







Long-Term Investigation of Total Oxidant and Antioxidant Levels in COVID-19 Patients

COVID-19 Hastalarında Total Oksidan ve Antioksidan Düzeylerinin Uzun Vadeli Araştırılması

Şeyda Nur DAĞLI¹ , Tuba ÖZGÖÇER¹ , Hakim ÇELİK¹ , Seyhan TAŞKIN¹ ,
Abdullah TAŞKIN² , Mehmet Reşat CEYLAN³ 

¹Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, TÜRKİYE

²Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Şanlıurfa, TÜRKİYE

³Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Şanlıurfa, TÜRKİYE

Öz.

Amaç: Koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19), tehlikeli küresel bir pandemi olarak tüm dünyada yüksek morbidite ve mortaliteye yol açmıştır. Oksidatif stres, proteinler, lipitler ve DNA üzerinde güçlü etkilere sahip olup, çeşitli hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. Bu nedenle oksidatif stresin; nörodejeneratif, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve metabolik sendrom gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. COVID-19'da oksidatif stresin olası rolüne dair birçok kanıt bulunmasına rağmen hastalık seyri boyunca nasıl değiştiği bilinmemektedir.

Materyal ve metod: Bu çalışmaya hafif, orta ve şiddetli semptom gösteren 18 kadın, 25 erkek olmak üzere toplam 43 COVID-19 hastası dahil edilmiştir. Hastalardan; 15. gün, 30. gün, 45. gün ve 60. gün olmak üzere 4 defa venöz kan örnekleri alınıp; serumlarında MDA, Protein karbonil, total antioksidan ve total oksidan düzeyleri ölçülmüştür.

Bulgular: Erkeklerde 45. ve 60. günlerdeki total antioksidan düzeyleri kadınlara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Total oksidan düzeyleri şiddetli semptomu olan hastalarda diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Hastalar yaşlara göre kıyaslandığında ise MDA, PC ve total oksidan düzeyleri 47 yaşının üzerinde olan hastalarda 47 yaşın altındaki yaş gruplarına göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Sonuç: COVID-19'un oksidatif strese neden olduğu ve bu durumun membran yapısını bozma, inflamasyon, apoptoz ve semptomların daha şiddetli olmasına neden olacağı kanaatindeyiz. Bu nedenle COVID-19 hastalarına özellikle 47 yaşın üzerindeki erkek hastalara etkili tedavi stratejilerinden biri olarak antioksidan maddelerin uygulanması önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, Oksidatif stres, Total antioksidan, Total oksidan

Abstract

Background: The coronavirus disease 2019 (COVID-19), as a dangerous global pandemic, has caused high morbidity and mortality all over the world. Oxidative stress has strong effects on proteins, lipids and DNA, causing disruption of various cellular functions. Therefore, oxidative stress; It has been shown to play a role in the pathogenesis of many diseases such as neurodegenerative, cardiovascular diseases, diabetes and metabolic syndrome. Although there is plenty of evidence for the possible role of oxidative stress in COVID-19, it is unknown how it changes over the course of the disease.

Materials and Methods: A total of 43 COVID-19 patients, 18 women and 25 men, with mild, moderate and severe symptoms were included in this study. From patients; Venous blood samples were taken 4 times on the 15th day, 30th day, 45th day and 60th day; MDA, Protein karbonil, Total antioxidant and total oxidant levels in their serum were measured.

Results: Total antioxidant levels on the 45th and 60th days in men were found to be statistically significantly higher than in women ($p<0.05$). Total oxidant levels were found to be statistically significantly higher in patients with severe symptoms compared to other groups ($p<0.05$). When the patients were compared according to age, MDA, PC and total oxidant levels were found to be significantly higher in patients over 47 years of age compared to those under 47 years of age ($p<0.05$).

Conclusions: We are of the opinion that COVID-19 causes oxidative stress and this will cause membrane structure disruption, inflammation, apoptosis and more severe symptoms. For this reason, it can be recommended to apply antioxidant substances to COVID-19 patients, especially male patients over the age of 47, as one of the effective treatment strategies.

Keywords: COVID-19, Oxidative stress, Total antioxidant, Total oxidant

Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Dr. Şeyda Nur DAĞLI

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı,
Osmanbey Kampüsü,
Şanlıurfa, Türkiye.

E-mail: seyda_dgl@hotmail.com

Geliş tarihi / Received: 01.04.2022

Kabul tarihi / Accepted: 13.04.2022

DOI: 10.35440/hutfd.1096787

Giriş

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2), 2019 Coronavirus hastalığının (COVID-19) nedeni olup, ilk vakalar Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkmıştır (1). 20 Ekim 2020 itibarıyla COVID-19, dünya çapında yaklaşık 41 milyon insanın enfekte olduğu 1.122.758'den fazla insanın ölümüne neden olduğu kayıt edilmiştir. Ölümün giderek artması sonucunda 11 Mart'ta Dünya Sağlık Örgütü tarafından pandemi ilan edilmiştir (2). Klinik olarak, SARS-CoV-2 ile enfekte olan hastaların çoğu minimal semptomatik veya asemptomatik seyrederken, hastaların %5'inde ciddi akciğer hasarı ve/veya çoklu organ yetmezliği görülür (3). COVID-19, kandaki yüksek sitokin, kemokin ve C-reaktif protein seviyeleri ile kanıtlandığı gibi, aşırı inflamatuvar yanıtlara yol açan anormal konakçı bağışıklık yanıtı ile karakterizedir ve solunum sisteminde ciddi hasar ile ilişkilidir (4-6). Temel olarak, SARS-CoV-2 enfeksiyonundan etkilenen bağışıklık sistemi yanıtının iki aşaması vardır. Birincisi, virüsü ortadan kaldırmak ve hastalığın ilerlemesini engellemek için gerekli olacak spesifik adaptif bağışıklık tepkisidir. Diğeri ise, belirleyici ve önemli olan bağışıklık tepkilerini (anti-serum veya pegile IFNa) artırmaktır (7). Başka bir bakış açısına göre, solunum yolu kaynaklı viral COVID-19 enfeksiyonlarının çoğu inflamasyon, sitokin üretimi, hücre ölümü ve oksidatif stresin neden olduğu diğer patofizyolojik süreçlerle güçlü bir uyum içinde olabilir (8-10).

