini ve  $\beta$ -karoten lipidde eriyebilir özellikte antioksidan özellikli vitaminlerdir. GSH, ürik asit, bilirubin ve askorbik asit stoplazmik yerleşim gösteren antioksidan etkili maddelerdir.

Plazmada yaklaşık 300  $\mu$ M konsantrasyonda bulunan ürik asit, hemoglobini peroksid oksidasyonundan ve eritrositleri lipid peroksidasyonundan korur. Bu özellikleri ile ürat serbest radikal temizleyicisi olarak kabul edilebilir. Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre gruplanabilirler:

**1.Yapılarına göre;** Enzimler ve enzim olmayan proteinler, küçük moleküller

**2.Kaynaklarına göre:** Organizmaya ait olanlar(endojen antioksidanlar) ve dışarıdan alınanlar (eksojen antioksidanlar)

**3.Çözünürlüklerine göre:** Suda çözünenler ve lipidlerde çözünenler

**4.Yerleşimine göre:** Hücre içinde bulunanlar ve plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunanlar.

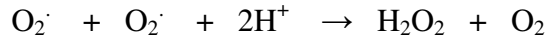
Bu bahsedilen antioksidanlar dışında, çok sayıda endojen molekülün antioksidan etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Bu moleküller arasında sistein, histidin gibi amino asitler ile safra asitleri, bilirubin gibi bileşikler ve sitokinler gibi yapıları ve işlevleri çok farklı moleküller vardır (145).

#### **2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar**

##### **2.4.1.1.Superoksid Dismutaz (EC U5.1.1. EC-SOD)**

SOD'lar bir grup metalloenzimdir. Süperoksid radikalının  $H_2O_2$ 'ye dönüşümünü katalizleyerek, süperoksid radikalının zararlı etkilerine karşı hücreleri korurlar. Aynı zamanda lipid peroksidasyonunu da inhibe ederler.

SOD aktivitesi yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. SOD'nin ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür(82).



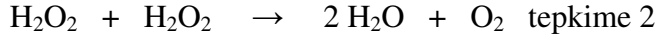
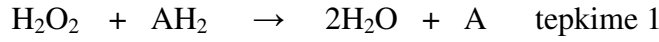
##### **2.4.1.2. Glutasyon Peroksidaz (EC 1.11.1.9)**

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Oluşan  $H_2O_2$ , GSH-Px veya katalaz aracılığı ile suya indirgenir. Glutasyon peroksidaz fagositik hücrelerde önemli foksiyonlara sahiptir. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar. Bu enzim fagositik hücrelerde önemli fonksiyonlara sahiptir (82).

##### **2.4.1.3.Katalaz (EC 1.11.1.6)**

Katalaz yapısında protoporfirin IX Fe (Hem) grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir (82). Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve mukoz membranda yüksek miktarda bulunmaktadır (82).  $H_2O_2$  oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle (tepkime 1) veya  $H_2O_2$  oluşum hızının

yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkime (tepkime 2) yaparak hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır.



## **2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**

### **2.4.2.1.β-Karoten (Vitamin A Ön Maddesi)**

β-Karoten yağda çözünen bir antioksidan olarak serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksiyona girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu önler. Karotenoidler özel kimyasal yapılarından dolayı singlet oksijeni tutabilirler. Karotenoidlerin singlet oksijen yok etme kabiliyeti, içerdikleri konjuge çift bağ sayısına bağlıdır. Etkili bir yok etme için dokuz yada daha fazla çift bağa sahip olmak zorunludur. β-karoten onbir konjuge çift bağa sahiptir. Bu da onun singlet oksijen yok edici etkisini arttırmaktadır.

### **2.4.2.2. C Vitamini**

C vitamini (askorbik asid), kapalı formülü  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  olan bir ketolaktondur. Suda eriyebilir vitaminlerden olan askorbik asid, özellikle yeşil renkli sebze, meyve ve turuncgillerde bol miktarda bulunur. İnce barsaklardan kolayca emilir. Isıtılmaya dayanıksız, dondurmaya ise dayanıklıdır. Plazma konsantrasyonu 0.5-1.5 mg/dl kadardır. C vitamini organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kollagen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici bir rol oynar. Midede ferri demiri ferro demire indirgeyerek emiliminde görev alır. İmmunite ve yara iyileşmesinde etkilidir. Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbik asid semidehidroaskorbat radikal ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. C vitamininin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında okside etki de göstermesidir. Çünkü C vitamini, ferri demiri ferro demire indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek sellüler ajandır. Bu yolla askorbat,



proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksid ile etkileşmeye uygun olan ferro demire dđnüştürür. Yani süperoksid üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir pro-oksidan olarak değerlendirilir.

#### **2.4.2.3. Vitamin E ( $\alpha$ -Tokoferol)**

Vitamin E nin biyolojik olarak en aktif formu  $\alpha$ -Tokoferoldür.  $\alpha$ -Tokoferol lipoproteinler ve biyolojik membranlar içinde bulunan yağda çđzünen bir bileşiktir. Vitamin E yağda çđzünen ve zincir-kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki yağ asitlerini korumaktır.

#### **2.4.2.4. Glutasyon (GSH)**

Glutasyon (GSH), başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeyde bulunan ve glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir iri peptittir. Glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur.

#### **2.4.2.5. Melatonin**

Melatonin -OH radikalini ortadan kaldıran en güçlü antioksidandır. Melatonin, OH $\cdot$  radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dđnüşür ki bunun da ortamdaki O<sub>2</sub> $\cdot^-$  radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Serbest oksijen radikalleri oluşturmak suretiyle kansere sebep olan safrol'ün DNA üzerindeki hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir.

Melatonin'in, antioksidan olarak diğer önemli bir özelliği de lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyeri gibi bariyerleri de kolayca geçer. Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir.

### **3. MATERYAL METOD**

#### **3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler**

Çalışmamızda Harran Üniversitesi Arastırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında rutin olarak kullanılan cihazlardan yararlanılmıştır.

1. Elektroforez düzenegi
2. Santrifüj (Hettich Universal 30 RF)
3. Flöresan mikroskop (Nikon, Japon)
4. Spektroflorometre (Shimadzu RF-1501 MODEL, Japon)
5. Derin dondurucu (New Brunswick Scientifi, C54285 model)
6. Vorteks (Nüve, NM 110 model, Türkiye)
7. Hassas terazi (Sartorius marka 0,0001 g'a duyarlı)
8. Su banyosu (Nüve, BM 402 model, Türkiye)
9. Dijital pH-metre (Hanna, pH 211 model Japon)
10. Otomatik biyokimya analizörü (Aeroset, USA)
11. Işık mikroskobu (Nikon, Japon)
12. Lanset (ISOLAB, Almanya)
13. Lam ve lamel

#### **3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

1. Normal erime noktasına sahip (NMP, 65<sup>0</sup>C) agaroz jel (Sigma)
2. Düşük erime noktasına sahip (NMP, 37<sup>0</sup>C) agaroz jel (Sigma)
3. Sodyum-EDTA (Carlo Erba)
4. Sodyum klorür (Merck)
5. Louril sarkozin (Sigma)
6. Trizma base (Sigma)
7. Triton X-100 (Sigma)
8. Sodyum hidroksid (Merck)
9. Disodyum hidrojen fosfat (Merck)
10. Sodyum dihidrojen fosfat (Merck)
11. Etidyum bromit (Sigma)
12. 2,4-dinitrofenilhidrazin (Sigma)
13. Hidroklorik asit (Merck)

14. Trikloroasetikasit (Merck)
15. Guanidin HCl (Sigma)
16. 1,3 dietil tiyobarbitürük asit (Sigma)
17. o-Dianisidine (Sigma)
18. Ferroz amonyum sülfat(Merck)
19. Hidrojen peroksit (Merck)
20. Histopaque–1077 (Sigma)
21. Sülfürik asit (Merck)
22. Gliserol (Merck)
23. DMSO(Merk)
24. Xylenol orange (Sigma)

### 3.3. Hasta ve Kontrol Gruplarının Olusturulması

**Hasta Grubu:** Bu çalışmamızda Şanlıurfa' daki çeşitli hastanelere ve Verem Savaş dispanserine başvuran ve yapılan tetkikler sonucu tüberküloz olduğu kesinleşen, anamnezinde akciğer tüberküloz enfeksiyonu dışında herhangi bir sikayeti 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 ve hastalığı iyileşen 21 erkek ve 4 kadın toplam 25 birey hasta grubu olarak seçildi. Hasta grubunun yaş ortalaması  $39.2 \pm 14.2$  idi.

**Kontrol Grubu:** Bu çalışmada kontrol grubu olarak yine aynı bölgelerde bulunan, anamnezinde herhangi bir sikayeti 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 21 sağlıklı erkek ve 12 sağlıklı kadın toplam 33 kişi randomize olarak seçildi. Kontrol grubunun yaş ortalaması  $36.2 \pm 8.5$  idi.

### 3.4. Örneklerin Hazırlanması

Çalışmaya katılan tüm bireylerden en az 12 saatlik açlıktan sonra heparinize tüplere kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri hemen buzlu su içine

konularak laboratora ulaştırıldı. Örnekler öncelikle DNA hasar ölçümü için mononükleer lökositlerin seperasyonunda kullanıldı. Kalan örnekler daha sonra 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek ayrılan plazma oksidatif stress parametrelerinin ölçümünde kullanılmak üzere  $-80^{\circ}\text{C}$  derin dondurucuda saklandı.

