



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI (VETERİNER) ANABİLİM DALI
VİH-D-2015-0001

**ANEMİLİ KÖPEKLERDE OKSİDATİF STRES ve
DONÖRLERE VİTAMİN E + SELENYUM UYGULAMASININ
SAKLANAN TAM KANIN KALİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Doktora Tezi

Mehmet GÜLTEKİN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA**

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI (VETERİNER) ANABİLİM DALI
VİH-D-2015-0001

ANEMİLİ KÖPEKLERDE OKSİDATİF STRES ve
DONÖRLERE VİTAMİN E + SELENYUM UYGULAMASININ
SAKLANAN TAM KANIN KALİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Doktora Tezi

Mehmet GÜLTEKİN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA

AYDIN-2015

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Mehmet GÜLTEKİN tarafından hazırlanan “**Anemili Köpeklerde Oksidatif Stres ve Donörlere Vitamin E + Selenyum Uygulamasının Saklanan Tam Kanın Kalitesi Üzerine Etkileri**” başlıklı tez 02/07/2015 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı:

Üniversitesi:

İmzası:

Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA

Adnan Menderes Üniversitesi

Prof. Dr. Bülent ULUTAŞ

Adnan Menderes Üniversitesi

Prof. Dr. Muharrem BALKAYA

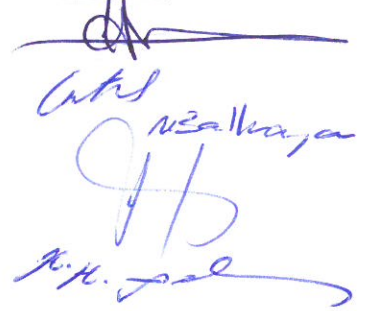
Adnan Menderes Üniversitesi

Prof. Dr. Şima ŞAHİNDURAN

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Doç. Dr. Handan Hilal YAVUZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

ÖNSÖZ

Oksidatif stres, gerek insan gerekse veteriner hekimliğinde birçok hastalık ve durumda değerlendirilen güncel bir konudur. Serbest radikallerin oluşum hızında artma ya da antioksidan savunma sistemi tarafından ortadan kaldırılamaması sonucu oksidan-antioksidan dengenin bozulması, patolojik süreçlerin başlamalarına ve/veya şiddetlerinin artmasına neden olmaktadır. Antioksidan kullanımının bazı durumlarda oksidatif stresi önleyebileceği ya da sınırlayabileceği belirtilmektedir.

Bu araştırma iki bölümden oluşmaktadır;

İlk bölümde anemili köpeklerde aneminin şiddeti ve tipi de dikkate alınarak oksidatif stresin değerlendirilmesi amaçlandı. Aneminin oksidatif strese neden olduğu genel olarak bilinmekte, ancak bunun aneminin şiddet ve tipi ile ilişkisi konusunda detaylı bilgi bulunmamaktadır. Çalışma sonuçlarının farklı şiddet ve tipteki anemilerde antioksidan kullanımı endikasyonunun ortaya konulması yönüyle önemli olduğu düşünülmektedir.

İkinci bölümde ise donör köpeklere vitamin E + selenyum uygulamasının CPDA-1 içeren torbalara alınarak saklanan tam kanın kalitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Saklanan kanda hemoglobin, membran proteinleri ve lipidlerinin oksidasyonu, güvenli saklama süresini azaltmakta ve uzun saklama sürelerinde çeşitli transfüzyon sonrası reaksiyonlarla ilişkilendirilmektedir. Çalışma donörlerden alınan köpek kanının saklanması süresince eritrosit membranlarında şekillenecek oksidatif hasarın, donörlere antioksidan yüklemesiyle azaltılabileceği hipotezini öngörmektedir. Sonuçların beklentiler doğrultusunda gerçekleşmesi halinde uygulamanın saklanan kanın kalitesini arttırmaya yönelik pratik yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından VTF-12014 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller.....	4
1.1.1. Serbest Radikallerin Oluşumu ve Biyolojik Etkileri.....	6
1.2. Antioksidan Savunma Sistemi	12
1.3. Oksidatif Stres	16
1.3.1. Oksidatif Stresin Ölçülmesi.....	18
1.3.1.1. Köpeklerde oksidan/antioksidan biyobelirteçlerin ölçüldüğü durum ve hastalıklar	21
1.4. Köpeklerde Anemi.....	24
1.4.1. Anemi ve Oksidatif Stres.....	30
1.5. Köpeklerde Kan Transfüzyonu.....	35
1.5.1. Tam Kanın Saklanması	37
1.5.2. Saklanan Tam Kanda Meydana Gelen Değişiklikler	39
1.5.2.1. Saklanan kanda oksidatif stres.....	43
1.6. Sağlıklı Köpeklerde Bazı Oksidan ve Antioksidan Biyobelirteçlerin Değerleri	50
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	52
2.1. Hayvan Materyali	52
2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Kan Örneklerinin Hazırlanması	53
2.3. Laboratuvar Analizleri	57