Oksidatif stres (OS), reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidanlar arasında oksidanlar lehine bir dengesizlik olarak tanımlanır. Bu da redoks sinyalleme bozulmasına ve/veya lipitler, deoksiribonükleik asit (11) veya proteinlerde geri dönüşü olmayan oksidatif hasara yol açar (12). Oksidatif hasarlar, kanser, kardiyovasküler, nörodejeneratif ve akciğer hastalıkları gibi farklı patolojilerin gelişiminde rol oynar (13). Oksidatif stresin HIV 1, viral hepatit B, C ve D virüsleri, herpes virüsleri, korona virüsleri gibi solunum virüsleri dahil olmak üzere çok çeşitli viral enfeksiyonlar tarafından tetiklendiği bilinmektedir. Birçok viral, bakteriyel ve parazitik enfeksiyonun ROS ve akciğer dokusu hasarı ve epitelyal bariyer disfonksiyonu ile ilişkili reaktif nitrojen türlerinin üretimini tetiklediği açıkça anlaşılmış olsa da, COVID-19 progresyonuna katkıda bulunan OS'in moleküler inflamasyon mekanizmalarını anlamak, hastalarda tedavileri iyileştirmek için gerekli bir ihtiyaç olmuştur. Oksidatif stresin, yakın zamanda COVID-19'da kilit bir rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (8, 14). SARS-CoV-2 bağlanmasından sonra ACE2 biyoyararlanımındaki azalma, Anjiyotensin (Ang) II'nin, NADPH oksidaz aktivasyonuna neden olur. Bu durum OS ve inflamatuvar yanıtları indükleyen sinyallere aracılık eder. Oksidatif stresin artması COVID-19'un semptomlarının şiddetine katkıda bulunur (15, 16). Yapılan çalışmalarda NADPH oksidaz-2'nin hastanede yatan COVID-19 hastalarında aşırı eksprese edildiği ve OS'in artmasına neden olduğunu gösterilmiştir (17). Bu sonuçlarla uyumlu olarak, diğer araştırmacılar makrofajlarda NADPH

oksidaz-2'nin blokajının OS'te azalma sayesinde hastalık fenotiplerini iyileştirdiğini göstermişlerdir (18).

Biz bu çalışmada, COVID-19 enfeksiyonu sonrası farklı zaman aralıklarında total oksidan ve total antioksidan düzeylerini; protein ve lipitlere yönelik oksidatif hasarlar belirteçlerini araştırmayı, oksidatif stresin yaş ve cinsiyet bakımından karşılaştırılmasını ve bazı spesifik semptomlarla ilişkisini ortaya koymayı amaçladık.

Materyal ve Metod

Çalışma protokolü ve örneklerin toplanması

Çalışma protokolü Helsinki deklarasyonu ilkelerine uygun olarak kurumsal bilimsel etik komitesi (Harran Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Tarih: 19/11/2021 Karar No: HRU/21.21.21) tarafından onaylandı. Katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam formu alındıktan sonra 18 kadın ve 25 erkek olmak üzere toplam 43 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastalara COVID-19 ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) (n = 40) veya klinik gözlem (n = 3) ile COVID-19 teşhisi koyuldu. Standart prosedürlerle bir nazofaringeal sürüntü toplandı ve COVID-19'un varlığı RT-PCR testi ile belirlendi. COVID-19 tanısı konulan hastalarla bireysel olarak görüşülerek semptom başlangıç tarihleri kaydedildi. Hastanın semptom başlangıç günü 0 olarak kabul edildi. Venöz kan örnekleri 15, 30, 45 ve 60. günlerde alındı ve örnekleri 1500(x)g de 10 dk santrifüj edildikten sonra serumları ayrılarak çalışma zamanına kadar -86 °C'lik derin dondurucuda saklandı. Alınan kan örnekleri sırasıyla 15. gün için 1, 30. gün için 2, 45. gün için 3 ve 60. gün için 4 olacak şekilde kodlandı. Buna göre 15., 30., 45., 60. gün MDA düzeylerinin ifadesi için sırasıyla MDA 1, MDA 2, MDA 3, MDA 4 şeklinde sınıflandırıldı. Katılımcılar ile uzman hekimin hastalarla birebir görüşmesinden elde edilen demografik bilgiler, cinsiyet, yaş, vücut kitle indeksi (BMI), hastalık derecesi ve hastalık belirtileri hazırlanan bilgi formu kullanılarak kaydedildi (Tablo 1). Hastalar, hastalık derecesi bakımından Düşük (hastalığı 1-2 gün ayakta çok hafif geçiren), Orta (hastalığı 3-5 gün evde dinlenerek geçiren) ve Yüksek (hastalığı hastanede yatışı yapılarak geçiren) olmak üzere 3 farklı gruba ayrılarak sınıflandırıldı.

Total Antioksidan Kapasite (TAS) Tayini

Total antioksidan tayini Erel yöntemine göre bir mikro-plaka okuyucu (Varioskan Lux, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak yapıldı. Bu yöntemde fenton reaksiyonunda, demir iyonu çözültüsü ile hidrojen peroksit çözültüsünün karıştırılmasıyla hidroksil radikali üretildi. Reaktif-1'de bulunan demir iyon çözültüsü, reaktif-2'de bulunan hidrojen peroksit çözültüsü ile karıştırıldı. Bu karışımda, hidroksil radikali tarafından üretilen kahverengi renkli dianisidinil radikal katyonu gibi radikaller oluşturuldu. Oluşan hidroksil radikalinin başlattığı güçlü serbest radikal reaksiyonlarına karşı numunenin antioksidatif etkisi ölçüldü. Bu analiz Trolox ile kalibre edildi ve Trolox eşdeğeri (mmol Trolox Equiv/L) olarak ifade edildi (20).

