

TOXOPLASMA GONDII POZİTİF BİREYLERDE İLERİ PROTEİN OKSİDASYON ÜRÜNÜ DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
Assessment of Advanced Oxidation Protein Product in Toxoplasma Gondii Positive Individuals

Mehtap POLAT¹, Eser KILIÇ², Süleyman YAZAR³, Ülfet ÇETİNKAYA⁴

Özet: *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu tüm dünyada yaygın bir zoonozdur. Gebelik sırasında enfeksiyonu alan kadınların çocuklarında konjenital enfeksiyona yol açabilir. Oksidatif stres, oksidan üretimi ile antioksidan korunma arasındaki dengesizlik nedeniyle ortaya çıkar ve organizmada yapısal hasarla sonuçlanabilir. Bu çalışmada, *Toxoplasma gondii* ile enfekte bireylerde protein oksidasyonun oluşum durumunu incelemek amaçlanmıştır. Çalışma gruplarını oluşturan hasta (*Toxoplasma gondii* 200 pozitif), [22 gebe IgG (+) ve Ig M (+) ve 27 gebe IgG (+) ve Ig M (-)] ve 30 kontrol bireyler IgG (-) ve Ig M (-) ileri protein oksidasyon ürünü açısından incelenmiştir. İleri oksidasyon protein ürünü düzeylerinde özellikle IgG (+) ve IgM (+) pozitif grupta kontrol grubuna göre numerik olarak artış tespit edilirken, kontrol grubu ile her iki hasta grubu arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Buna karşın hasta grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.020$). Sonuç olarak bu çalışma ile ilk kez toxoplasmosis sonucu organizmada oluşabilecek protein harabiyetinin derecesi hakkında veriler elde edilmiş olup, özellikle gebelik durumunda uygulanacak tedavinin nitel ve nicel olarak yönlendirilmesi aşamasında elde edilen sonuçların faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Toxoplasma gondii*, protein oksidasyonu

Summary: *Toxoplasma gondii* infection is a common zoonose found all over the world. In women during pregnancy it can lead to congenital infection of their children. Oxidative stress occurs due to imbalance between the production of oxidant and antioxidant protection and can result in structural damages in the organism. In this study, we aimed to investigate free radical formation and protein oxidation in *Toxoplasma gondii* infected individuals.

Working groups that make up the patients (*Toxoplasma gondii* positive), [22 pregnant IgG (+) and Ig M (+) and 27 pregnant IgG (+) and Ig M (-)] and 30 control individuals IgG (-) and Ig M (-) were investigated in terms of the protein oxidation. Advanced oxidation protein product levels especially in IgG (+)/IgM (+) group was found to be quantitatively increased comparing to control group, however, there is no statistically significant difference between the patient group and control group ($p > 0.05$). However, there was a statistical significant difference observed between two patients groups ($p < 0.020$). These results will provide, for the first time, some more information relating to the degree of protein oxidation as a result of parasite infection, and accordingly, it would also be useful to give direction to the treatment in qualitative and quantitative degrees in pregnancies.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, protein oxidation

¹ Bilim Uz. Erc. Ün. Sağlık Bil. Ens. Biyokimya AD, Kayseri

² Prof. Dr. Erc. Ün. Tıp Fak. Biyokimya AD, Kayseri

³ Prof. Dr. Erc. Ün. Tıp Fak. Parazitoloji AD, Kayseri

⁴ Arş. Gör. Dr. Erc. Ün. Sağlık Bil. Ens. Parazitoloji AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 11.06.2012 Kabul Tarihi : 14.12.2012