### **3.5.Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu**

Bir ml histopaque-1077 üzerine bir ml taze heparinize kan yavaşça konup 2100 rpm ve  $25^{\circ}\text{C}$ '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  $25^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki süpernatant atılıp pellet tuzlu fosfat tamponu (pH=7,4) ile  $10^6$  mononükleer lökosit / $\mu\text{l}$  olacak şekilde dilüe edildi.

### **3.6.Comet Assay (alkali mononükleer hücre elektroforezi) Yöntemi ile DNA Hasar Tayini**

#### **3.6.1.Yöntemin Prensipleri**

Comet assay yöntemi alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüke sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler veya çekirdekçikler agarozta yerleştirilir ve lizisten sonra zarar görmemiş DNA'lar taşınma sırasında comet (kuyruk) oluşturmazlar. Oysa DNA fragmente oluşmuşsa fragmentler (nükleik asitler) farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar (57-58).

#### **3.6.2.Yönteminin Uygulanışı**

##### **3.6.2.1.Slaytların Hazırlanması**

%1,0 'lik NMP agaroz jel hazırlanarak 80 $\mu\text{l}$  jel kenarları buzlanmış lam üzerine damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak buzdolabında ( $2-4^{\circ}\text{C}$ ) 5 dakika bekletildikten sonra lamelleri kaldırıldı. PBS (Fosfat buffered saline) ile  $\text{mm}^3$  te  $10^4$  hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10  $\mu\text{l}$  alınarak 80  $\mu\text{l}$  %0,5'lik low melting point (LMP) agaroz jel ( $37^{\circ}\text{C}$ ) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine tabakalandırıldı ve tekrar lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5

dakika bekletildi. Üçüncü asamada da aynı konsantrasyonda LMP agaroz jel hazırlanarak ikinci tabakanın üzerine ince bir tabaka halinde tabakalandırılarak slaytların hazırlanması tamamlandı (57-58).

#### **3.6.2.2.Lizis aşaması**

Hazırlanan lamlar yaklaşık bir saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis solüsyonunda bekletildi. Lizis solüsyonunun içeriği 100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM trizma base ve %1 oranında triton X-100'den oluşmaktadır. Bu solüsyonun pH 'sı 10'a ayarlandı. Lizis tamponu ile hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı (57-58).

#### **3.6.2.3.Elektroforez Tamponu**

Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda (1mM EDTA ve 300 mM sodyum hidroksit pH <13) 20–30 dakika inkübasyona bırakıldı (57-58).

#### **3.6.2.4.Elektroforezde Yürütme**

Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, 14 volt'luk elektriksel alanda ve 5–25 °C'de 30 dakika yürütüldü (57-58).

#### **3.6.2.5.Nötralizasyon**

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini ortamdaki uzaklaştırmak için slaytlar 3 dk süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu ile (0.4 M Tris-HCL, pH 7.5) yıkandı (57-58).

#### **3.6.2.6.Boyama**

Nötralizasyon tamamlandıktan sonra etidyum bromit boyası ile (5 µg/ml) boyandı (152-153). Herbir slayt için 80 µL boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 20 büyütmeli floresan mikroskop ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 50 adet DNA görüntüsü değerlendirildi.

### 3.6.2.7. Analiz

DNA 'daki hasarların kuyruklu yıldız görüntüleri florasana mikroskopunda toplam 50 hücre sayılarak değerlendirildi ve ampirik olarak (hasarsız 0 ve en hasarlı 4) belirlenmiş 5 farklı görüntüye göre puanlanarak hasar belirlendi. Elde edilen sayısal veriler 2 ile çarpılarak 100 hücre üzerinde hasar, arbitrary ünitesi olarak verildi (57-58).

### 3.7. Protein Oksidasyonu (PO)

#### Prensip:

Levine ve arkadaşları (63) tarafından geliştirilen bir metod olup proteinlerin oksidasyonu sonucu oluşan karbonil grupları ile 2,4-dinitrophenylhydrazinin reaksiyona girmesi ile oluşan hydrazone bileşiklerinin renginin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanan bir yöntemdir.

#### Reaktifler:

**DNPH çözeltisi:** 2 molarlık HCl içinde 10 milimolar 2,4-dinitrofenilhidrazin.

**TCA çözeltisi:** Deiyonize su içerisinde % 10 trikloroasetik asit.

**Guanidin HCl çözeltisi:** 6 molar guanidin HCl 20 milimolarlık potasyum fosfat tamponu (pH=2,3) içinde çözüldü.

#### Yöntemin uygulanışı:

15 µl plazma 0,5 ml DNPH çözeltisi ile karıştırılarak oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında üzerine 0,5 ml TCA çözeltisi eklenerek vortekslendi ve 15000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet 2 kez 1/1 oranında etanol/etil asetat ile yıkandı. Kalan pellet üzerine 0,6 ml Guanidin HCl çözeltisi ilave edip 15 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakarak pelletin çözünmesi sağlandı. Santrifüj edip spektrofotometre ile 365 nm'de optik dansiteleri alındı ve çıkan absorbans absorpsiyon katsayısı ( $\epsilon_{\max}=22000/M/cm$ ) ile çarpılarak sonuçları nmol/mg protein şeklinde hesaplandı (59, 60).

### **3.8.Malondialdehid (MDA)**

#### **Prensip:**

Lipit peroksidasyonunun sekonder ürünü olan malondialdehid, thiobarbituric ile asit ortamda 97°C’ de reaksiyonu sonunda pembe renk oluşmaktadır. Oluşan pembe rengin Conti ve arkadaşları (12) tarafından geliştirilen ve florometrik ölçümüne (Eks:525nm, Em:547nm) dayanan bir metoddur.

#### **Reaktifler:**

**DETBA çözeltisi:** 10mmol/L 1,3-diethylthiobarbiturik asid 75 mol/L fosfat tamponu (pH=3) içerisinde çözünerek hazırlandı.

#### **Yöntemin uygulanışı:**

25 µl plazma 0,5 ml DETBA çözeltisi içerisinde karıştırılıp 96 °C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Örnekler 5 dakika buz banyosunda bırakıldıktan sonra 2,5 ml n-bütanol eklendi. Karışım vortekslenerek 1500 X g de 4 C’ de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant alınıp florometrede okutuldu. (Extasyon= 539 ve emisyon= 553) Standart olarak tetraeoksipropan kullanıldı. Sonuçlar µmol/L olarak verildi (59,60,61).

### **3.9.Total Antioksidan Kapasite (TAK)**

#### **Prensip:**

Erel tarafından (137) geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur. Fe<sup>2+</sup>-o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksid ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH’da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir (137).

#### **Reaktifler:**

**Reaktif-1:** 75 mM Clark tamponu ( pH=1.8) içerisinde 10 mM o-Dianisidine ve 45 AM Fe(NH<sub>4</sub>)<sup>2</sup>(SO<sub>4</sub>)<sup>2</sup>-6H<sub>2</sub>O çözülerek hazırlandı.

**Reaktif-2:** 7,5 mM hidrojen peroksit 75 mM Clark tamponu ( pH=1.8) içerisinde karıştırılarak hazırlanır.

### 3.10.Total Oksidant Seviye (TOS)

#### **Prensip:**

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyona oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xylenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir ve tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir (62).

#### **Reaktifler:**

**Reaktif-1:** 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisine 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında gliserol çözülüp daha sonra total volümde 250 µM Xlenol orange çözülerek hazırlanır.

**Reaktif-2:** Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-Dianisidine dihydrochloride çözülüp sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlanır.

### 3.11. Plazma Protein Ölçümü

#### **Prensip:**

Polipeptidler biüret reaktifi ile reaksiyona girebilen en az iki peptid bağı içerirler. Alkali ortamda iki değerlikli bakır iyonunun protein nitrojen ile kordineli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır.

#### **Reaktif:**

Sodyum potasyum tartrate (23,4 mM), Sodyum hydroxide (613 mM) Potassium iodide (6,6 mM), Copper sulfat (13,2 mM)

### 3.12. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Total Oksidatif Stress (TOS) / Total Anatioksidan Kapasite (TAK) şeklinde bölünerek Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplandı (60).



### **3.13.Yapılan İstatistiksel Analizler:**

Ticari bir program olan SPSS 11.0 kullanılarak gerekli istatistiksel analizler ve şekiller yapıldı.  $p < 0.05$  olması anlamlı olarak kabul edildi. Grupların arasındaki farkı değerlendirmek için student's t-testi kullanıldı. Parametrelerin arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için ise korelasyon analizi yapıldı.

#### 4.BULGULAR

Hasta ve kontrol grubuna ait demografik veriler Tablo 2 de verilmiştir. Tablo 2 den de görüldüğü gibi hasta ve kontrol gruplarında cinsiyet, yaş, uzunluk, ağırlık değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

**Tablo 2:** Hasta ve kontrol gruplarında fiziksel değerlerin karşılaştırılması

	Kontrol (n=33) Ortalama $\pm$ S.D.	Hasta (n=25) Ortalama $\pm$ S.D.	P
Cinsiyet (E/K)	21/12	21/4	>0.05
Yaş (yıl)	36.2 $\pm$ 8.5	39.2 $\pm$ 14.2	>0.05
Uzunluk (cm)	168 $\pm$ 16	165 $\pm$ 13	>0.05
Ağırlık (kg)	69.9 $\pm$ 10.9	67.8 $\pm$ 8.7	>0.05

Tablo 3 'te kontrol ve hasta gruplarının mononükleer lökosit DNA hasarı, plazma TAK, MDA, PO, TOS ve OSI seviyeleri gösterilmektedir. Tablo 3'te görüldüğü gibi hasta grubunda mononükleer lökosit DNA hasarı, MDA, TOS, PO ve OSI seviyelerinin kontrol grubundan yüksek (sırasıyla; ( $p= 0.001$ ,  $p= 0.005$ ,  $p= 0.001$ ,  $p= 0.011$  ve  $p= 0.001$ ), TAK seviyeleri ise kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ( $p=0.014$ ).