Tablo 1. COVID-19 hastalarının demografik bilgileri ve klinik karakterleri

COVID-19 hastalarının özellikleri	(n)
Toplam hasta sayısı	43
Semptom gösteren	43
Semptom göstermeyen	0
Semptom derecesi sınıflandırması	(n)
1 (düşük)	5
2 (orta)	21
3 (şiddetli)	17
Semptomlar	(n)
Öksürük	34 (%79.0)
Ateş	37 (%86.0)
Nefes darlığı	35 (%81.3)
Baş ağrısı	29 (%67.4)
Terleme	29 (%67.4)
Karın ağrısı	21 (%48.8)
İştah kaybı	26 (%60.4)
Erkek cinsiyet (%)	25 (%58.1)
Kadın cinsiyet (%)	18 (%41.9)
Yaş, medyan (min-max)	40.0 (19–57)
Yaş sınıflandırması	(n)
Yaş 1 (>36)	19
Yaş 2 (37-46)	13
Yaş 3 (47-57)	11
VKI* sınıflandırması	(n)
1 (Normal)	18
2 (Fazla kilolu)	17
3 (Tip 1 obez)	6
4 (Tip 2 obez)	2

*VKI: Vücut kitle indeksi

Total Oksidan Kapasite (TOS) Tayini

Total oksidan tayini Erel yöntemine göre bir mikro-plaka okuyucu (Varioskan Lux, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak yapıldı. Numunede bulunan oksidanlar, ferröz iyon-odanisidin kompleksini ferrik iyonuna oksitler. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri tarafından güçlendirilir. Ferrik iyon, asidik bir ortamda ksilenol orange ile renkli bir komplekse dönüştürülür. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, numunede bulunan toplam oksidan molekül miktarı ile ilişkilidir. Bu analiz H₂O₂ ile kalibre edildi ve H₂O₂ eşdeğeri (µmol H₂O₂ Equiv/L) olarak ifade edildi (21).

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Hesaplanması

Oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan OSİ'nin hesaplanması için öncelikle TOS ve TAS seviyeleri belirlendi. Daha sonra OS indeksi şu formüle göre hesaplandı: OSİ (rasgele birimler) = TOS [(µmol H₂O₂ eşdeğeri/L) / TAS (mmol Trolox eşdeğeri/L)] × 100 (22).

Malondialdehid (MDA) Tayini

PUFA araşidonik asit ROS'lar ile etkileşime girerek sonunda MDA, 4-hidroksi-2- nonenal (HNE) ve F2-izoprostanlar gibi diğer reaksiyon ürünlerini oluşturmak üzere peroksitlenir. ROS'un lipitlerle özel reaksiyonu genellikle "lipit peroksidasyonu" olarak bilinir. MDA, HNE ve F2-izoprostanlar, OS'in, yani lipit peroksidasyonunun yaygın olarak kabul edilen biyobelirteçleridir. MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) reaktivitesi ile ölçümü, lipit peroksidasyonunu değerlendirmede en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Serum MDA düzeyleri, Deaper ve Hadley'in geliştirmiş oldukları yöntem modifiye edilerek ölçüldü. Serum ve doymuş bir TBA reaktifi çözeltisi, kaynar su banyosunda 15 dk boyunca pH 1.5'te ısıtıldı. Soğutulduktan sonra süpernatantın absorbansı 532 nm'de spektrofotometrik (Thermo Scientific Varioskan Lux, ABD) ölçüldü. MDA-TBA kompleksinin bu dalga boyundaki molar ekstinksiyon katsayısından (1.56x10⁵ M⁻¹ cm⁻¹) faydalanılarak, nmol/ ml cinsinden MDA konsantrasyonları hesaplandı (23).

Protein Karbonil (PC) Tayini

Protein karbonilasyonu, ROS'lar tarafından teşvik edilebilen bir tür protein oksidasyonudur. Genellikle, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile hidrazonlar oluşturmak üzere reaksiyona girebilen reaktif ketonlar veya aldehitler oluşturan bir işlem ifade eder. Diğer amino asitlerin yanı sıra lizin, arjinin, prolin ve treonin kalıntılarının yan zincirlerinin "birincil protein karbonilasyonu" reaksiyonunda doğrudan oksidasyonu, DNPH ile saptanabilir protein ürünleri üretir. Bu çalışmadaki protein karbonil düzeyleri, DNPH reaksiyonu ile manuel olarak analiz edildi. Analiz, protein hidrazon oluşturmak için DNPH ile protein karbonil arasındaki reaksiyonun spektrofotometrik tespiti ile yapıldı. Karbonil içeriği nmol/mg protein olarak belirlendi. Toplam protein ölçümleri ise Thermo Scientific µDrop Plate kullanılarak ölçüldü (24).

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz, SPSS Statistics yazılım versiyonu 25 (IBM SPSS Inc.) kullanılarak yapıldı. Dağılımın normalliğini test etmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren veriler ortalama ± standart sapma şeklinde, normal dağılım göstermeyen veriler (belirtilerin süresi) median (IQR) şeklinde yazıldı.