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) zorunlu hücre içi parazit olup, memeli ve bazı kuş türlerinde enfeksiyon oluşturmaktadır. *T. gondii* bradizoit içeren doku kistlerinin ve kedi dışkıları ile kontamine olan ookistlerin yiyeceklerle alınmasıyla insana bulaşır. Çiğ ya da az pişmiş enfekte etlerin yenilmesiyle olabileceği gibi enfekte etlerle temas etmiş ellerin etlere bulaşmasıyla da olabilmektedir. Bununla birlikte toxoplasma'nın deriden absorbe edilmediği de unutulmalıdır (1,2). Gebeliği sırasında *Toxoplasma* ile enfekte anneler enfeksiyonu bebeğe geçirmektedirler. Enfeksiyona yakalanma zamanı bebekteki enfeksiyonun derecesini etkilemektedir (1-3). Hastalık plesental yol, kan transfüzyonu, doku transplantasyonu gibi birçok yol ile de bulaşabilmektedir. İnsana bulaşma yolları göz önünde bulundurulduğunda *T. gondii*'den korunmak için, kedi ile temas sonrası, bahçe işlerinden sonra ve toprakla uğraşma sonrası ellerin su ve sabunla iyice yıkanması gerekmektedir (1-3). Türkiye'de bölgelere toxoplasmosis seropozitifliği değişmektedir (4). İmmun sistemi sağlam insanlarda toxoplasmosis genellikle asemptomatik olarak seyretmektedir. Anti-*Toxoplasma gondii* IgG antikorları enfeksiyodan 1-2 hafta sonra yükselmeye başlamaktadır. IgG pozitifliğinin yakın 3 aylık bir dönem ya da 3 aydan daha eski bir enfeksiyon durumunu gösterdiği IgG avidite testi ile belirlenebilmektedir. Double sandwich IgM ELISA enfeksiyonun ilk haftasında yükselen IgM antikorlarını tespit etmede kullanılmaktadır (5).

Serbest radikaller oldukça reaktif olup, canlı organizma için toksiktir (6, 7). Protein oksidasyonu, OH⁻, H₂O₂ gibi reaktif oksijen türleri ile direkt olarak veya oksidatif stresin sekonder ürünleri ile reaksiyonu sonucu indirekt olarak indüklenen proteinlerin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Son zamanlarda protein oksidasyonunun yeni bir markırı olan ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) çeşitli araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır ve ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır (8-10). İleri oksidasyon protein ürünlerinin tayini, protein oksidasyonunun derecesini belirlemede kullanılır (11-13). Proteinler oksidanlara 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. AOPP'nin mononükleer fagositleri aktive ederek, nötrofil ve bazofiller arasında sitokin benzeri mediyatör gibi davrandığı da öne sürülmektedir (12).

Bu çalışmada, *T. gondii* pozitif bireylerde protein oksidasyon durumunun incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, protein peroksidasyonun göstergesi olan novel oksidatif stres markırı olan AOPP düzeyi değerlendirilmeye alındı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Hasta grubu; Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalına Ocak 2010-Temmuz 2011 tarihleri arasında *T. gondii* ön tanısı ile başvuran, serolojik tekniklerle yapılan testler sonucu (IgG-ELISA, IgG avidite testi ve IgM ELISA) sadece IgG antikorları pozitif çıkan 22 gebe hasta ve hem IgG hem de IgM antikorları pozitif çıkan 27 gebe hasta olarak belirlenmiştir.

Mevcut klinik ve laboratuvar bulgularına göre; diyabet, kronik respiratuvar yetmezlik, akut enfeksiyon, malign tümör ve hepatit gibi sistemik hastalığı bulunanlar çalışma dışında bırakılmıştır. Kontrol grubu; aynı tarihler arasında herhangi bir sistemik hastalığı olmayan sigara içmeyen ve kriterlere uygun gebe *T. gondii* IgG (-) / IgM (-) 30 kişiden oluşmaktadır.

AOPP tayini, Witko-Sarsat ve arkadaşları (14) tarafından geliştirilen spektrofotometrik metotla gerçekleştirildi.