**Tablo 3:** Hasta ve kontrol gruplarında DNA hasarı ve Oksidan/Antioksidan parametrelerin karşılaştırılması

Parametreler	Kontrol (n=33) Ortalama ± SD	Hasta (n=25) Ortalama ± SD	P
Mononükleer Lökosit DNA Hasarı (AU)	29.81 ± 11.79	52.16 ± 18.65	0.001
Total Antioksidan Kapasite (µmol Trolox Eqv./L)	1.91 ± 0.34	1.46 ± 0.32	0.001
Plazma MDA Seviyeleri (µmol/L)	4.97 ± 0.71	5.65 ± 0.17	0.005
Protein Oksidasyonu (nmol / mg Protein)	1.40 ± 0.24	1.61 ± 0.43	0.022
Total Oksidant Seviye (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv. /L)	16.12 ± 8.67	29.82 ± 21.16	0.001
Oksidatif Stres İndex (AU)	12.04 ± 3.59	22.20 ± 13.14	0.001

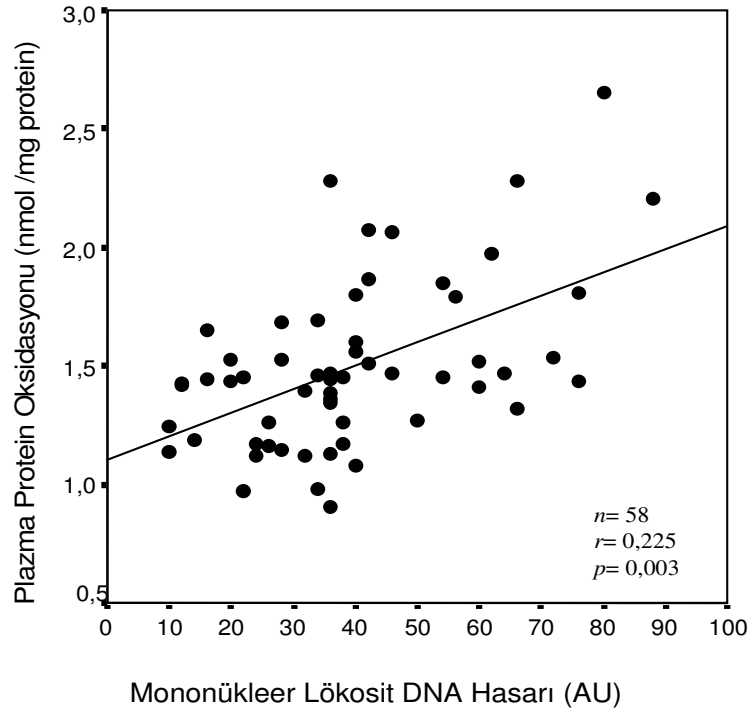
Tablo 4'te mononükleer lökosit DNA hasarı, total antioksidan kapasite, plazma MDA, protein oksidasyonu, total oksidant seviye ve oksidatif stres index seviyelerinin birbirleriyle ilişkileri gösterildi. Tablo 4'te görüldüğü gibi hasta grubunda mononükleer lökosit DNA hasarı ile MDA, PO, TOS ve OSI seviyeleri arasında pozitif (sırasıyla; p= 0.003, r= 0.225; p= 0.001, r= 0.521; p= 0.001, r= 0.509; p= 0.001, r=0.499), TAK arasında negatif bir ilişki vardı (p= 0.001, r= -0.435). TAS ile MDA, PO, TOS ve OSI seviyeleri arasında negatif bir ilişki bulundu (sırasıyla; p= 0.162, r= -0.186; p= 0.089, r= -0.225; p= 0.003, r= -0.384; p= 0.001, r= -0.504). Plazma MDA seviyeleri ile PO, TOS ve OSI seviyeleri arasında pozitif bir ilişki vardı (sırasıyla; p= 0.319, r= 0.133; p= 0.009, r= 0.341; p= 0.069, r= 0.241).

PO ile TOS ve OSI seviyeleri arasında da pozitif bir ilişki bulundu (sırasıyla;  $p=0.160$ ,  $r=0.187$ ;  $p=0.616$ ,  $r=0.650$ ). Ve en son olarak TOS ile OSI seviyeleri arasında pozitif bir ilişkinin mevcut olduğu görüldü ( $p=0.001$ ,  $r=0.857$ ).

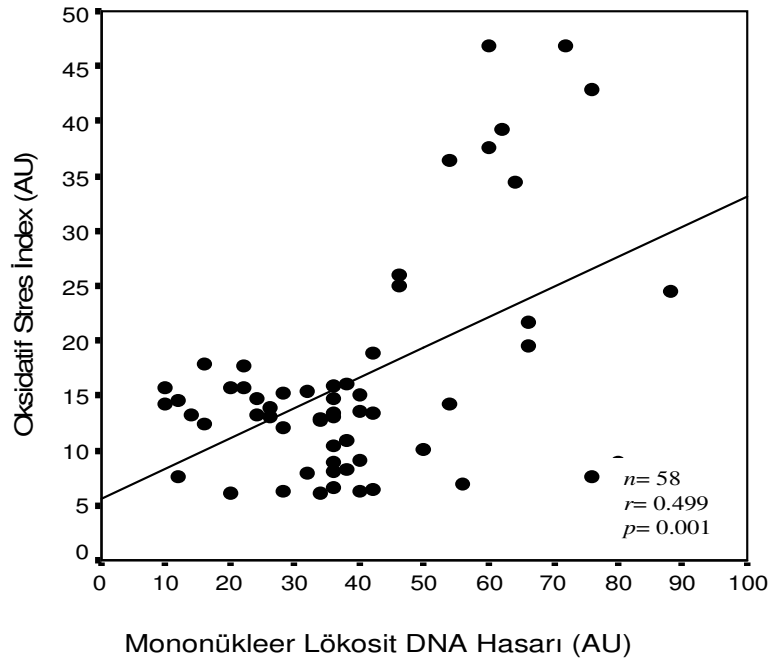
**Tablo 4:**Hasta grubunda DNA hasarı ve Oksidan/Antioksidan parametreler arasındaki ilişki

		Total Antioksidan kapasite	Plazma MDA	Protein Oksidasyonu	Total Oksidant kapasite	OSI
Mononükleer	<i>r</i>	-0.435	0.225	0.521	0.509	0.499
Lökosit	DNA <i>p</i>	0.001	0.003	0.001	0.001	0.001
Hasarı						
Total Antioksidan	<i>r</i>		-0.186	-0.225	-0.384	-0.504
Kapasite	<i>p</i>		0.162	0.089	0.003	0.001
Plazma MDA	<i>r</i>			0.133	0.341	0.241
	<i>p</i>			0.319	0.009	0.069
Protein	<i>r</i>				0.187	0.65
Oksidasyonu	<i>p</i>				0.160	0.616
Total Oksidan	<i>r</i>					0.857
Kapasite	<i>p</i>					0.001

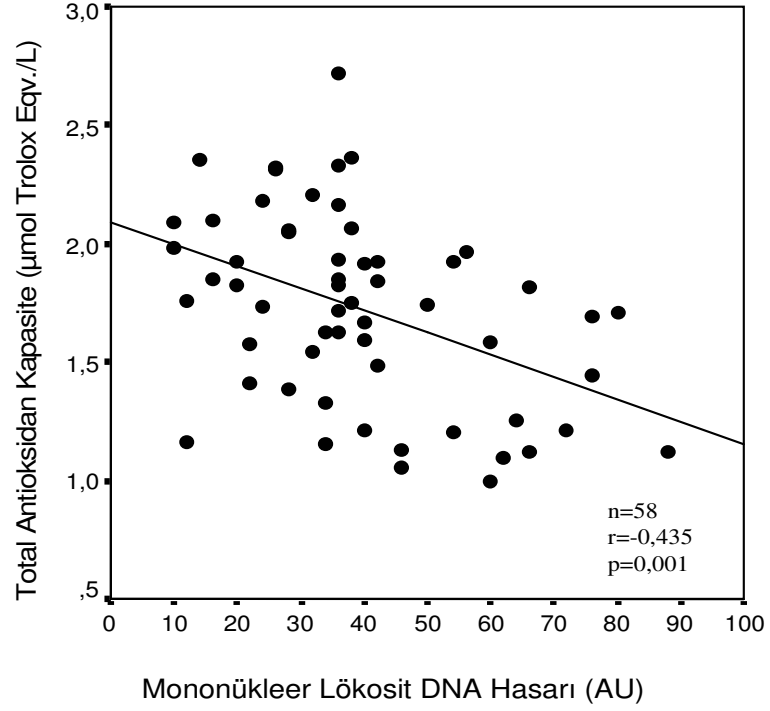
Şekil 2-6 da hasta grubunda mononükleer lökosit DNA hasarı ile MDA, PO, TOS TAK ve OSİ seviyeleri arasındaki ilişkilerin grafikleri verilmiştir. Şekil 7-12 de ise kontrol ve hasta gruplarında mononükleer lökosit DNA hasarı ile MDA, PO, TOS TAK, OSİ ve plazma total serbest SH seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları gösterilmiştir.