Normal dağılan verilerdeki gruplar arası çoklu karşılaştırmalar için one way ANOVA kullanılırken grup içi ikili karşılaştırmalar için Tukey HSD testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen verilerin gruplar arası çoklu karşılaştırmalar için Kruskal Wallis-H Testi, grup içi ikili karşılaştırmalarında ise Bonferoni düzeltmesi kullanıldı. Parametreler arasındaki korelasyonlar Pearson korelasyon testi ile analiz edildi. p < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 2. Oksidatif stres parametrelerinin zaman dilimlerinde karşılaştırılması. Veriler median (IQR) olarak sunulmuştur

	15.gün	30.gün	45.gün	60.gün	p
TAS (mmol Trolox Eqv/L)	1.1 (0.2)	1.1 (0.3)	1.1 (0.3)	1.1 (0.2)	0.134
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv/L)	17.5 (13.8)	15.8 (11.2)	15.3 (9.9)	12.6 (11.3)	0.122
OSI (AU)	1.5 (1.6)	1.4 (1.2)	1.4 (0.9)	0.9 (1.4)	0.174
MDA (nmol/ml)	11.0 (6.3)	10.2 (7.1)	9.4 (6.8)	10.5 (8.4)	0.966
PC (nm/mg)	82.2 (56.8)	75.1 (46.7)	76.9 (53.2)	74.9 (57.4)	0.623

Günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0.05$). TAS: Total antioksidan düzeyi, TOS: Total oksidan düzeyi, OSI: Oksidatif stres indeksi, MDA: Malondialdehid, PC: Protein karbonil

Tablo 3. Oksidatif stres parametrelerinin kadın ve erkekler arasında kıyaslanması. Veriler median (IQR) olarak sunulmuştur

	Kadın (n=18)	Erkek (n=25)	p
TAS 1 (mmol Trolox Eqv/L)	1.06 (0.26)	1.22 (0.25)	0.10
TAS 2 (mmol Trolox Eqv/L)	1.17 (0.23)	1.22 (0.49)	0.61
TAS 3 (mmol Trolox Eqv/L)	1.05 (0.36)^a	1.26 (0.19)^b	0.01
TAS 4 (mmol Trolox Eqv/L)	1.05 (0.26)^a	1.23 (0.33)^b	0.04
TOS 1 ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv/L)	15.23 (12.24)	17.84 (14.75)	0.79
TOS 2 ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv/L)	13.98 (13.33)	17.61 (11.68)	0.69
TOS 3 ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv/L)	14.20 (11.41)	16.14 (10.18)	0.20
TOS 4 ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv/L)	13.71 (11.54)	12.42 (15.66)	0.47
OSI 1 (AU)	1.61 (1.29)	1.35 (1.77)	0.69
OSI 2 (AU)	1.14 (0.95)	1.57 (1.24)	0.21
OSI 3 (AU)	1.54 (0.99)	1.24 (1.25)	0.81
OSI 4 (AU)	1.26 (1.35)	0.91 (1.83)	0.76
MDA 1 (nmol/ml)	8.87 (4.08)	13.19 (8.58)	0.06
MDA 2 (nmol/ml)	9.34 (8.70)	10.62 (4.78)	0.37
MDA 3 (nmol/ml)	9.34 (8.17)	9.69 (6.83)	0.94
MDA 4 (nmol/ml)	8.76 (3.76)^a	15.30 (9.46)^b	0.02
PC 1 (nm/mg)	65.18 (44.90)	94.15 (75.34)	0.09
PC 2 (nm/mg)	66.07 (34.43)^a	92.46 (70.25)^b	0.02
PC 3 (nm/mg)	77.01 (49.03)	75.99 (58.30)	0.69
PC 4 (nm/mg)	68.82 (30.35)	91.98 (93.04)	0.18

Tabloda farklı harf bulunan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. TAS: Total antioksidan düzeyi, TOS: Total oksidan düzeyi, OSI: Oksidatif stres indeksi, MDA: Malondialdehid, PC: Protein karbonil

Tablo 4. COVID-19 semptom şiddetinin oksidatif stres parametreleri bakımından karşılaştırılması. Veriler median (IQR) olarak sunulmuştur.

	Düşük	Orta	Şiddetli
TAS 1 (mmol Trolox Eqv/L)	1.26 (0.43)	1.12 (0.33)	1.09 (0.30)
TAS 2 (mmol Trolox Eqv/L)	1.11 (0.30)	1.16 (0.27)	1.25 (0.58)
TAS 3 (mmol Trolox Eqv/L)	1.19 (0.35)	1.19 (0.28)	1.27 (0.49)
TAS 4 (mmol Trolox Eqv/L)	1.10 (0.27)	1.18 (0.19)	1.22 (0.45)
TOS 1 ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv/L)	9.04 (5.6)^a	17.9 (14.5)^b	19.14 (14.75)^b
TOS 2 ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv/L)	16.14 (10.23)	15.45 (18.41)	17.39 (10.19)
TOS 3 ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv/L)	11.85 (11.42)	16.14 (15.64)	16.08 (9.41)
TOS 4 ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eqv/L)	9.90 (14.85)	12.47 (15.67)	14.20 (50.95)
OSI 1 (AU)	0.71 (0.78)^a	1.58 (1.32)^b	1.86 (1.83)^b
OSI 2 (AU)	1.57 (1.22)	1.34 (1.30)	1.43 (1.31)
OSI 3 (AU)	1.01 (0.64)	1.60 (1.42)	1.35 (1.19)
OSI 4 (AU)	0.83 (1.75)	1.00 (1.61)	0.98 (1.37)
MDA 1 (nmol/ml)	14.36 (7.88)	9.57 (5.19)	11.56 (16.81)
MDA 2 (nmol/ml)	12.03 (29.37)	10.51 (8.17)	9.81 (6.39)
MDA 3 (nmol/ml)	9.28 (8.23)	9.34 (8.08)	10.39 (7.24)
MDA 4 (nmol/ml)	11.91 (70.92)	9.11 (8.29)	15.41 (8.99)
PC 1 (nm/mg)	95.51 (36.70)	65.18 (57.65)	85.85 (78.00)
PC 2 (nm/mg)	76.93 (31.39)	68.24 (57.68)	87.17 (55.61)
PC 3 (nm/mg)	77.44 (5.93)	81.11 (78.25)	61.13 (43.77)
PC 4 (nm/mg)	82.41 (42.73)	71.63 (46.48)	76.46 (114.19)

Tabloda farklı harf bulunan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0.05$). TAS: Total antioksidan düzeyi, TOS: Total oksidan düzeyi, OSI: Oksidatif stres indeksi, MDA: Malondialdehid, PC: Protein karbonil

Tablo 5. Yaş gruplarına göre oksidatif stres parametrelerinin karşılaştırılması. Veriler median (IQR) olarak sunulmuştur.