Çözeltiler:

Fosfat tamponu (PBS pH 7.4)

Kloramin-T standartları (10-200 µmol/L)

Asetik asit

Potasyum iyodür (KI 1.16 mol/L)

Çalışma: Fosfat tamponu (PBS pH 7.4) ile dilüe (1:5) edilen plazma ve kloramin-T standart çözeltilerinin (0- 200 µmol/L) 400µL'sine 200µl Asetik asit ve 100 µl 1.16 mol/L KI ilave edilerek hazırlandı. Reaksiyon karışımının absorbansı, spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda ölçüldü. AOPP düzeyleri, kloramin-T ekivalentlerinden µmol/L olarak belirlendi.

Standart Serinin Hazırlanması: 200 µmol/L konsantrasyonundaki stok kloramin-T çözeltisi, uygun oranlarda dilüe edilerek, 0, 2.5, 5, 10, 30 ve 50 µmol/L konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı. Standartlar numune gibi çalışıldı.

İstatistiksel analizlerde yaşların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır, AOPP'nin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis tek

yönlü varyans analizi kullanılmıştır (Posthoc test:Dunn). En küçük önemlilik sınırı 0.05 olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışma gruplarını oluşturan hasta ve kontrol bireylerin özellikleri ile AOPP düzeyleri Tablo I'de verilmiştir.

Tablo I'den görüleceği üzere AOPP düzeylerinde özellikle IgG (+) ve IgM (+) pozitif grupta kontrol grubuna göre numerik olarak artış tespit edilirken, kontrol grubu ile her iki hasta grubu arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir. ($p > 0.05$). Buna karşın hasta grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.020$).

Tablo I. T. gondii pozitif bireylerde ve kontrol grubunda protein oksidasyon değerleri

	Hasta [IgG (+) ve IgM (+)] (n:27)	Hasta [IgG (+) ve IgM (-)] (n:22)	Kontrol [IgG (-) ve IgM (-)] (n:30)
Yaş (yıl)(Ortalama±Standart sapma)	(18-36) 26.6 ± 4.5	(20-36) 29.3 ± 4.07	(17-38) 28.45 ± 5.4
AOPP (µmol/L)(Ortanca (25. -75. percentil)	6.97 (6.21 -9.58)	4.74 (3.28-6.93)	5.21 (4.58-8.97)

İstatistik karşılaştırma:

Önemli bulgular: ▲ İki hasta grubunun (IgG (+) ve Ig M (+) ile (IgG (+) ve Ig M (-) karşılaştırılması sırasında istatistiksel olarak anlamlı bulgular elde edildi.

TARTIŞMA

T.gondii dünyanın en yaygın parazitlerinden biri olup tek hücreli bir protozondur ve immun sağlıklı bireylerde enfeksiyon sıklıkla belirti vermeden geçirilir. Enfeksiyonun tanısı ancak kanda parazite karşı oluşan antikorların gösterilmesi ile konur. IgG tipi antikorların yüksek düzeyde bulunması geçirilmiş enfeksiyonu düşündürür. Buna karşı IgM tipi enfeksiyonlar akut enfeksiyonu gösterir (1-5).

Vücudumuzda besinlerin oksijen kullanarak enerjiye çevrilmesi sırasında oluşan metabolik yan ürünler olarak serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller kararsız bir yapıdadırlar ve kararlı hale gelmek için hücrelere saldırarak hasar oluştururlar. Farklı parazit türleriyle enfekte olan konak hücrelerinde oksidatif strese bağlı oluşan serbest radikaller ise proteinler gibi vücudumuzun temel yapısal moleküllerinin oksidatif hasarlanmasına ve akabinde hücre ve doku hasarlarına neden olur (15-18).

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelmektedir (19, 20). Protein oksidasyonu ürünleri arasında, AOPP'de çapraz bağlanma ürünleri olarak tanımlanmaktadır (8-10, 19, 20).

Bu çalışmada AOPP değerleri açısından kontrol grubuyla her iki hasta grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, hasta grubunda kendi içinde; *T. gondii*, IgG (+) ve Ig M (+) olan grupta IgG (+) ve Ig M (-) gruba göre AOPP düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenmiştir.