2.3.1. Hematolojik Analizler	57
2.3.2. Biyokimyasal Analizler	58
2.3.2.1. Plazma Total Oksidan Seviye (TOS)	59
2.3.2.2. Plazma Total Antioksidan Kapasite (TAK).....	59
2.3.2.3. Plazma Malondialdehit (MDA)	59
2.3.2.4. Eritrosit Süperoksit Dismütaz (SOD).....	60
2.3.2.5. Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	60
2.3.2.6. Eritrosit Katalaz (CAT)	60
2.4. İstatistiksel Değerlendirme	61
3. BULGULAR	63
3.1. Laboratuvar Bulgular.....	63
3.1.1. Anemili Köpeklerde Hematolojik ve Biyokimyasal Bulgular	63
3.1.1.1. Aneminin şiddetine göre oksidan/antioksidan durum	66
3.1.1.2. Aneminin tipine göre oksidan/antioksidan durum	70
3.1.2. Antioksidan Uygulamasının Tam Kanın Kalitesi Üzerine Etkileri.....	80
3.1.2.1. Antioksidan uygulamasının donörlerde ve saklanan tam kanda hemograma etkileri.....	80
3.1.2.2. Antioksidan uygulamasının donörlerde ve saklanan tam kanda hemolizle ilgili parametrelere etkileri.....	84
3.1.2.3 Antioksidan uygulamasının donörlerde ve saklanan tam kanda oksidan/antioksidan duruma etkileri	86
4. TARTIŞMA.....	99
4.1. Anemili Köpeklerde Oksidan/Antioksidan Durum	100
4.2. Antioksidan Uygulamasının Saklanan Tam Kanın Kalitesi Üzerine Etkileri	105
5. SONUÇ	114
ÖZET	115
SUMMARY	117
KAYNAKLAR.....	119

ÖZGEÇMİŞ	140
TEŞEKKÜR	141

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
\bar{X}	: Aritmetik ortalama
°C	: Santigrat
µL	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
♀	: Dişi
♂	: Erkek
χ^2	: Kikare
2,3 DPG	: 2,3 difosfogliserat
ABTS	: Etilbenzotiazolin sulfonik asit
ACD	: Asit sitrat dekstroz
ADP	: Adenozin difosfat
AMP	: Adenozin monofosfat
AOP	: Antioksidan potansiyel
Arg	: Arjinin
ATP	: Adenozin trifosfat
CAT	: Katalaz
Cl	: Klor
CPD	: Sitrat fosfat dekstroz
CPDA-1	: Sitrat fosfat dekstroz adenin-1
CRP	: C-reaktif protein
Cu	: Bakır
Cys	: Sistein
dk	: Dakika
dL	: Desilitre
DNA	: Deoksiribonükleik asit
d-ROM	: Diakrom reaktif oksijen metabolitleri
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
Fe ⁺	: Demir
Fe ⁺²	: Ferro
Fe ⁺³	: Ferri
fL	: Femtolitre
FRAP	: Ferrum Redükte Edici Antioksidan Kapasite
g	: Gram
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: yükseltgenmiş glutasyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HCT	: Hematokrit

HNO	: Nitroksil
HNO ₂	: Nitröz asit
HOCl	: Hipoklorik asit
IL	: Interlökin
INT	: 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride
K ⁺	: Potasyum
L	: Litre
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LO	: Alkoksil
LO ₂	: Peroksil
LOOH	: Lipid hidroperoksit
Lys	: Lizin
MCH	: Ortalama eritrosit hemoglobin miktarı
MCHC	: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV	: Ortalama eritrosit hacmi
MDA	: Malondialdehit
mL	: Mililitre
mmol	: Milimol
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum klorür
NADPH	: Nikotin adenin dinükleotid fosfat hidrojen
NO	: Nitrik oksit
NO ₂	: Nitrojen dioksit
NOS	: Nitroksit
O ₂	: Singlet oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit
O ₃	: Ozon
OH ⁻	: Hidroksil
ONOO ⁻	: Peroksinitrit
pg	: Pikogram
PLT	: Trombosit
post	: İkinci antioksidan ya da % 0,9 NaCl uygulama sonrası (-1. gün)
pre	: Antioksidan ya da % 0,9 NaCl uygulama öncesi (-15. gün)
Pro	: Prolin
r	: Pearson korelasyon katsayısı
RBC	: Eritrosit
rho	: Spearman korelasyon katsayısı
RNA	: Ribonükleik asit
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
s	: Standart sapma
sc	: Subkutan
SOD	: Süperoksit dismütaz
TAK	: Total Antioksidan Kapasite

TAK-L	:	Total Antioksidan Kapasite-Liyolifize
TBA	:	Tiyobarbitürük asit
TCA	:	Triklorasetik asit
TEAC	:	Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite
Thr	:	Threonin
TOS	:	Total Oksidan Seviye
Tyr	:	Tirozin
U	:	Unite
WBC	:	Total Lökosit
Xmax	:	Maksimal değer
Xmin	:	Minimal değer
Zn	:	Çinko