	≤36 (n=19)	37-46 (n=13)	47-57 (n=11)
TAS 1 (mmol Trolox Eqv/L)	1.19 (0.39)	1.06 (0.38)	1.09 (0.19)
TAS 2 (mmol Trolox Eqv/L)	1.16 (0.26)	1.01 (0.43)	1.30 (0.37)
TAS 3 (mmol Trolox Eqv/L)	1.19 (0.35)	1.06 (0.34)	1.26 (0.23)
TAS 4 (mmol Trolox Eqv/L)	1.13 (0.21)^a	1.19 (0.50)^a	1.23 (0.22)^b
TOS 1 (μmol H ₂ O ₂ Eqv/L)	15.19 (12.75)	20.00 (11.82)	15.45 (15.19)
TOS 2 (μmol H₂O₂ Eqv/L)	12.88 (10.12)^a	19.71 (17.84)^{ab}	17.61 (9.53)^b
TOS 3 (μmol H ₂ O ₂ Eqv/L)	12.94 (10.22)	15.00 (10.47)	19.61 (6.91)
TOS 4 (μmol H ₂ O ₂ Eqv/L)	12.61 (13.99)	14.43 (10.50)	11.90 (25.34)
OSI 1 (AU)	1.32 (1.37)	2.08 (1.45)	1.32 (1.46)
OSI 2 (AU)	1.07 (1.07)	1.65 (2.29)	1.47 (1.15)
OSI 3 (AU)	1.18 (1.01)	1.60 (1.86)	1.51 (0.65)
OSI 4 (AU)	1.00 (1.42)	1.02 (1.71)	0.97 (2.12)
MDA 1 (nmol/ml)	11.68 (5.08)	11.38 (13.40)	10.68 (7.50)
MDA 2 (nmol/ml)	10.57 (8.32)	12.20 (28.79)	9.46 (4.58)
MDA 3 (nmol/ml)	9.11 (8.76)	10.04 (8.08)	9.75 (3.82)
MDA 4 (nmol/ml)	10.45 (9.28)^a	8.40 (3.73)^a	16.11 (10.92)^b
PC 1 (nm/mg)	63.96 (41.30)^a	95.01 (45.32)^b	105.05 (82.77)^{ab}
PC 2 (nm/mg)	63.91 (42.51)	81.62 (49.40)	98.99 (60.26)
PC 3 (nm/mg)	75.07 (39.85)	77.12 (54.00)	77.77 (85.62)
PC 4 (nm/mg)	77.24 (53.66)	79.43 (95.65)	64.06 (109.82)

Tabloda farklı harf bulunan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0.05). TAS: Total antioksidan düzeyi, TOS: Total oksidan düzeyi, OSI: Oksidatif stres indeksi, MDA: Malondialdehid, PC: Protein karbonil

Bulgular

COVID-19 hastalarının demografik bilgileri ve klinik karakterleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Günlere göre farklılıklar

Oksidatif stres parametrelerinin düzeyleri tüm zaman aralıklarında karşılaştırılması Tablo 2'de gösterilmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Cinsiyete göre farklılıklar

Oksidatif stres parametrelerinin kadın ve erkekler arasında kıyaslanması Tablo 3'de verilmiştir. Erkek hastalarda TAS 3 ve TAS 4 düzeyleri kadın hastalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p<0.05). Yine erkek hastalarda kadın hastalara göre MDA 4 düzeyi ve PC 2 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p<0.05).

Hastalık derecesine göre farklılıklar

Koronavirüs hastalığı geçirilirken gösterilen semptom şiddetlerine göre düşük, orta ve şiddetli semptomlu grupların OS bakımından karşılaştırılması Tablo 4'te yapılmıştır. COVID-19 hastalığını orta ve şiddetli semptomlarla geçiren bireylerin TOS 1 düzeyleri ve OSI 1 yüzdeleri, düşük şiddette semptom gösteren bireylerle

kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi (p<0.05).

Yaş gruplarına göre farklılıklar

Yaşa göre 36 ve altı, 37-46 arası, 47-57 arası grupların OS parametreleri bakımından kıyaslanması Tablo 5'te sunulmuştur. Buna göre, yaş aralığı 47-57 arasında olan hastalardan TAS 4 ve MDA 4 düzeyleri 47 yaşından daha

küçük olan hastalara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p<0.05). Yaşları 37-46 yaş aralığındaki bireylerde, TOS 2 düzeyleri diğer gruplara kıyasla anlamlı ölçüde yüksek bulundu (p<0.05). Son olarak PC 1 düzeyi 37-46 yaş aralığındaki hastalarda 37 yaşından küçük hastalara kıyasla ve 47-57 yaş aralığındaki bireylerde diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulundu (p<0.05).

VKİ'ye göre farklılıklar

Vücut kitle indeksi ile oksidatif stres parametrelerinin kıyaslanması yapılmıştır. Farklı VKİ'ye sahip COVID-19 hastalığı geçirmiş bireylerden alınan tüm zaman dilimindeki örneklerde ölçülen oksidatif stres parametre düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (p>0.05).

Korelasyonlar

Oksidatif stres parametreleri ile COVID-19 semptomları arasındaki korelasyon analizi yapılmıştır. Buna göre; nefes darlığı ile TAS 1 düzeyi arasında pozitif yönde istatistiksel anlamlılık (p=0.002 r=0.631), nefes darlığı ile TOS 2 düzeyi arasında negatif yönde (p=0.041, r=-0.450), OSI 2 düzeyleri ile arasında pozitif yönde istatistiksel anlamlılık bulundu (p=0.011, r=0.540). Baş ağrısı ile TOS 1 arasında pozitif (p=0.011, r=0.545) OSI 1 arasında negative yönde istatistiksel anlamlılık bulundu (p=0.04, r=-0.451).