AOPP düzeyindeki değişimin tayin edildiği diğer çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin bir çalışmada, protein oksidasyon hasarının belirteci olarak AOPP düzeyleri açısından hasta grubuyla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (20). Bir diğer çalışmada ise hasta grubu AOPP düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (21).

Yaptığımız bu çalışmada kontrol grubuyla her iki hasta grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmezken hasta grubunda kendi içinde; *T. gondii*, IgG (+) ve Ig M (+) olan grupta IgG (+) ve Ig M (-) gruba göre AOPP düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenmiştir.

Hasta grubunda gözlenen yüksek plazma AOPP düzeyi, nötrofil aktivasyonuna bağlı olarak artan MPO-HOCl sisteminin oluşturduğu hasara bağlı oluşunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak; hasta grubunda görülen gerek istatistiksel olarak anlamlı yükselmeler gerekse rakamsal yükselmeler, proteinlerle ilgili antioksidan mekanizmanın yetersiz kaldığı ve bunun sonucunda da insan serum albüminin okside olabileceği bunun da özellikle *T. gondii*, IgG (+) ve Ig M (+) bireylerde AOPP'nin artışıyla kendini göstermiş olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Özcel MA. Özcel'in Tıbbi parazit hastalıkları. Gürüz AY, Özcel MA Toxoplasmosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını İzmir. 2007;22: 141-189.
2. Korkmaz M, Ok ÜZ, Parazitolojide laboratuvar, Yöntem-Yorum-Akreditasyon, Türkiye Parazitoloji derneği, Yayın no: 23, 2011; 261-284.
3. Tanyüksel M, Gün H, Erdal N. Toksoplazmosis tanısında serolojik testlerin karşılaştırılması. Türkiye Parazit Derg 1994; 18: 266-276.
4. Altıntaş N, Kuman HA, Akisu C, et al., Toxoplasmosis in last four years in Aegean region, Turkey. J Egypt Soc Parasitol. 1997; 27: 439-443.
5. Yazar S, Altunoluk B, Akman MAA, et. Al., Gebelerde anti-Toxoplasma gondii antikorlarının araştırılması. Türkiye Parazit Derg 2000; 24: 343-345.

6. Berry CE, Hare JM. *J Physiol. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications.* 2004; 16: 589-606.
7. Watts RW. *Molecular variation in relation to purine metabolism. J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1974; 8: 48-63.
8. Blandin C, Gausson V, Witko-Sarsat V. et al., *Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. Biochimica Biophysica Acta* 2004; 1689: 91-102.
9. Davies MJ, Fu S, Wang H, et al., *Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1151-1163.
10. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, et al., *Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.
11. Gülbahar Ö. *Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişkisi. Turkish Journal of Geriatrics* 2007; 10: 43-48.12.
12. Shacter E. *Protein oxidative damage. Methods Enzymol* 2000; 319: 428-436.
13. Shacter E. *Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. Drug Metab Rev* 2000; 32: 307-326.
14. Witko-Sarsat V, Friandler M, Capeillere-Blandin C, et al., *Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. Kidney Int* 1996; 49: 1304-1313.
15. Klaunig JE, Wang Z, Pu X, et al., *Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 254: 86-99.
16. Burton GJ, Jauniaux E. *Oxidative stress. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011; 25: 287-299.
17. Avery SV. *Molecular targets of oxidative stress. Biochem J.* 2011; 434: 201-210.
18. Santos CX, Anilkumar N, Zhang M, et al., *Redox signaling in cardiac myocytes. Free Radic Biol Med.* 2011; 50: 777-793.
19. Skvarilová M, Bulava A, Stejskal D, et al., *Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005; 149: 83-87.
20. Noyan T, Güler A, Şekerlioğlu MR. *Serum advanced oxidized protein products, myeloperoxidase and ascorbic acid in preeclampsia and eclampsia. Australian and New Zealand of Obstet and Gynecol* 2006; 46: 486-491.
21. Kalousová M, Skrha J, Zima T. *Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. Physiol Res.* 2002; 51: 597-604.