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1.1. Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri.....	7
Çizelge 1.2. Önemli reaktif türlerin oluşumu ve etkileri	8
Çizelge 1.3. Serbest radikallerin lipid, protein ve DNA üzerine etkileri ve sonuçları.....	11
Çizelge 1.4. Organizmada önemli hücre içi antioksidanların fonksiyon ve yerleşimleri	12
Çizelge 1.5. Önemli hücre dışı antioksidanlar ve fonksiyonları	13
Çizelge 1.6. Lipid, DNA ve protein kaynaklı önemli oksidatif stres biyobelirteçleri	19
Çizelge 1.7. Oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılan antioksidan biyobelirteçler ve dolaylı antioksidan aktivite testleri	19
Çizelge 1.8. Köpeklerde farklı durum veya hastalıklarda değerlendirilen oksidan/ antioksidan biyobelirteçler	21
Çizelge 1.9. Şiddetine göre aneminin derecelendirilmesi	25
Çizelge 1.10. Anemilerin morfolojik sınıflandırması	26
Çizelge 1.11. Anemilerin retikülosit sayısına göre sınıflandırılması	27
Çizelge 1.12. Köpeklerde anemilerin etyopatogenezisi	29
Çizelge 1.13. Literatürde köpeklerde oksidatif stresin değerlendirildiği anemiyle seyredabilen enfeksiyöz hastalıklar	32
Çizelge 1.14. Tam kan ve kan ürünlerinin bileşenleri, endikasyonları, saklama koşulları ve kullanım önerileri	36
Çizelge 1.15. Saklama süresince eritrosit ve plazmada görülen bazı önemli değişiklikler	39
Çizelge 1.16. Farklı türlerde hücre (eritrosit) içi ve plazma K ⁺ konsantrasyonları	41
Çizelge 1.17. Farklı türlerde kanın saklama süresince hematolojik ve hemolizle ilgili parametrelerde belirlenen değişiklikler	42
Çizelge 1.18. Saklanmış tam kanda oksidatif stresin değerlendirildiği çalışmalar	48
Çizelge 1.19. Sağlıklı köpeklerde belirlenen MDA, SOD, GSH-Px, CAT, TOS ve TAK değerleri.	51

Çizelge 2.1.	Donör köpeklerin ırk, yaş ve cinsiyet dağılımları ile vücut ağırlıkları	53
Çizelge 2.2.	Şiddetine göre anemilerin derecelendirilmesi	54
Çizelge 2.3.	Absolut retikülosit sayısına göre anemilerin sınıflandırılması	54
Çizelge 2.4.	Hematolojik analizler ve kullanılan yöntemler	57
Çizelge 2.5.	Biyokimyasal analizler ve kullanılan yöntemler.....	58
Çizelge 3.1.	Anemili köpeklerde hematolojik bulgular ve oksidan/antioksidan durum .	64
Çizelge 3.2.	Köpeklerde anemi laboratuvar tanı parametreleri (HCT, RBC, HGB) ve retikülosit sayısı ile oksidan/antioksidan biyobelirteçler arasındaki korelasyon (n=50).	65
Çizelge 3.3.	Köpeklerde aneminin şiddetine göre hematolojik bulgular ve oksidan/antioksidan durum	67
Çizelge 3.4.	Aneminin şiddetine göre anemi laboratuvar tanı parametreleri (HCT, RBC, HGB) ile oksidan/antioksidan biyobelirteçler arasındaki korelasyon.	69
Çizelge 3.5.	Köpeklerde aneminin tipine göre hematolojik bulgular ve oksidan/antioksidan durum	71
Çizelge 3.6.	Retikülosit sayısı ve anemi laboratuvar tanı parametreleri (HCT, RBC, HGB) ile oksidan/antioksidan biyobelirteçler arasındaki korelasyon	73
Çizelge 3.7.	Antioksidan uygulamasının donör ve saklanan tam kan hemogramına etkileri (I)	81
Çizelge 3.7.	Antioksidan uygulamasının donör ve saklanan tam kan hemogramına etkileri (II)	82
Çizelge 3.8.	Antioksidan uygulamasının hemolize ilgili parametrelere (plazma K ⁺ ve HGB konsantrasyonları ile LDH aktivitesi) etkileri	85
Çizelge 3.9.	Antioksidan uygulamasının donörlerde ve saklanan tam kanda total oksidan/antioksidan duruma etkileri	87
Çizelge 3.10.	Antioksidan uygulamasının donörlerde ve saklanan tam kanda oksidan (MDA) ve enzimatik antioksidan (SOD, GSH-Px, CAT) biyobelirteçlere etkileri	89