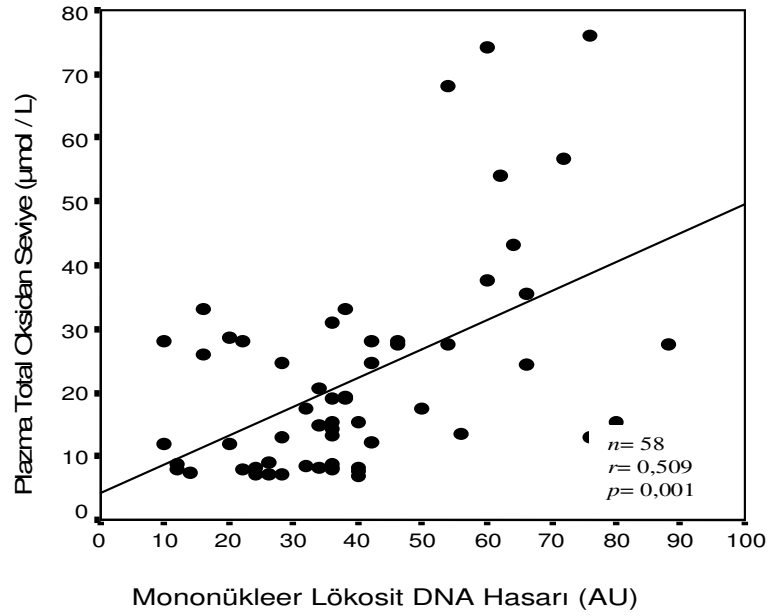
**Şekil 2:** Hasta grubunda Mononükleer lökosit DNA hasarı ile plazma total protein oksidasyon seviyeleri arasındaki ilişkinin dağılımı



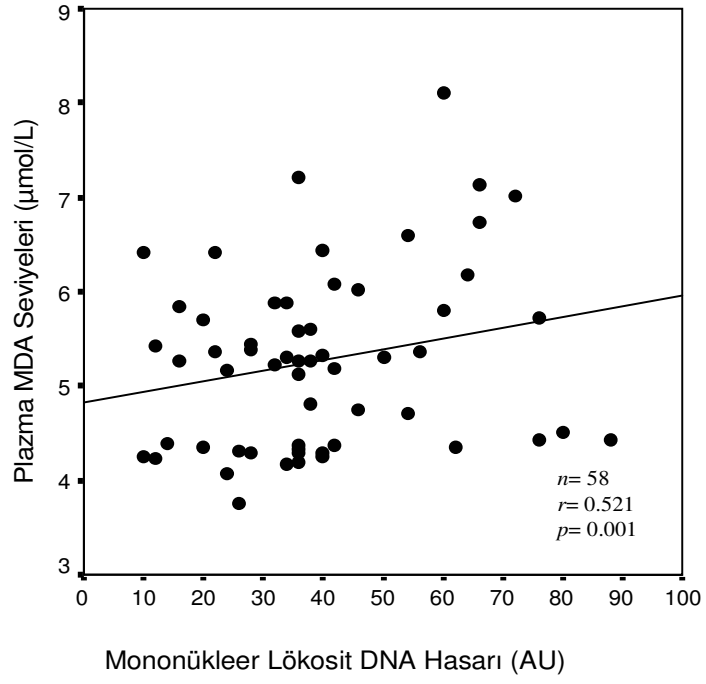
**Şekil 3:** Hasta grubunda Mononükleer lökosit DNA hasarı ile oksidatif stres index seviyeleri arasındaki ilişkinin dağılımı



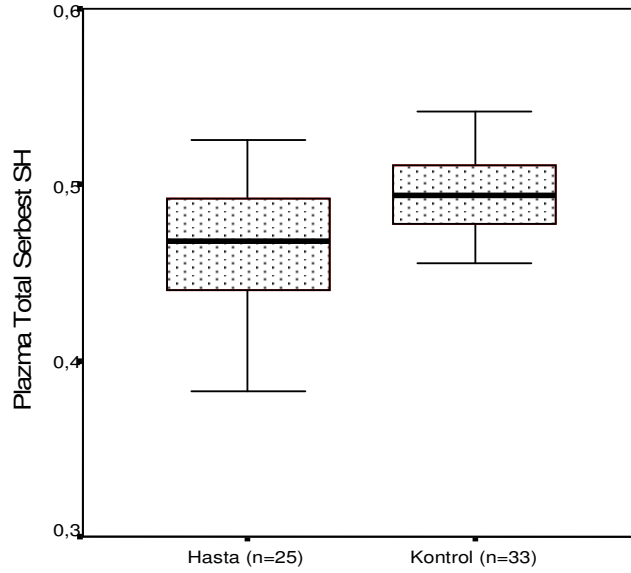
**Şekil 4:** Hasta grubunda Mononükleer lökosit DNA hasarı ile total antioksidan seviyeleri arasındaki ilişkinin dağılımı



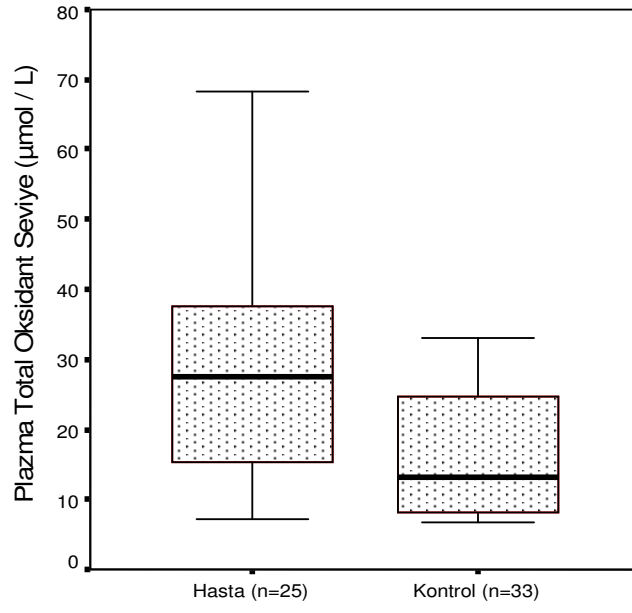
**Şekil 5:** Hasta grubunda Mononükleer lökosit DNA hasarı ile Plazma Total Oksidant seviyeleri arasındaki ilişkinin dağılımı



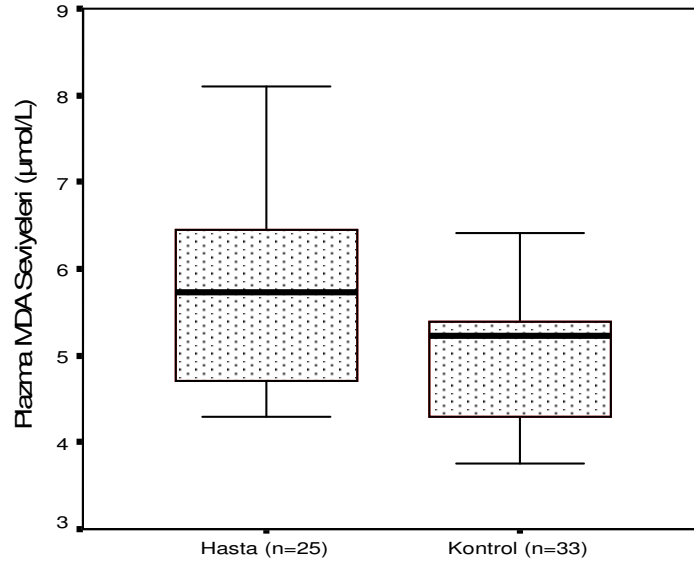
**Şekil 6:** Mononükleer lökosit DNA hasarı ile total plazma MDA seviyeleri arasındaki ilişkinin dağılımı