Terleme ile TAS 1, TAS 2, TAS 4 ve OSI 1 arasında negatif yönde istatistiksel anlamlılık bulundu (sırasıyla; p=0.002 r=-0.654, p=0.035 r=-0.486, p=0.038 r=-0.493, p=0.025 r=-0.512). Karın ağrısı ile TAS 1, OSI 1 arasında negatif yönde istatistiksel anlamlılık bulundu (sırasıyla; p=0.003 r=-0.929, p=0.014 r=-854). İştah kaybı ile TAS 3 düzeyi arasında pozitif yönde istatistiksel anlamlılık bulundu

($p=0.042$ $r=0.530$). Öksürük ile MDA 1 arasında ($p=0.008$ $r=0.551$), iştah kaybı ile MDA 4 arasında pozitif yönde istatistiksel anlamlılık bulundu ($p=0.011$ $r=0.679$). Son olarak nefes darlığı ile MDA 1, MDA 3 arasında pozitif yönde istatistiksel anlamlılık bulundu (sırasıyla $p=0.044$ $r=0.494$, $p=0.006$ $r=0.621$).

Tartışma

COVID 19 hastalığı mitokondriyal disfonksiyona neden olmaktadır bu durum; oksijen ve enerji üretiminde nispi bir azalmaya ve ROS üretiminde artışa yol açar. Bu durumda süperoksit, H_2O_2 ve diğer reaktif türler esas olarak mitokondriyal solunum zinciri tarafından üretilir. Hidrojen peroksit, makrofajlarda, nötrofillerde ve endotel hücrelerinde proinflamatuvar sitokinleri NADPH oksidaz aracılığıyla aktive eden birçok genin ekspresyonuna neden olarak daha fazla süperoksit ve H_2O_2 üretir (14, 25). Ayrıca yayınlanan araştırmalar, COVID-19 mikrobiyotanın toksik gazlar hidrojen sülfür (H_2S) ve nitrojen oksit (NO) üretimi yoluyla mitokondriyal homeostaziyi bozduğunu göstermiştir (25). Bu süreçler nihayetinde COVID-19 hastalarında oksidatif hasara yol açar. Çalışmalar, insanlarda oksidatif hasarın meydana geldiğini ve demografik, fiziksel veya beslenme faktörlerinin ile ilişkili olduğunu göstermiştir (26). Bizim bulgularımız da bu sonuçlarla aynı doğrultuda olacak şekilde OS parametrelerinden TAS, TOS, MDA ve PC düzeylerinin yükseldiği görüldü. Bu bağlamda çalışmamızda ilk kez COVID-19 hastalarında MDA ve PC düzeylerinin yükseldiği tespit edildi. Özellikle erkeklerde OS parametrelerinin daha fazla arttığı tespit edildi. Yaptığımız çalışmanın sonucunda yaşlar arasında kıyaslama yapıldı ve 47 yaşından daha büyük hastalarda OS parametrelerinin daha fazla arttığı istatistiksel olarak saptandı. Aynı zamanda OS'in COVID-19 semptomlarının şiddeti ile kıyaslanmasında yüksek şiddette semptom gösteren hastalarda OS parametrelerinin daha fazla olduğu kaydedildi.

Oksidatif stres düzeyi erkek hastalarda daha yüksektir

Literatürde yapılan bazı analizler, COVID-19'a yakalanmada cinsiyet farkını değerlendirmek için yapılmıştır. Sistematik incelemede; erkekler ve kadınlar arasında COVID-19 teşhisi konmuş vakaların toplanmış prevalansının sırasıyla 55.00 (51.43-56.58, I2 =%99.5, $p<0.001$) ve 45.00 (41.42-48.57) olduğunu ortaya koydu. Bu, COVID-19'un erkeklerde kadınlardan daha yaygın olduğunu gösterir. Kanada, Ontario'da yapılan bir araştırma erkeklerin pozitif test verme olasılığının daha yüksek olduğunu göstermiştir. Pakistan'da COVID-19 vakalarının %72'si erkektir. Global Health 5050 verilerine göre, bu sayı COVID-19 teşhisi doğrulanmış vakaların sayısı ve hastalığa bağlı ölüm oranı, farklı ülkelerde erkekler arasında yüksektir (27). Yapılan başka bir çalışmada farelerde koronavirüsler üzerinde daha önce yapılan bazı araştırmalar, östrojenin koruyucu bir rolü olabileceğini öne sürmüştür. Östrojenler, artan sitokin

salınımına yol açan bağışıklık tepkisinin yükselme fazını bastırır (28). Yazarlar ayrıca, bir östrojen reseptör antagonisti ile tedavi edilen dişi farelerin, erkek farelerle neredeyse aynı oranda öldüğünü göstermiştir (29). Fizyolojik östrojen konsantrasyonlarının, östrojen reseptörleri ve mitojenle aktive olan protein kinaz ve nükleer faktör kappa B yolu tarafından manganez süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz ekspresyonunu aktive ettiğini göstermektedir. Oksidatif ve metabolik stresle ilişkili östrojen yoksunluğu üzerinde erken başlangıçlı östrojen tedavisi ile ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (30). Yaptığımız çalışmanın sonucu COVID-19 hastası olan erkeklerde kadınlara kıyasla daha fazla OS görülmesinin sebebini açıklamaktadır. Erkeklerin sosyal hayatta daha aktif olduğu düşünülürse COVID-19 virüsüne daha fazla maruziyeti sonucu erkeklerde COVID-19'un daha fazla olduğu normal görülsede, COVID-19 sebepli ölümlerin kadınlara kıyasla daha fazla olmasının sebebini; OS stresin daha fazla olmasından kaynaklı, inflamasyona ve apoptoza sebebiyet vererek birçok hastalıkların kökenini oluşturduğu düşünülebilir.