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1.	Serbest radikallerin kaynakları ve etkileri 9
Şekil 1.2.	Oksidatif stres oluşumu 16
Şekil 1.3.	Oksidatif stres oluşumuna neden olan mekanizmalar 17
Şekil 1.4.	Köpeklerde aneminin genel nedenleri 28
Şekil 1.5.	Saklama süresince eritrositlerde gözlenen temel biyokimyasal değişiklikler 46
Şekil 2.1.	Donör köpeklere antioksidan uygulamasının saklanan tam kanın kalitesi üzerine etkileri kapsamında yapılan araştırmanın deneysel dizaynı 55
Şekil 2.2.	CPDA-1 içeren kan torbası 56
Şekil 2.3.	Retikülosit içerisindeki RNA partiküllerinin New Methylene Blue boyama ile gösterilmesi 58
Şekil 3.1.	Sağlıklı ile hafif, orta ve şiddetli anemili köpeklerde MCH değerleri..... 74
Şekil 3.2.	Sağlıklı ile hafif, orta ve şiddetli anemili köpeklerde PLT sayıları 74
Şekil 3.3.	Sağlıklı ile hafif, orta ve şiddetli anemili köpeklerde retikülosit sayıları 74
Şekil 3.4.	Sağlıklı ile hafif, orta ve şiddetli anemili köpeklerde plazma TOS değerleri 75
Şekil 3.5.	Sağlıklı ile hafif, orta ve şiddetli anemili köpeklerde plazma TAK değerleri 75
Şekil 3.6.	Sağlıklı ile hafif, orta ve şiddetli anemili köpeklerde eritrosit GSH-Px aktiviteleri 75
Şekil 3.7.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde WBC sayıları 76
Şekil 3.8.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde RBC sayıları . 76
Şekil 3.9.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde HGB konsantrasyonları 76
Şekil 3.10.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde HCT değerleri 77

Şekil 3.11.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde MCV değerleri	77
Şekil 3.12.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde MCH değerleri	77
Şekil 3.13.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde MCHC değerleri	78
Şekil 3.14.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde PLT sayıları .	78
Şekil 3.15.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde plazma TOS değerleri.....	78
Şekil 3.16.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde plazma TAK değerleri.....	79
Şekil 3.17.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde plazma MDA konsantrasyonları	79
Şekil 3.18.	Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde eritrosit GSH-Px aktivitesi	79
Şekil 3.19.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince HCT değerindeki değişimler	91
Şekil 3.20.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince RBC sayısındaki değişimler	91
Şekil 3.21.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince MCV değerindeki değişimler	92
Şekil 3.22.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince MCH değerindeki değişimler	92
Şekil 3.23.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince MCHC değerindeki değişimler	93
Şekil 3.24.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince PLT sayısındaki değişimler	93
Şekil 3.25.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince K ⁺ konsantrasyonundaki değişimler	94

Şekil 3.26.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince plazma HGB konsantrasyonundaki değişimler.....	94
Şekil 3.27.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince plazma LDH aktivitesindeki değişimler.....	95
Şekil 3.28.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince plazma TOS değerindeki değişimler.....	95
Şekil 3.29.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince plazma TAK değerindeki değişimler.....	96
Şekil 3.30.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince plazma MDA konsantrasyonundaki değişimler.....	96
Şekil 3.31.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince eritrosit SOD aktivitesindeki değişimler.....	97
Şekil 3.32.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince eritrosit GSH-Px aktivitesindeki değişimler.....	97
Şekil 3.33.	Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince eritrosit CAT aktivitesindeki değişimler.....	98

1. GİRİŞ

Hücrede enerji üretim süreçlerinde yüksek düzeyde reaktif serbest radikaller ortaya çıkar (Valko ve ark 2007). Serbest radikaller protein, lipid, karbonhidrat ve deoksiribonükleik asit (DNA) oksidasyonu yaparak hücre zarı, hücre organelleri ve DNA'larda patolojik değişikliklere neden olabilmekte, hücre ölümü, doku hasarı ve nekroz sonucunda da organ veya sistemlerde fonksiyon yetersizliği meydana getirebilmektedirler (Sorg 2004, Adly 2010). Organizmada oluşan serbest radikallerin olumsuz etkileri, fizyolojik şartlarda endojen ve eksojen kaynaklı, enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar tarafından nötralize edilerek ortadan kaldırılır (Percival 1998, Young ve Woodside 2001). Vücutta serbest radikallerin oluşumu ve antioksidan sistem ile ortadan kaldırılması bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak tanımlanır. Serbest radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında azalma, dengenin oksidanlar lehine bozulmasına neden olarak oksidatif stres gelişimi ile sonuçlanmaktadır (Durackova 2010, Halliwell 2011).