**Şekil 7:** Hasta ve kontrol gruplarında total serbest SH seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

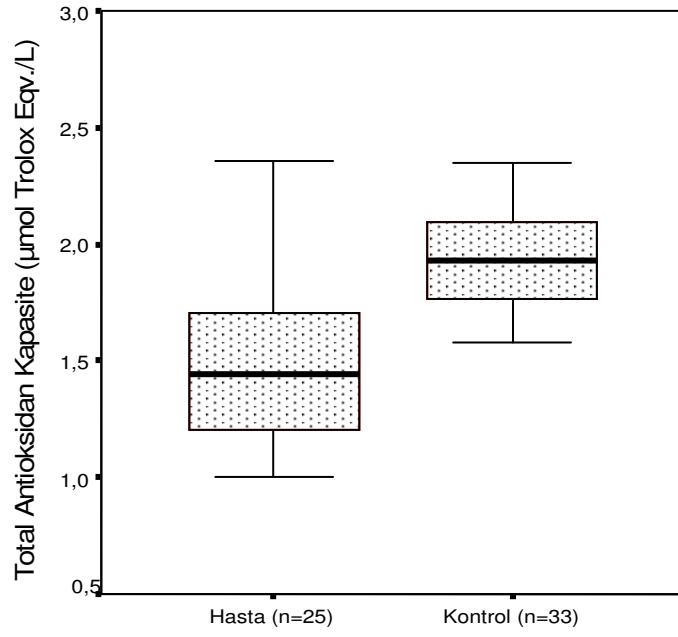


**Şekil 8 :** Hasta ve kontrol gruplarında plazma Total Oksidant seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

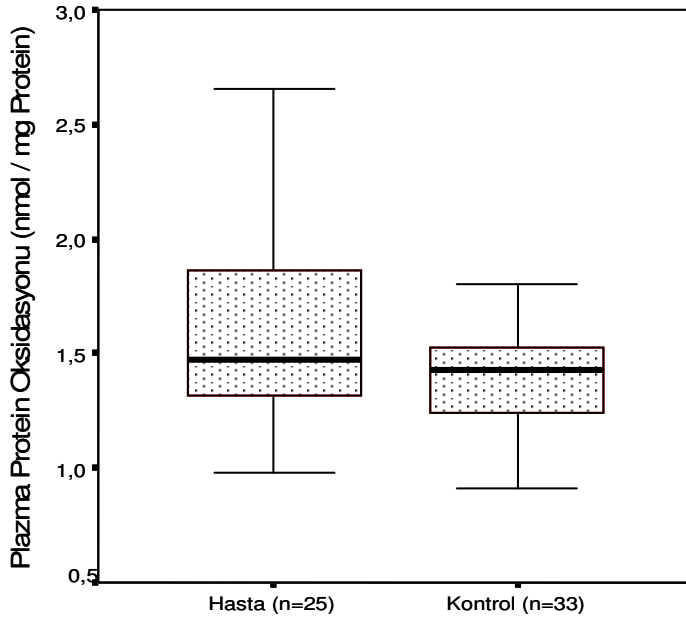


**Şekil 9:** Hasta ve kontrol gruplarında plazma MDA seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

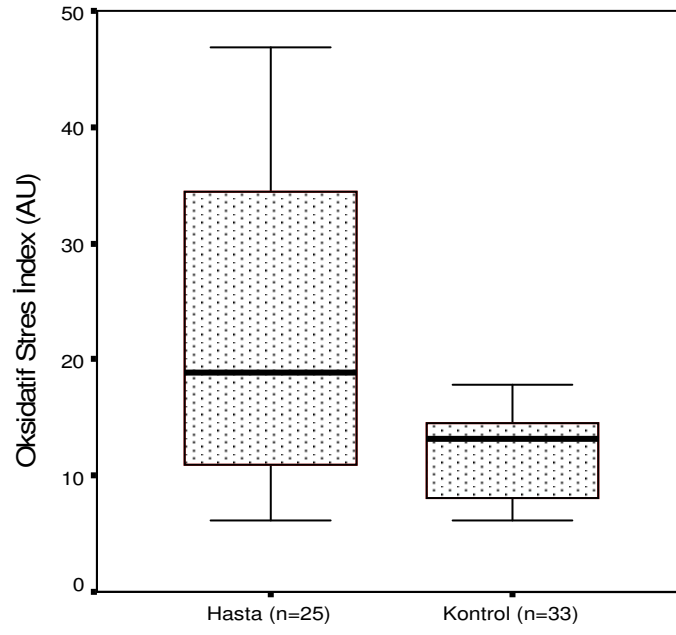




**Şekil 10:** Hasta ve kontrol gruplarında Total Antioksidant Kapasite seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



**Şekil 11 :** Hasta ve kontrol gruplarında plazma Protein Oksidasyonu seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları



**Şekil 12:** Hasta ve kontrol gruplarında Oksidatif Stres Index seviyeleri arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer tüberkülozu kronik bir enfeksiyondur ve M.tuberculosis'n neden olduğu nekrozitan bir hastalıktır (81). Son zamanlarda M-TB enfeksiyonu ve kanser arasındaki ilişki dikkat çekmekte ve bu konuda çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, akciğer tüberkülozlu hastalarda akciğer kanseri riskinin anlamlı bir şekilde yükseldiği bildirilmiş fakat etiopatogenezi ile ilgili yeterince araştırma yapılamamıştır. Etiopatogenezi açıklamak için genelde üç ana mekanizma önerilmektedir.

- 1.Doku ve d crelerdeki enfeksiyöz ajanların direkt etkisi,
2. İmmün baskılayıcılar
3. ROS ve RNS  r nleri

Reaktif oksijen radikalleri tüberkülozda fagositoz sırasında savunma hattındaki makrofajlar tarafından bol miktarda üretilmekte ve üretilen ROS DNA hasarına neden olabilmektedir (5). Yapılan çalışmalarda da DNA hasarı ile kanser oluşumu arasında direkt bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir.

Son yıllarda çok sayıda çevresel ve enfeksiyöz nedenlerin sebep olduğu genetik hasarın incelenmesinde kullanılan metodlarda mononükleer lökositler geniş bir şekilde kullanılmaktadır (28). DNA hasarının ölümü için kullanılan çeşitli metodlar dan biri olan sigle-cell jel elektroforezi ( comet assay) DNA da meydana gelen dal kırılmalarının  l lmesi için kullanılan çok duyarlı ve g cl  bir metottur. Bizde  alışmamızda DNA hasarının ölümü için bu metodu kullandık (30).

Biz  alışmamızda aktif ve kronik akciğer tüberkülozlu hastalarda mononükleer hücre DNA hasarı ile oksidatif stres parametrelerini ölçerek hastalık ile DNA hasarı ve oluşan hasarın oksidatif stres ile olan ilişkisini araştırdık ve DNA hasarının kronik akciğer tüberkülozu olan hastalarda önemli derecede arttığını, DNA hasarı ile oksidatif stres arasında g cl  bir ilişkinin olduğunu bulduk.

V cudtaki hücrelerin yeterli derecede farklılaşmaya uğramaksızın, kontrolsüz ve hızlı bir şekilde bölünmeleri ile kendini gösteren ve patolojik bir durum olan kanserin başlangıcında ve ileriki safhalarında oksidatif DNA hasarının etkili olması nedeniyle Oksidatif DNA hasarı büyük öneme sahiptir.Bu hasarlanmanın ardından kromozom yıkılması ve yeniden düzenlenmesi, mitoz kontrolü bozulmuş bir fenotipin üretilmesine yol açmaktadır. DNA'nın nükleik

asitleri ile reaksiyona giren serbest radikaller, DNA zincirinde kırılmalar meydana getirmekte ve bu hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesine yol açmaktadırlar .

Yapılan çalışmaların çoğunda akciğer kanserinin ortaya çıkmasıyla birliktelik gösteren diğer akciğer hastalıkları arasında ilişki olabileceği gözlemlendi. Gansu Province ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (153), Çin de ocak 1994 ve nisan 1998 yılları arasında akciğer kanseri tanısıyla 656 erkek ve 230 kadın toplam 886 hasta üzerinde yapılan çalışma da, kronik bronşit, amfizem, astım, pnömoni, tüberküloz gibi primer akciğer hastalıkları ve bozulan akciğer fonksiyonlarının akciğer kanseri riskini genel olarak yükselttiği gözlemlenmiştir (55,72). Oksidatif strese; organizmanın antioksidan savunma sistemini oluşturan enzimlerin adaptif cevap ile uyarıldıkları bilinmektedir (96,97,98,99). Aerobik organizmaların, mutasyonlardan korunabilmeleri ve yaşamlarını devam ettirebilmeleri için DNA onarım enzimlerinin doğru fonksiyon yapmaları mutlaka gereklidir. Düşük düzeylerde oksidatif DNA hasarı minimal hata riski ile etkin bir şekilde onarılabilmektedir. Ancak, DNA onarım enzimleri ve DNA polimeraz'ın oksidatif stres altında hasarlanmaları doğru replikasyon ve transkripsiyon olasılığını azaltmaktadır. Onarım tamamlanıncaya kadar, hücreler bölünmelerini genellikle durdurarak kendilerini korumaktadırlar. DNA'daki oksidatif hasar yaşam ile bağdaşmayan yüksek düzeylere ulaştığında hücre ölümü (apoptoz) veya genotoksik hasarlar gerçekleşmektedir (104,105,103). DNA'da dal kırıklarının oluşumundan sonra DNA onarım mekanizmasının bir komponenti olan NAD<sup>+</sup> bağımlı poli ADPriboz polimeraz enzimi (PARP) aktive olmakta ve DNA hasarı belirli bir düzeyi aştığında aşırı NAD<sup>+</sup> ve ATP tüketimi sonucunda hücre ölüme gitmektedir (77,79,80).

Proteinler oksidantlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir. Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar, lipit ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilmektedir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinlerde dahil olmak üzere diğer hücresel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açar(100,101). ROS,

direkt olarak proteinlerüzerine etki ederek oksidize aminoasitlerin oluşumuna yol açtıkları gibi, indirekt yolla karbonhidrat ve lipidlerin otooksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif karbonil bileşiklerinin (RCO) etkisi ile de ileri glikasyon son ürünlerine (AGE) ve ileri lipoksidasyon son ürünlere (ALE) dönüşürler (85). Pek çok sayıda mekanizmanın protein oksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir (100,101). Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar: PCO oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, 3- nitrotirozin (3-NT), ditirozin (diTyr), oluşumu olarak sıralanabilir(100,102). Potansiyel olarak bütün amino açıl yan zincirleri oksidatif modifikasyona uğrayabilme özelliğindedir. Bu yüzden, çok sayıda ve farklı çeşitte oksidatif protein modifikasyonu olmasına bağlı olarak, protein oksidasyonunun tek bir evrensel belirtici yoktur. Bazı oksidatif protein modifikasyonları, hem oksidasyona uğrayan amino asit bakiyesi, hem de oluşturulan ürünler bakımından gayet spesifikdir. Bazı oksidatif protein modifikasyonlar ise global özellik taşır, çok sayıda amino asit bakiyesinde değişikliğe yol açarak, yine çok sayıda ürün oluşturabilir (100).

Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipidler en hassas olanlarıdır. Oksijen radikalleri poliansatüre yağ asitlerine etkiyerek lipid peroksidasyonuna yol açarlar. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları,serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilirler. Lipid proksidasyonu, serbest radikallerin poliansature yağ asitlerinin metilenik karbonlarından hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atakla başlar ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür. Hasarlı dokularda lipid peroksidasyonu sağlıklı olanlardan daha hızlı ilerler. Bu dokularda peroksidasyona yatkınlıktaki artış, antioksidanların inaktivasyonunun ve metal iyonlarının (Fe ve Cu) hücre içinden serbestleşmesinin neticesidir. Metal iyonları lipid peroksitlerin sitotoksik ürünlere değişimini kolaylaştırır (156).

Demir, lipid peroksidasyonunda zincir reaksiyonunun başlangıcında önemli rol oynar ve süperoksit ve hidrojen peroksidin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalizler (157) .

Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşur. Bu bileşikler, hücre düzeyinde metabolize edilirler veya diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayabilirler. Üç ya da daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asidlerinin peroksidasyonu, malondialdehid (MDA) meydana getirir. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, ancak lipid peroksidasyonunun derecesi ile korelasyon gösterir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (156,157). Yapılan çalışmalarda plazma MDA düzeyleri yüksek bulunmuş, lipid peroksidasyon ürünlerinin DNA hasarına sebep olabileceği rapor edilmiştir. Lipid hidroperoksitleri direk olarak DNA'da zincir kopmalarına ve lipid peroksil ve alkoksil radikalleri ise DNA'da baz oksidasyonuna sebep olabilmektedir (154,66). Kronik akciğer tüberkülozlu hastalarda LPO düzeylerinin yüksekliği etki eden serbest radikallere bağlı olabileceği gibi primer veya sekonder antioksidan enzim sistemlerinin bozulmasına da bağlı olabilir (155,7).

Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için insan serum, eritrosit ve dokularında genel olarak antioksidanlar diye adlandırılan bir defans mekanizması mevcuttur. Tüm vücuttaki antioksidan durumu değerlendirmek için total antioksidan kapasite ölçümleri yapılmaktadır. Antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunabilirler ve oksidanlara karşı birlikte hareket ederler. Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri korurlar. En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu  $H_2O_2$ 'ye dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve  $H_2O_2$ 'yi suya indirgeyen katalazdır. Süperoksit radikalının ortadan kaldırılmasında bu enzim sisteminin en önemlisi SOD' dur. Tümör oluşum

mekanizması üzerine yapılan son çalışmalarda tümör hücrelerinin süperoksid radikalleri üretebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle de birçok araştırmacı zarar görmüş tümör hücrelerinde temel antioksidan olan SOD ve katalazın düzeyini araştırmaya yönelmiştir. Jaruga ve ark. (158) insan akciğer kanseri dokusunda SOD ve katalaz aktivitesinde düşüş ve DNA lezyon düzeyinde artış tespit ederek olası kanser sebebinin serbest radikaller olduğunu yayınlamışlardır. Ülkemizde Güner (159) ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada süperoksid dismutaz ve katalaz enzimlerinin akciğer kanserinde tümörlü dokuda normal dokuya göre anlamlı bir şekilde düşük olduğunu göstermişlerdir. Onkogenlerin serbest oksijen radikalleri ile oluşan karsinogenezin her evresinde etkili olduğu düşünülürse antioksidan enzimlerin genleri antionkogenlerden biri olabilir ve karsinogenez sırasında bu genlerden birinin inaktivasyonu tümör gelişmesine neden olabilir. Bu konuda yoğun çalışmalar da yapılmaktadır. Diyetle alınan alfa-tokoferol lipid peroksidasyona karşı korur ve sonuçta steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabilir.

Bütün dünyada olduğu gibi ülkemizi de büyük ölçüde tehdit eden akciğer tüberkülozunun kanserle ilişkisini verilen bilgilere dayanarak büyük ölçüde açıklayabilmek için kontrol ve hasta gruplarında mononükleer lökosit DNA hasarı, total antioksidan kapasite, plazma MDA, protein oksidasyonu, total oksidant seviye ve oksidatif stres indeks seviyeleri ölçüldü. Yaptığımız çalışmalar sonucunda hasta grubunda mononükleer lökosit DNA hasarı, total oksidant seviye, oksidatif stres indeks, protein oksidasyonu ve plazma MDA seviyelerinin kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğunu görüldü. Bunun aksine hasta grubunda plazma total antioksidan kapasite seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi . Bu bulgular tüberkülozda oksidatif stresin büyük artış gösterdiğini ve antioksidanların ise düştüğünü göstermektedir. Artan oksidatif stres ile DNA hasarı arasında pozitif bir ilişkinin bulunması ölçülen DNA hasarının artan oksidatif stresin bir sonucu olabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca mononükleer lökosit DNA hasarı ile MDA, protein oksidasyonu, total oksidant seviye ve oksidatif stres indeks seviyeleri ile pozitif, total antioksidan kapasite seviyeleri ile negatif bir ilişkiye sahiptir. Total antioksidan kapasite seviyeleri ile MDA, protein oksidasyonu, total oksidant, seviye ve oksidatif stres indeks seviyeleri

arasında negatif bir ilişki mevcuttur. Plazma MDA seviyeleri ile protein oksidasyonu, total oksidant seviye ve oksidatif stres indeks seviyeleri arasında pozitif bir ilişki, Protein oksidasyonu ile total oksidant seviye ve oksidatif stres indeks seviyeleri arasında da pozitif bir ilişki ve son olarak da total oksidant seviye ve oksidatif stres indeks seviyeleri arasında pozitif bir ilişkinin mevcut olduğu görüldü.

Sonuç olarak, kronik akciğer tüberkülozlu hastalarda mononükleer lökosit DNA hasarının yüksek olması ve DNA hasarı ile oksidanlar arasındaki pozitif, antioksidanlarla negatif ilişkinin olması, kronik tüberkülozda konakçı defans mekanizması gereği üretilen oksidanların konakçı DNA'larında hasara neden olabileceği hipotezimizi desteklemektedir. Dolayısı ile akciğer kanser oluşum riskini azaltmak için akciğer tüberkülozu olan kişiler acilen ve etkili bir şekilde tedavi edilmelidir.



## 6. KAYNAKLAR

1. Drucker E, Alcibes P, Boswarth N, Schell B. Childhood tuberculosis in the Bronx; New York, Lancet 1994; 343: 1482-85
2. Yıldırım İ, Hacımustafaoğlu M, Ediz B. Correlation of tuberculin induration with the number of Basillus Calmette Guerin vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14:1060-63
3. Starke JR, Jacobs RF, Jereb J. Resurgence of tuberculosis in children. *J Pediatr* 1992; 120: 839-55
4. Starke JR. Tuberculosis. Injensen HB, Baltimore ES. In *Pediatric Infectious Diseases*, 2th.edition. 2002; 396-419
5. H.Ohshima, M. Tatemichi, T. Sawa, Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis, *Arch. Biochem. Biophys.* 417;2003: 267-272.
6. American Academy of Pediatrics. Tuberculosis In: Pickering LK, ed 2000 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 25th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics 2000: 593-613
7. Weiss SJ, Lo Douglio AF; Biology of disease phagocyte generated oxygen metabolites and cellular injury *Lab. Invest* 1982; 47: 5-18
8. Del Costello AM, Rook G. Tuberculosis in Children *Curr Opin Pediatr* 1995; 7: 6-12
9. Buu N, Sanchez F, Schurr E. The Bcg hostresistance gene. *Clin Infect Dis* 2000 ;31 Suppl 3:S81-5
10. Schaible UE, Kaufmann SH. CD1 molecules and CD1-dependent T cells in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity? *Semin Immunol* 2000;12:527-35
11. Starke JR, Munoz F. Tuberculosis In Behrman RE, Kliegman Jensen HB (ed) In *Nelson Textbook of Pediatrics* 16th edition WB Saunders, Philadelphia 885-896;2000.
12. Conti M, Marond PC, Levillion P, Lemonnici A. Improved Fluorometric Determination of Malonaldehyde: 1991; 37(7): 1273–5.
13. Cove AJE. The evidence for the incidence of tuberculosis in ancient Egypt. *Br J Tuberc* 1939; 33: 142

14. Prof.Dr. Kemal Balcı. Göğüs Hastalıkları. 3.Baskı Bölüm 17 Tüberküloz s: 191-254
15. Koçoğlu Ferit, Verem Savaşı, Hacettepe Üniversitesi Halk Sağlığı A.D. Yayını No: 86/136 s: 82 Ankara
16. Rauiglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. JAMA 1995; 273: 220-6
17. Prof.Dr. Cihangir Özkınay. 39.Türk Pediatri Kongresi 2003. Tüberküloz epidemiyolojisi Konuşma Metinleri ve Bildiri Özetleri s: 309-10
18. Vallejo JG, Ong LT, Starke JR. Clinical features, diagnosis, and treatment of tuberculosis in infants. Pediatrics 1994; 94: 1-7
19. Centers for Disease Control and Prevention Tuberculosis Morbidity-United States; 1992. MMWR 1993; 42: 696-704
20. Spence DPS, Williams CSD, Davies PDO. Tuberculosis and poverty. BMJ 1993; 307: 759-61
21. WHO. Who reports 10 million TB patients successfully treated “DOTS” 10 years after declaring TB a global emergency, 2003
22. WHO Report 2003. Global Tuberculosis Control
23. Starke JR. Tuberculosis in Children. Curr Opin in Pediatrics 1995; 7: 268-77
24. Yalçın I. Tüberküloz In: Neyzi O, Ertuğrul T edit. Pediatri 3.baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2002: 523-32
25. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Mikrobiyoloji 2000. Asya Tıp Yayıncılık Mycobacterium s: 174-83
26. Kinsburry D.T, Wagner GE, Gary PS. The National Medical Serais for Independent Study, 1985
27. Göçmen A. Çocukluk dönemi tüberkülozu. Katkı Pediatri Dergisi 1992; 13: 22-9
28. J.Cole, T.R. Skopek, International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens.Working paper no.3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo, Mutant. Res.304 :1994 :33-105.