Bazı spesifik COVID-19 semptomları ile oksidatif stres düzeyleri arasındaki ilişkiler

Yapılan çalışmalar OS'in artması, COVID-19'un semptomlarının şiddetine katkıda bulunduğunu göstermiştir (15, 16). Bizim çalışmamızın sonucunda baş ağrısının TOS düzeyi; nefes darlığı, öksürük ve iştah kaybının MDA düzeyleri ile korelasyonunda pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunması; OS'den kaynaklı şiddetli semptomların bir açıklaması olarak görülebilir. Yapılan çalışmaların ve çalışmamız sonucunda OS'den kaynaklı inflamasyon, apoptoz ve COVID-19 virüsüne bağlı gelişebilecek semptom ile patolojilerin engellene bilmesi açısından bu hastaların antioksidan desteği almaları, özellikle 47 yaşının üzerindeki erkek hasta bireylere şiddetle tavsiye edilmektedir. Mevcut çalışma COVID-19 semptomları ile oksidatif stres parametrelerinden MDA ve PC arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk çalışmadır.

Semptom şiddeti artışı oksidatif stresi artırır

Yapılan çalışmalarda NADPH oksidaz-2'nin hastanede yatan COVID-19 hastalarında aşırı eksprese edildiği ve OS'in artmasına neden olduğunu gösterilmiştir (17). Bu sonuçlarla uyumlu olarak, diğer araştırmacılar makrofajlarda NADPH oksidaz-2'nin blokajının OS'deki azalma sayesinde hastalık fenotiplerini iyileştirdiğini göstermişlerdir (18). Bizim yaptığımız çalışmada OS parametreleri ile hastalarda görülen semptomlar arasında korelasyon analizi yapıldı. Bu analiz sonucu diğer çalışmalarla uyumlu olarak; öksürük ile MDA 1, iştah kaybı ile MDA 4; nefes darlığı ile MDA 1, MDA 3; baş ağrısı ile TOS 1 arasında pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olduğu saptandı. Bu durum bize semptomlar arttıkça OS'inde arttığı sonucuna ulaştırmıştır. Terleme ile TAS 1, TAS 2, TAS 4; karın ağrısı ile TAS 1 arasında negatif yönde korelasyonun istatistiksel

olarak anlamlı ölçüde olması ise antioksidan madde arttıkça semptomların azaldığı bilgisine ulaştırmıştır. Diğer bir yorumla semptomların artması OS'nin artmasına ve antioksidan maddelerin azalmasına neden olmuştur. Nefes darlığı ile TAS 1; iştah kaybı ile TAS 3 düzeyi arasında pozitif yönde istatistiksel anlamlı korelasyon bulunması ise bu semptomların antioksidan parametreleri arttırdığının bir göstergesidir. Nefes darlığı ve iştah kaybı semptomlarının MDA düzeyleri ile istatistiksel olarak anlamlı ölçüde pozitif korelasyonu; bu semptomların OS stresi arttırmasının bir sonucu olarak antioksidan parametrelerinin de arttığını düşündürmektedir. Genel olarak COVID-19 teşhisi konmuş hastalarda tüm semptomlarla beraber OS'in artması; başka kronik hastalığı olan bireylerde bu kronik hastalığın semptomlarında artış görülmesine neden olabilir. Bu durum COVID-19'un bireylerdeki ilerleyişinin şiddetli ve ağır olmasına sebebiyet verebilir. Buna göre, teşhis koyulan COVID-19 hastalarına güçlü antioksidan maddeler ile takviye yapılmasının koruyucu bir etki gösterebileceği öngörülmüştür.

Artan yaşla birlikte oksidatif stres düzeyi artar

Oksidatif stres hücrede endojen oluşumu ve birikimini sağlayarak; lipid, protein ve DNA oksidasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonu için MDA, protein oksidasyonunu için PC düzeylerinde artış görülür. Bu süreçler hücre içi hasara, hücre fonksiyonlarının bozulmasına, nihayetinde hücre ölümünün yaşlanma ve yaşa bağlı çeşitli kronik hastalıklarla ilişkilendirilmesine neden olur (31). Yaş artışı, COVID-19'a yakalanma riskini artırmakla birlikte, yaşlı hastalarda hastalık şiddetinin daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (32). Çalışmamızda yaş artışına bağlı olarak MDA 4 ve PC 1 düzeylerinde artış olduğu ilk kez tespit edilmiştir. Bulguların sonucunda COVID-19 hastalarında yaşa bağlı olarak semptomların daha şiddetli görülmesi hem yaşa bağlı olarak hem de COVID-19'un etkisi ile OS'in artmasından dolayı olduğu düşünülmektedir.

İnsanlar yaşlandıkça, glutatyon üretimi gibi antioksidan savunma mekanizmaları da tükenir ve buna bağlı olarak ROS artış, tüm hücrelerin nikotinamid adenin dinükleotid/nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NAD⁺/NADP) oranının düştüğü bir psödohipoksi durumuna girmesine neden olur (33, 34). Literatürde yaşlı hastaların en düşük NAD⁺ seviyelerine sahip olduğu, buna karşılık en düşük riske sahip olan bebekler ve çocuklarda en yüksek seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir (27, 32). Oksidatif stres ayrıca NAD⁺'ya bağımlı enzim olan poli ADP riboz polimeraz 1'i (PARP1) aktive eder. PARP1'in hiperaktivitesi, hücrel NAD⁺'in tükenmesine, ATP eksikliğine, enerji kaybına ve ardından hücre ölümüne yol açar. Bu süreçler, proinflatuar kaskadını geliştirme potansiyeline sahiptir (35). Bu bilgiler doğrultusunda yaşa bağlı olarak OS'in artmasını doğrular şekilde olan bulgularımız 47 yaşının üzerindeki koronavirüs hastalarında daha fazla OS'in görül-

mesini desteklemektedir. Artan yaşla birlikte RARP1 arttırma, NAD⁺ azalması kaynaklı OS'in artmasına ek olarak COVID-19 kaynaklı OS'in artması daha fazla hücre ölmüne sebebiyet vereceğinin bir göstergesidir. Bu durum hücre bütünlüğünü bozarak doku harabiyetine sebebiyet verecek; daha önce yapılan çalışmalarda gösterilen COVID-19 kaynaklı çoklu organ yetmezliğinin temelini oluşturabileceği kanaatindeyiz.