Oksidatif stresin varlık ve düzeyi plazma/serum, eritrosit ve doku örnekleri gibi çeşitli biyolojik materyallerde serbest radikallerin ya da oksidatif biyobelirteçlerin ve antioksidanların ölçülmesi ile ortaya konulabilmektedir. Bu kapsamda enzimatik antioksidanlardan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) ile oksidan biyobelirteçlerden malondialdehit (MDA) sıklıkla kullanım bulmaktadır (Dotan ve ark 2004, Bast ve Haenen 2013, Niedzwiedz ve Jaworski 2014). Ancak, oksidatif ve antioksidan biyobelirteçlerin her birinin ölçümünün uzun zaman alması, pahalı olması ve karmaşık teknikler gerektirmesi nedeniyle bu parametreleri total olarak değerlendiren Total Oksidan Seviye (TOS) ve Total Antioksidan Kapasite (TAK) yöntemleri geliştirilmiş olup, klinik ve deneysel çalışmalarda kullanım bulmaktadır (Erel 2004, Erel 2005, Almeida ve ark 2013, Lee ve ark 2013, Lee ve Kim 2014).

Köpeklerde anemi birçok hastalığın seyri veya sonucunda gelişen bir bulgu olup, şiddeti ve tipi ile ilişkili olarak organizmanın tamamında önemli olumsuzluklara neden olabilmektedir (Tvedten 2010). Eritrositler temel fonksiyonu olan doku reoksijenizasyonu yanında SOD, CAT ve glutatyon (GSH) sistemi gibi önemli hücre içi enzimatik antioksidanları yapısında bulundurmasıyla oksidatif dengenin sağlanması ve korunmasında önemlidir (Lang ve ark 2006, Mohanty 2013). Farklı etyolojilerden ileri gelen anemiler çeşitli mekanizmalarla oksidatif strese neden olmakta, gelişen oksidatif stres de

eritrositlerin yaşam süresini kısaltmakta ve oksijen taşıma kapasitesini azaltmaktadır (Nagababu ve ark 2008, Harvey 2010, Iuchi 2012). Aneminin oksidatif strese neden olduğu genel olarak bilinmekte, ancak bunun aneminin şiddet ve tipi ile ilişkisi konusunda detaylı bilgi bulunmamaktadır.

Tam kan transfüzyonu sirkülasyondaki volüm eksikliğinin tamamlanması, kanın şekilli elemanlarının (eritrosit, trombosit, lökosit) veya plazma eksikliklerinin giderilmesi ve immunglobulinlerin aktarılmasında endikedir. Köpeklerde akut anemilerde hematokrit (HCT) \leq %15, kronik anemilerde de HCT \leq %10 olduğu durumlarda kan transfüzyonu yaygın uygulama bulan yaşamsal bir girişimdir (Nolte ve ark 1988, Gibson ve Abrams-Ogg 2012). Fakat veteriner hekimlikte kan bankalarının ve kanın ürünlere ayrıştırılmasının yaygın olmaması, ihtiyaç halinde istenilen özelliklere sahip donörün kolayca bulunamaması nedeniyle, alınan tam kanın saklanılarak kullanıma hazır bekletilmesi oldukça önemlidir (Lanevski ve Wardrop 2001, Kisielewicz ve Self 2014). Transfüzyon amacıyla kullanılacak kan genellikle sitrat-fosfat-dekstroz-adenin 1 (CPDA-1) solüsyonu içeren plastik torbalara alınır ve ileride kullanılmak üzere saklanır. Saklama süresince tam kanda temel olarak metabolik, şekilsel ve membran değişiklikleri ile oksidatif stres gelişmekte, bu durum da saklanan tam kanın kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Hess 2010). İnsan hekimliğinde saklanmış tam kanda gelişen oksidatif stresin, eritrositlerin oksijen taşıma kapasitesini bozduğu ve canlılıklarının azalmasına neden olduğu bildirilmektedir (Jozwik ve ark 1997, Marjani ve ark 2007, D'Alessandro ve ark 2015). İnsan hekimliğinde bu sorunun hafifletilmesine veya giderilmesine yönelik olarak konserve amaçlı kan alımı öncesinde donörlere farklı antioksidan uygulanması (Maeda ve ark 1992, Racek ve ark 1997) veya saklanan tam kana melatonin (Gültekin ve ark 2000a, Şekeroglu ve ark 2012, Ozcelik 2014), vitamin C (Gültekin ve ark 2000b) ve N-asetil sistein (Pallotta ve ark 2014) gibi antioksidan özellikli farklı maddelerin ilavesinden olumlu sonuçlar alındığı bildirilmektedir. Köpeklerde ise bu kapsamda bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Selenyum ve vitamin E, yapı olarak birbirinden farklı antioksidanlardır ancak sinerjistik etki göstermektedirler. Selenyumun metabolik fonksiyonu E vitamini ile yakından ilişkilidir ve her iki bileşen de hücrel membranları oksidatif hasardan korumaktadır (Harvey 2010, Behera ve ark 2011, Ben Amara ve ark 2011).

Bu çalışmada anemili köpeklerde aneminin şiddeti ve tipine göre oksidan/antioksidan durumun değerlendirilmesi ve donörlere vitamin E + selenyum uygulamasının CPDA-1 içeren torbalara alınarak saklanan köpek tam kanının kalitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma donörlerden alınan kanda saklama süresince eritrosit membranlarında şekillenecek oksidatif hasarın, donörlere vitamin E + selenyum uygulaması ile azaltılabileceği hipotezini öngörmektedir.