29. American Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association. Diagnostic standarts and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 725-35
30. E.Rojas, M.C. Lopez, M Valverde, Sigle cell gel electrophoresis assay:medhodoxy and aplications, *J. Chromotogr. B* 722 :1999: 225-254.
31. Adler JJ, Rose DN. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. Boston: Little, Brown and Company; 1996: 129-40
32. Joint Tuberculosis Committee of British Thoracic Society. Control and prevention of tuberculosis in the United Kingdom: Sode of practice 1994. *Thorax*1994; 49: 1193-1200
33. Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics. *Genes Immun* 2003 ;4:4-11.
34. Buu N, Sanchez F, Schurr E.The Bcg hostresistance gene. *Clin Infect Dis* 2000 ;31 Suppl 3:S81-5
35. Ferguson JS, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant in innate immunity and the pathogenesis of tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 2000;80:173-84
36. Kocabaş A. Akciğer tüberkülozu, Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Cilt 1, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002:538- 91*
37. Starke JR. Tuberculosis In: Katz SL, Gershon AA, Holec PJ, eds *Krugman's Infectious Disease of Children 10th ed St.Louis Missouri: Mosby; 1998; 571-604*
38. Macallan D.C., Malnutrition and tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34:153–57
39. Maurya V, Vijayan VK, Shah A. Smoking and tuberculosis: an association overlooked. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002 ;6:942-51 understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res* 2001;2:157-63
40. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaş Daire Başkanlığı. *Yıllara Göre Veremli Hasta Sayısı ve Verem İnsidansı. 2000*
41. Flad HD, Grage-Griebenow E, Petersen F, Scheuerer B, Brandt E, Baran J, Pryjma J,Ernst M. The role of cytokines in monocyte apoptosis. *Pathobiology* 1999;67:291-3

42. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis: Annu Rev Immunol 2001;19:93-129
43. Somer A. Akciğer Tüberkülozunda Tanı. 3. Ulusal Çocuk Solunum Yolu Hastalıkları Kongresi Özet Kitabı 2004, s: 86-90
44. Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. Microbes Infect 2001 ;3:249-55. Poccia F, Agrati C, Ippolito G, Colizzi V, Malkovsky M. Natural T cell immunity to intracellular pathogens and nonpeptidic immunoregulatory drugs. Curr Mol Med 2001;1:137-51.
45. Van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. Clin Microbiol Rev 2002 ;15:294-309
46. Jacobs WR, Barletta WF, Udani R, et al. Rapid assesment of drugsusceptibilities of mycobacterium tuberculosis by means of luciferase receptor phages Science 1993; 31: 762
47. Elnor JJ, Hinman AR, Dooley SW, Fischl MA, Sepkowitz KA, Goldberger MJ, Shinick TM, Iseman MD. Tuberculosis symposium: emergining problems and promisc. J Infect Dis 1993; 168: 537-51
48. Coulter JBS. Tuberculosis. In: Campbell AGM, Mc Intosh N, eds.Forfar&Arneil's Textbook of Pediatrics 5th ed. Edinburgh: Churchill Livinstone; 1998: 1334-48
49. Delacourt C, Povedo JD, Churean C, et al. Use of polymerase chain reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children. J Pediatr 1995; 126: 703
50. Sedo E, Anguilair D, Torres M. Lipoarabinomannan antigenemia in patients with AIDS and tuberculosis. Presented at the 31st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 1991
51. Turner M, Van Nerom E, Nyabendo J, et al. Determination of humoral immunglobulins M and G directed against mycobacterial antigens 60 failed to diagnose primary tuberculosis and mycobacterial adenitis in children. Am J Respir Crit Care Med 1994; 150: 1508-12
52. Delacourt C, Gobin J, Gaillard JL, de Blic J, Veron M. Value of ELISA using antigen 60 for the diagnosis of tuberculosis in children. Chest 1993; 104: 393-8

53. Lalvani A, Nagvenkar P, Vawadia Z, et al. Enumeration of T cells specific for Rdi-encoded antigens suggest a high prevalence of latent mycobacterium tuberculosis infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis* 2001; 183: 469-77
54. Wilkinson RJ, Llewelyn M, Toossi Z, Patel P, Pasvol G, Lalvani A, Wright D, Latif M, Davidson RN. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 2000;355:618–21.
55. Zheng W, Blot WJ, Liao ML et al. Lung cancer and prior tuberculosis infection in Shanghai. *Br J Cancer* 1987;56:501-04
56. Committee of Infectious Disease. Screening for tuberculosis in infants and children. *Pediatrics* 1994; 93: 131-4
57. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JB, Brant LJ, Schneider EL. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *J. Mutat Res.* 1990; 237(8):123–30.
58. Demirbag R, Yilmaz R, Gur M, Kocyigit A, Celik H, Guzel S, Selek S. Lymphocyte DNA damage in patients with acute coronary syndrome and its relationship with severity of acute coronary syndrome *J. Mutation Research* 2005; 135(4) 22–35.
59. Kocyigit A, Keles H, Selek S, Guzel S, Celik H, Erel O. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *J. Mutation Research* 2005; 124(5): 47–59).
60. Harma M, Harma M, Kocyigit A, Erel O. Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *J. Mutation Research* 2005; 583: 49–54.
61. Conti M, Marond PC, Levillion P, Lemonnici A. Improved Fluorometric Determination of Malonaldehyde: 1991; 37(7): 1273–5.
62. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. Clinical Biochemistry* 2005; 47(5): 119– 29.
63. Levine RL, Garland D, Olives CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 1990; 186: 464-478.
64. Lowy DF, Base R, Simo AA; Evidence for a high free radical state in low-grade astrocytomas. *Neurosurgery* 1997; 41:46-50

65. Nikiforova NV, Khodyreva LA, Kirpatovskii VI and et al; Lipid peroxidation malignant tumors of Human Kidneys. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2001; 5
66. Rao GM, Rao AV, Rajo A; Lipid peroxidation in brain tumors. *Clin Chim Acta* 2000; 302:205-11
67. Colditz GA, Berkey CS, Masteller F, Brewer TF, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV. The efficacy of bacillus Calmette Guerin vaccination of newborns and infants in the prevention of tuberculosis meta analysis of published literature. *Pediatrics* 1995; 69: 29-35
68. Dannenberg AM. Delayed type hypersensitivity and cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today* 1991; 12; 228-33
69. Camcıoğlu Y. Tüberküloz Epidemiyolojisi ve İmmunitesi In: *Türkiye Klinikleri Pediatri Özel Dergisi* 2004 Sayı: 2, s: 210-3
70. Ramachandra L, Noss E, Boom WH, Harding CV. Phagocytic processing of antigens for presentation by class II major histocompatibility complex molecules. : *Cell Microbiol* 1999 1:205-14 12. Schaible UE, Kaufmann SH. CD1 molecules and CD1-dependent T cells in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity? *Semin Immunol* 2000;12:527-35
71. Heldwein KA, Fenton MJ. The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes Infect* 2002 ;4:937-44. 13. Schluger NW. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Res* 2001;2:157-63
72. Mayne ST, Buensejo J, Janerich DT, Previous lung disease and risk of lung cancer among men and women nonsmokers. *Am J Epidemiol* 1999;149:13-20.
73. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press. Inc, London 1999.
74. Randerath K, Zhou GD, Monk SA, Randerath E. Enhanced levels in neonatal rat liver of 7, 8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidative DNA lesion. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1419-1421.

75. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003; 17: 1195-1214.
76. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays* 2004; 26: 533-542.
77. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 1991; 281: 9-19.
78. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat J-L. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 2003; 531: 5-23.
79. Li Y, Trush MA. Reactive O<sub>2</sub>-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res* 1994; 54: 1895S-
80. Winyard PG, Perrett D, Blake DR, Harris G, Chipman JK. Measurement of DNA oxidation products. *Anal Proceedings* 1990; 27: 224-227.
81. Karlıkaya C, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Tüberküloz ders notları, 1998
82. Mates JM, Gomez CP, Castro I (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochem.* 32, 8, 595-603.
83. Akkuş İ (1995): Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları., Konya.
84. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G (1991): Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin. Chem.*, 37, 11, 1932-1937.
85. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, et al. Alterations in non-enzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of “carbonyl stress” in longterm uremic complications. *Kidney Int*, 1999; 55,388-399.
86. Lohr BJ: Oxygen radicals and neuropsychiatric illness. Some speculations. *Arch. Gen Psychiatry* 1991;48:1097-1104.
87. McNicholl JM, Downer MV, Lidhayakumar V, et al. Host-pathogen interactions in emerging and reemerging infectious diseases: A genomic

- perspective of Tuberculosis, Malaria, Human Immunodeficiency Virus infection, Hepatitis B and Cholera. *Annu Rev Public Health* 2000; 21:15-46.
88. Bellamy R. Identifying genetic susceptibility factors for tuberculosis in Africans: a combined approach using a candidate gene study and a genome-wide screen. *Clin Sci* 2000; 98: 245-250.
  89. Niki E, (1987) : Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*, 44: 227-253.
  90. Kalender S, Kalender Y, Ögütçü A, Uzunhisarcıklı M, Durak D, Açıköz F, 2002 : Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats : the protective effect of vitamin E. *Toxicology*, 202: 227-235.
  91. Placer CA, Cushman LL, Johnson BC, 1990: Estimation of product of lipid peroxidation (Malondy Dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.*, 16: 259-264.
  92. Porter NA, 1984 : Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 105: 273-283.
  93. Matés JM, 2000 : Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153: 83-104.
  94. Kaya S, Piriñçi İ, Bilgili A, 1998 : Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. *Medisan Yayın Serisi*: 35, Ankara, s. 222, 232, 273, 276, 355.95. Cross C E. Halliwell B, Borish E T, et al. Oxygen radicals and human disease. *Ann Int Med* 1987;107:526-545.
  95. Asayama K, Nakane T, Uchida H, et al. Serum antioxidant status in streptozosin-induced diabetic rat. *Horm Metab Res* 1994;26:617-620.
  96. Corrocher R, Casaril M, Bellisola G, et al. Severe impairment of antioxidant system in human hepatoma. *Cancer* 1986;58: 1658-1662.
  97. Mantha S V, Prasad M Kaka J, Prasad K. Antioxidant enzymes in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in rabbits. *Atherosclerosis* 1993;101:135-144.
  98. McCoy R.N., Hill K E, Ayon M A, Stein J H, Burk R F. Oxidant stress following renal ischemia: Changes in the glutathione redox ratio. *Kidney Int* 1988;33:8127.
  99. Shacter E. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol* 2000; 319: 428-436.



100. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.
101. Çakatay U, Telci A. Oksidatif protein hasarı ve saptanmasında kullanılan marker'lar. *Tıp Fak Dergisi* 2000; 63: 314-317.
102. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Mol Med* 2003; 9: 169-176.
103. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press. Inc, London 1999.
104. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* 1991; 281: 9-19.
105. Winyard PG, Perrett D, Blake DR, Harris G, Chipman JK. Measurement of DNA oxidation products. *Anal Proceedings* 1990; 27: 224-227.
106. Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S, (2002) : The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med.*, 32: 822-832.
107. Urani C, Crippa S, Camatini M, (1998) : Cellular and molecular responses of metal-induced toxicity. *Toxicol. Lett.*, suppl. 1:195
108. Moncada S, Palmer RMJ, Higs EA. Nitric oxide. Physiology, pathophysiology and pharmacology. *J. Pharmacol Review* 1991; 43(29): 109–37.
109. Lancaster J. *Nitric oxide, principles and actions*. Copyright by Academic Press. Inc. California/USA. 1990.
110. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *J. Biochem.* 1994;298(12):249–58.
111. Gulcin I, Kufrevioglu O., Oktay M., Buyukokuroglu ME., 2004 . Antioxidant, Antimicrobial, Antiulcer And Analgesic Activities Of Nettle (*Urtica Dioica L.*). *J Ethnopharmacol.* 90(2-3):205-15.
112. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(7):123–5.

113. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982 Nov;47(5):412-426
114. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991 Sep 30; 91(3C): 14S-22S
115. Halliwell B. Oxygen is poisonous: The nature and medical importance of oxygen radicals. *J. Med Lab Sci.* 1984; 41(3):157-62.
116. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996 Jan;32A (1):30-38
117. Candeias LP, Patel KB, Startford MR, Wardman P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Lett* 1993 Oct 25;333(1-2):151-153
118. Bland JS. Oxidants and antioxidants in clinical medicine: Past, present and future potential. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine* 1995;5 (3) : 255 – 281
119. Ammes BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Sep 1;90(17 7915-7922
120. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri. Mimoza Basım, Yayım ve Eğitim A.Ş. Konya, 1995
121. Dean RT, Giese S, Davies MJ. Reactive species and their accumulation on radical damaged proteins. *TIBS*, 1993; 18:437-421.
122. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *J. Clin Chem.*1995; 42(6):18–19.
123. Ripine, JE., Bast, AL., 1997. Lipids I, And The Oxidative Strees Study Graup Oxidative Strees In Chronic Obstructive Pulmonary Disease *Am J Respir Crit Care Med* 156: 341-347.
124. Seven A., Candan G., 1995 Radikal ve Lipid Peroksid Düzeyini Artıran Etkenler. *Biyokimya Dergisi* 4:43-56.

125. Kim TW, Yang KS., 2001: Antioxidative Effects Of Cichorium Intybus Root Extract On Ldl (Low Density Lipoprotein) Oxidation. Arch Pharm Res. 24(5):431-6.
126. Davies KJA. Proteins damaged and degradation by oxygen radicals. J Biol Chem, 1987; 262:9895-9901.
127. Perinondi NI., Thomson W., Schmid Hho.,1990. Diabetic Heart And Kidney Exhibit Creased Resistance To Lipid Peroxidation. Biochim Et Biophys. Acta. 1047: 63- 9
128. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease Free radicals and tissue injury. Lab Invest, 1982; 47: 412-426.
129. Southorn PA. Free Radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions. Mayo Clin Proc, 1988; 63 : 381-389.
130. Dormandy TL. An Approach to Free Radicals. The Lancet, 1983; 29: 1010-1014.
131. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease, Am J Med, 1991; 91:14-21.
132. Candan F. “ Serbest Radikaller ve Etki Mekanizmaları”, Yük. Lis. Ders Notu :2001.
133. Cheeseman KH., Slater TF., 1993. An Introduction To Free Radical Biochemistry. Br.Med.Bull.49(3): 479-80.
134. Isbir, T., 1994. Antioksidan Sistemler.Endotel ,İzmir Tabip Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu,İzmir 92-98.
135. Liebler, CD., 1994. Antioxidand Reactions Of Carotenoids. Annals New York Academy Of Sciences. 20 – 30.
136. Santos-Gomes, PC., Seabra, RM., Andrade, PB., Fernandes-Ferreira, M., 2003. Chemical And Antioxidant Properties Of Laurocerasus Officinalis Roem. (Cherry Laurel)FruitGrown In The Black Sea Region.J Agric Food Chem. 3;51(25):7489-94.
137. Erel Ö., 2003. A novel Automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clinical Biochemistry 37:2004 112-119.

- 138.** Karakaya S., El SN., and Taş, AA., 2001. Antioxidant Activity Of Some Foods Containing Phenolic Compounds, *International Journal Of Food Sciences And Nutrition* 52. 501-508.
- 139.** Smith EL., Hill, RL., Lehmal R., 1983. *Principle Of Biochemistry*. 382 – 37<sup>th</sup> Cd- Mcbraw Hill, Inc. Usa. 86.
- 140.** 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.
- 141.** Mccord JM. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26(4): 351–7.
- 142.** Akkus İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1995; 5:1–3.
- 143.** Seven A, İnci F, Civelek S, Burçak G, İnci E, Korkut N. Larenks Kanserli Olgularda Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Statü Göstergelerinin Dokuda incelenmesi. *Türk ORL Arsivi* 1998; 36: 33–6.
- 144.** Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoids. *J. Nutr.* 1989; 119(6): 109-11.
- 145.** Rikans LE, Hornbrook LR. Lipid peroxidation, antioxidant and aging. *J. Biochim Biophys Acta* 1997; 1362(1):116–27.
- 146.** Muggli D.,1994. Physiological Requirements Of Vitamen E As A Function Of The Amount And Type Of Polyunsaturated Fatty Acid. *Fatty Acids Ana Lipids*. Vol 75, 166 – 168.
- 147.** Akaike T.; Sato K.; Kohno M.; Ando M.; Maeda, H. “Bactericidal Activity of Alkyl Peroxyl Radicals Generated by Heme-Iron-Catalyzed Decomposition of Organic Peroxides”, *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 55-63 (1992).
- 148.** Güler N. Çocuk tüberkülozunu nasıl tanıyalım? *Sürekli Tıp Eğitim Dergisi* 1997; 6: 13-16
- 149.** Hallwell B. Chirico S; Lipid peroksidation: Its Mechanism, Measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-725
- 150.** Guttridge JMC, Hallwell B; The measurement and mechanism of lipid peroksidation in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 1990; 15: 129-135

151. Murphy SC, Breman JG. Gaps in the childhood malaria burden in Africa: Cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia and complications of pregnancy. *J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 64(3): 57–67.
152. Aktuglu Y. Tüberküloz ders notları. 3. basım, 2. cilt, Cerrahpasa Tıp Fakültesi, İstanbul, 1992: 124-135
153. Alina V Brenner, Zuoyuan Wang, Ruth A Kleinerman, Longde Wang, Shouzhi Zhang, Catherine Metayer, Katherine Chen, Suwen Lei, Hongxing Cui and Jay H Lubin. Previous pulmonary diseases and risk of lung cancer in Gansu Province, China. *International Journal of Epidemiology* .2001;30:118-124
154. Liu X, Zhao JS, Zheng R; DNA damage of tumor-associated lymphocytes and total antioxidant capacity in cancerous patients. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2003 April
155. Jaund AF; Role of free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996; 32:30-38
156. Yang Mh., Schaich K., 1996. Factors Affecting Dna Damage Caused By Lipid Hydroperoxides And Aldehydes. *Free Radical Biol Med*(20)1:225-236.
157. Salin ML., McCoard JM., 1975. Free Radical And Inflammation;Protection Of Phagocytosing Leukocytes By superoxide Dismutase. *J Clin Invest* 56, 1319-1323.
158. Tang ZP. Observation on the activity of superoxide dismutase and catalase of alveolar macrophage in patient with lung cancer. *Chung- Hua-Chieh-Ho-Ho-Hu Hsi-Taa-Chih* 1991; 14:213-215.
159. Güner G, İşlekel H, Oto Ö, Hazan E, Açikel Ü. Evaluation of some antioxidant enzymes in lung carcinoma tissue. *Cancer Letters* 1996;103:233-239.