Sonuç olarak; yaptığımız çalışmadan elde edilen veriler 47 yaş üzerindeki erkeklerde ve şiddetli semptomu olan hastalarda daha fazla OS'in olduğunu göstermiştir.

Etik onam: Çalışma protokolü Helsinki deklarasyonu ilkelerine uygun olarak kurumsal bilimsel etik komitesi (Harran Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Tarih: 19/11/2021 Karar No: HRU/21.21.21) tarafından onaylandı.

Yazar Katkıları:

Konsept: Ş.N.D., T.Ö.

Literatür Tarama: Ş.N.D., T.Ö.

Tasarım: Ş.N.D., T.Ö.

Veri toplama: Ş.N.D., T.Ö., H.Ç., S.T., A.T., M.R.C.

Analiz ve yorum: Ş.N.D., T.Ö., H.Ç.

Makale yazımı: Ş.N.D., T.Ö.

Eleştirel incelenmesi: Ş.N.D., T.Ö.

Çıkar Çatışması: Herhangi bir çıkar çatışmamız bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Araştırma kapsamında herhangi bir kurum ya da kuruluştan finansal destek sağlanmamıştır.

Kaynaklar

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*. 2020.
2. https://www.who.int/health-topics/physical-activity#tab=tab_1.
3. Organization WH. World Health Organization coronavirus disease (COVID-19) dashboard. World Health Organization. 2020.
4. Coperchini F, Chiovato L, Croce L, Magri F, Rotondi M. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine & growth factor reviews*. 2020;53:25-32.
5. Castelli V, Cimini A, Ferri C. Cytokine storm in COVID-19: "when you come out of the storm, you won't be the same person who walked in". *Frontiers in immunology*. 2020;21:32.
6. Catanzaro M, Fagiani F, Racchi M, Corsini E, Govoni S, Lanni C. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. *Signal transduction and targeted therapy*. 2020;5(1):1-10.
7. Yelin I, Aharoni N, Tamar ES, Argoetti A, Messer E, Berenbaum D, et al. Evaluation of COVID-19 RT-qPCR test in multi sample pools. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(16):2073-8.
8. Delgado-Roche L, Mesta F. Oxidative stress as key player in severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection. *Archives of medical research*. 2020;51(5):384-7.
9. Sies H, Parnham MJ. Potential therapeutic use of ebsele for COVID-19 and other respiratory viral infections. *Free*

- Radical Biology and Medicine. 2020;156:107-12.
10. Garrido J, Gaspar A, Garrido EM, Miri R, Tavakkoli M, Pourali S, et al. Alkyl esters of hydroxycinnamic acids with improved antioxidant activity and lipophilicity protect PC12 cells against oxidative stress. *Biochimie*. 2012;94(4):961-7.
 11. Hadžović-Džuvo A, Valjevac A, Lepara O, Pjanić S, Hadžimuratović A, Mekić A. Oxidative stress status in elite athletes engaged in different sport disciplines. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2014;14(2):56.
 12. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(9-10):1865-79.
 13. Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants*. 2019;8(3):72.
 14. Cecchini R, Cecchini AL. SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression. *Medical hypotheses*. 2020;143:110102.
 15. Oudit GY, Kassiri Z, Patel MP, Chappell M, Butany J, Backx PH, et al. Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice. *Cardiovascular research*. 2007;75(1):29-39.
 16. Sawalha AH, Zhao M, Coit P, Lu Q. Epigenetic dysregulation of ACE2 and interferon-regulated genes might suggest increased COVID-19 susceptibility and severity in lupus patients. *Clinical Immunology*. 2020;215:108410.
 17. Violi F, Oliva A, Cangemi R, Ceccarelli G, Pignatelli P, Carnevale R, et al. Nox2 activation in COVID-19. *Redox Biology*. 2020;36:101655.
 18. Wu H, Wang Y, Zhang Y, Xu F, Chen J, Duan L, et al. Breaking the vicious loop between inflammation, oxidative stress and coagulation, a novel anti-thrombus insight of nattokinase by inhibiting LPS-induced inflammation and oxidative stress. *Redox biology*. 2020;32:101500.
 19. Kubat, G. O., & Şahin, C. (2020). Koronavirüs hastalığı-2019 (COVID-19) Klinik bulguları. *Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi*, 28, 14-19.
 20. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*. 2004;37(4):277-85.
 21. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*. 2005;38(12):1103-11.
 22. Altındag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatology international*. 2008;28(4):317-21.
 23. Draper HH, Hadley M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology*. 1990;186:421-31.
 24. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A-G, et al. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 1990;186:464-78.
 25. Saleh J, Peyssonnaud C, Singh KK, Edeas M. Mitochondria and microbiota dysfunction in COVID-19 pathogenesis. *Mitochondrion*. 2020;54:1-7.
 26. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *American journal of epidemiology*. 2002;156(3):274-85.
 27. Miller R, Wentzel A, Richards G. COVID-19: NAD⁺ deficiency may predispose the aged, obese and type2 diabetics to mortality through its effect on SIRT1 activity. *Medical hypotheses*. 2020;144:110044.
 28. Taghizadeh-Hesary F, Akbari H. The powerful immune system against powerful COVID-19: A hypothesis. *Medical hypotheses*. 2020;140:109762.
 29. Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Masi A. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clinical and experimental rheumatology*. 1995;13(2):217-26.
 30. Viña J, Gambini J, García-García FJ, Rodríguez-Mañas L, Borrás C. Role of oestrogens on oxidative stress and inflammation in ageing. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2013;16(2):65-72.
 31. Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Mel'nikova, T. I., Porozov, Y. B., & Terentiev, A. A. (2019). Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
 32. Mueller AL, McNamara MS, Sinclair DA. Why does COVID-19 disproportionately affect older people? *Aging (alban NY)*. 2020;12(10):9959.
 33. Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(2):179-206.
 34. Blacker TS, Duchon MR. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016;100:53-65.
 35. Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes & development*. 2013;27(19):2072-85.