Araştırma sonuçlarının;

1. Köpeklerde aneminin şiddet ve tipine göre antioksidan uygulamasının endikasyonunu,
2. CPDA-1’li köpek tam kanının saklama süresince oksidatif değişiklikleri,
3. Donörlere vitamin E + selenyum uygulamasının saklanan tam kanın oksidan/antioksidan durum üzerine etkisinin belirlenmesiyle güvenli saklama süresinin uzatılmasını sağlayıp sağlamadığını ortaya koyması beklenmektedir.

1.1. Serbest Radikaller

Atomlarda elektron dağılımı incelendiğinde elektronların kabuklarda olduğu görülür. Kabuklar alt kabuklardan, alt kabuklar da elektron içeren orbitallerden oluşmaktadır. Orbitallerde her biri diğerinin fizikokimyasal reaksiyonlara girmesini engelleyen, zıt spinlerde hareket eden elektron çiftleri vardır (Young ve Woodside 2001). Serbest radikaller dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan, kararsız yapıları nedeniyle kısa ömürlü, oldukça reaktif atom veya moleküllerdir. Elektrik yük olarak pozitif, negatif ya da nötr olabilirler (Hermes-Lima 2004). Biyolojik sistemlerde serbest radikaller temelde oksijen türleri olarak temsil edilirler. Bunlar; hidroksil radikal (OH^\cdot), süperoksit radikal (O_2^\cdot), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (O_2) ve ozondur (O_3) (Peet 2012).

Oldukça reaktif olan radikaller komşu moleküllerden elektron alarak kendi orbital yapılarını dengeleme eğiliminde olduklarından çeşitli zincir reaksiyonları başlatabilirler. Reaksiyona girdikleri radikal olmayan moleküllerden elektron çekerek yapılarını bozabilir ve yeni serbest radikaller oluşturabilirler. Kimyasal yapıları dolayısıyla bu maddeler oksidan olarak da ifade edilir ve reaksiyona girdikleri molekülleri okside ederler (Durackova 2010, Hermes-Lima 2004).

Oksijen, canlı organizmaları oluşturan moleküllerin temel yapısına girmesi, aerob canlılardaki oksidasyon reaksiyonları ve solunumda rol alması nedeniyle yaşamsal öneme sahiptir. Bununla birlikte, oksijen molekülü farklı orbitallerde iki adet eşlenmemiş elektrona sahip bir diradikaldir ve reaksiyonlar sırasında diğer moleküllerden elektron çekme eğilimindedir (Valko ve ark 2007). Vücutta Reaktif Oksijen Türleri (ROT) olarak tanımlanan oksijen merkezli radikaller normal hücre metabolizması kapsamında artık ürünler olarak ve olumsuz çevresel koşullara maruz kalma sonucu oluşturulur. Radikallerin çoğunluğu özellikle solunum zinciri kapsamında enerji kazanımında oksijenin ayrışması yoluyla oluşur. Adenozin 5-trifosfat (ATP) sentezi için enerji sağlayan, yaşamsal önemdeki bu reaksiyon mitokondrilerde birçok ara basamakta gerçekleşir (Young ve Woodside 2001). Memeli hayvanlarda oksijen radikallerinin çoğu mitokondrilerde ortadan kaldırılır. Serbest radikallerin sadece %2-4'ü sitozole ulaşır ve orada antioksidan savunma sistemi tarafından tutulur. Sigara dumanı, ozon yükü, hava kirliliği, çevresel zehirler ve zararlı ışınlar gibi çevresel faktörler ile belirli ilaçlar (örneğin; kloramfenikol) da serbest radikal oluşumuna katkı sağlarlar (Valko ve ark 2007). Aerob organizmalar, organik

moleküllerden enerji açığa çıkarmak için moleküler oksijeni kullanmak zorunda olduklarından açığa çıkan serbest radikaller ile yaşamaya mecburdurlar (Sorg 2004). Organizmada açığa çıkan serbest radikaller ve diğer reaktif türleri karmaşık bir antioksidan savunma sistemi ile sınırlandırılmakta ve biyomoleküllere verebilecekleri hasar azaltılmaya çalışılmaktadır (Young ve Woodside 2001).

Organizma, oksijen radikallerinden korunmak için vücuda ait antioksidatif vital maddelerden oluşan antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Bu savunma sistemleri serbest radikalleri nötralize eder. Antioksidan savunma sistemleri kapsamındaki moleküller endojen ve eksojen kaynaklı, enzimatik ve non-enzimatik yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi, hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler (Percival 1998, Durackova 2010). Antioksidatif etkili maddeler vitamin E ve C, beta karoten, koenzim Q10, karotenoid ve bioflavonoid gibi çeşitli maddeleri kapsar (Bast ve Haenen 2013). Vücuda ait antioksidatif savunma SOD/CAT sistem ve GSH-Px sistem olmak üzere başlıca iki enzim sisteminden oluşur. Mitokondri ve plazmada bulunan SOD, süperoksit radikalini hidrojen peroksit'e dönüştürür. Hidrojen peroksit, CAT tarafından su ve oksijene parçalanır (Peet 2012). CAT ayrıca peroksizomlarda oluşan peroksitlerin nötralizasyonunu sağlar. GSH-Px sistemi selenoprotein yapısındaki dört farklı enzimden oluşur ve mitokondri ile sitozolde lipid peroksidasyon ürünlerini indirgerler (Young ve Woodside 2001, Hermes-Lima 2004).

Fizyolojik koşullarda serbest radikallerin oluşumu ve antioksidan sistem ile ortadan kaldırılması bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak tanımlanır (Adly 2010). Oksidatif denge sağlanabildiği sürece, organizma serbest radikallerden olumsuz etkilenmemektedir. Serbest radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında azalma dengenin bozulmasına neden olur. Reaktif oksijen/nitrojen türlerinin aşırı derecede artması oksidatif hasara neden olur ve oksidatif stres olarak tanımlanır (Halliwell 2011). Oksidatif stres; dokularda gerek radikallerin artan oluşumunda, gerekse de antioksidanların yetersiz alımı veya antioksidan enzim sisteminin engellenmesi sonucu oluşur ve vücudun antioksidan savunma sistemi yardımıyla kendini koruma yeteneğinin aşıldığını gösterir. Organizmanın sürekli oksidatif strese maruz kalması, hücrelerde belirli hastalıkların gelişimine yol açabilen değişikliklere neden olur (Valko ve ark 2007).

1.1.1. Serbest Radikallerin Oluşumu ve Biyolojik Etkileri

Serbest radikaller biyolojik olarak pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte, çevresel olarak ise organik maddelerin çürümesi, boyaların kuruması ve plastik maddelerin işlenmesi gibi endüstriyel işlemlerde oluşabilmektedir (Durackova 2010). Hava kirliliği, kimyasallar, sigara dumanı ve iyonize edici radyasyon gibi çevresel etkilere maruz kalma sonucu hücrelerde radikallerin çoğaldığı, hipoksi, yangı, yoğun egzersiz, iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumların da radikal oluşumunu tetikleyen faktörler olduğu rapor edilmektedir (Young ve Woodside 2001).

Organizmada serbest radikaller genellikle oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkmaktadır (Valko ve ark 2007). Oksijen metabolik olayların normal seyrinde toplam dört elektron kabul edebilir. Oksijene bir elektron eklenmesi süperoksit radikali, iki elektron eklenmesi radikal olmayan hidrojen peroksit, üç elektron eklenmesi hidroksil radikali ve dört elektron eklenmesi ise su oluşumuna neden olur (Peet 2012). Normal metabolizmada moleküler oksijenin %98'i oksidazlar yoluyla suya çevrilmektedir. Geriye kalan kısmı ise oksijenazlar yoluyla hücre içi organellerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştiren, membranlarda oksidatif yıkıma neden olan reaktif toksik ürünlere dönüştürülür (Kohen ve Nyska 2002).

Literatürde reaktif türler; oksijen, nitrojen, sülfür gibi farklı merkez moleküllerine göre isimlendirilmektedir. Oksijen merkezli radikaller ROT olarak tanımlanmaktadır (Hermes-Lima 2004). Ancak bu terim sadece süperoksit ya da hidroksil gibi radikalleri belirtmekte kullanılmamakta, aynı zamanda hidrojen peroksit, singlet oksijen ve hipoklorik asit gibi nonradikal oksijen türlerini de kapsamaktadır (Peet 2012). Benzer şekilde, Reaktif Nitrojen Türleri (RNT) tanımı da literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır (Valko ve ark 2007). Nitrik oksit, oksijen içeren bir serbest radikaldir. Oksijen gibi yaşam için gerekli, fakat yüksek konsantrasyonlarda toksiktir (Halliwell 2011). Oksidatif stres oluşumunda rol oynayan önemli ROT ve RNT molekülleri Çizelge 1.1'de gösterilmiştir. Önemli reaktif türlerinin oluşumu ve etkileri de Çizelge 1.2'de özetlendi.

Çizelge 1.1. Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri (Hermes-Lima 2004)

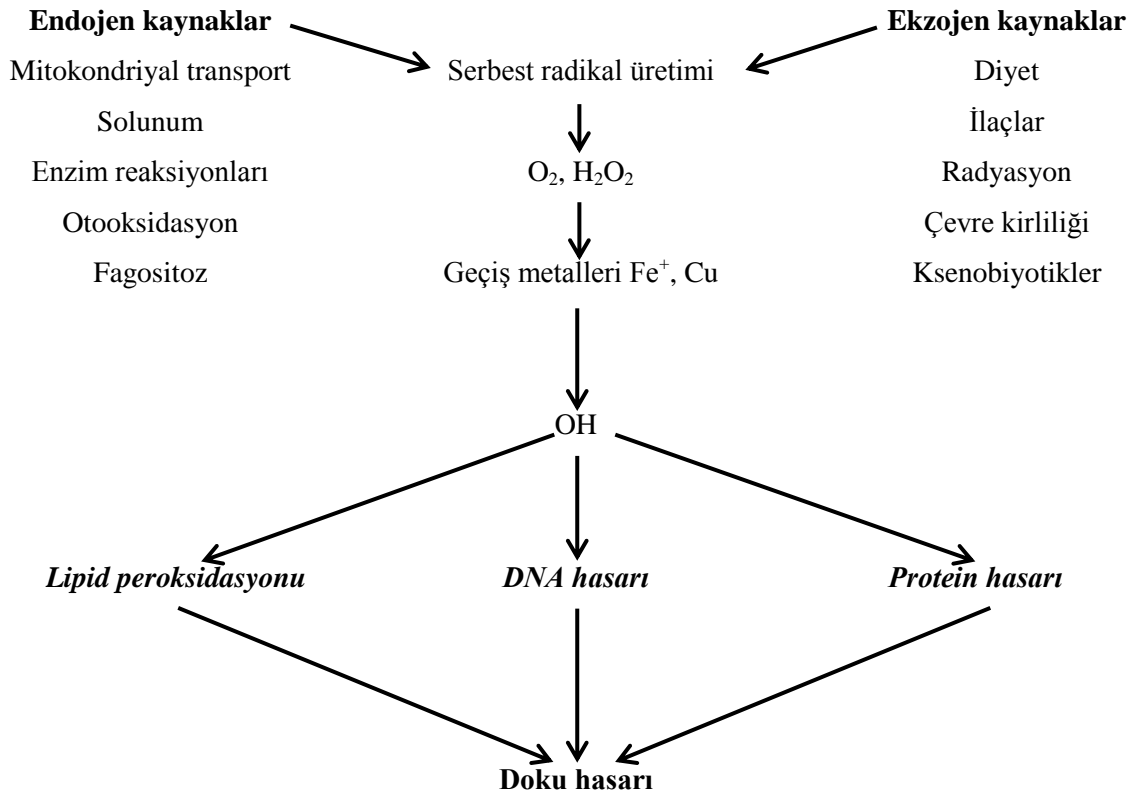
Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	
Radikal	Radikal olmayan
Süperoksit (O_2^-)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil (OH^-)	Hipoklorik asit ($HOCl$)
Peroksil (LO_2)	Ozon (O_3)
Alkoksil (LO)	Singlet oksijen (O_2)
Lipid hidroperoksit ($LOOH$)	Peroksinitrit ($ONOO^-$)
Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)	
Radikal	Radikal olmayan
Nitrik oksit (NO)	Nitroksil (HNO)
Nitrojen dioksit (NO_2)	Nitroksit (NOS)
	Nitröz asit (HNO_2)
	Peroksinitrit ($ONOO^-$)

Çizelge 1.2. Önemli reaktif türlerin oluşumu ve etkileri (Tunc 2010, Peet 2012)

Reaktif tür	Oluşumu	Etkileri
Süperoksit anyonu (O_2^-)	Oksijenin bir elektron almasıyla oluşur. ROT'un birincil formudur. Mitokondri/endoplazmik retikulum arasındaki elektron transferi sırasında açığa çıkabilir.	Okside ve redükte edici. 1. Hidrojen peroksitin hidroksil radikallerine dismütasyonu. 2. Thiol grupları ile reaksiyona girerek radikal oluşturma. 3. Peroksinitritin oluşumu.
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Oksijenin iki elektron almasıyla oluşur. Oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondride süperoksitin dismütasyonu ya da çeşitli oksidazların ürünü olarak oluşur. Radikal değildir.	Yüksek biyolojik dağılımı vardır. Plazma ve nükleer membranlara kolayca geçer. DNA yapımı, haberleşme ve yangı sürecinde oluşur.
Hidroksil radikali (OH $^-$)	Oksijenin üç elektron almasıyla oluşur. Süperoksit ve hidrojen peroksitin metal bir katalizörle birleşmesi (Haber-Weiss reaksiyonu) ya da serbest demirin hidrojen peroksitle birleşmesi (Fenton reaksiyonu) ile oluşur.	Oldukça reaktif ve kısa ömürlü bir oksijen radikalidir. Bütün hücrel yapıları saldırır. Lipid peroksidasyonunu başlatır, DNA yapısını bozar, elektron transfer reaksiyonlarına katılır.
Singlet oksijen (O_2)	Oksijen molekülünün en indirgenmiş halidir. Süperoksit anyonu dismütasyonu sırasında oluşur. Fotosensitizasyon ile de oluşturulabilir.	Okside edici bir ajandır. Karotenoid ve yağ asitlerindeki karbon-karbon çift bağlarını bozabilir.
Peroksil ve alkoksil radikalleri (LO_2 ve LO)	Organik peroksitlerin yıkımı esnasında ve karbon radikallerinin oksijenle reaksiyonunda oluşur.	Okside edici bir ajandır. Hidrojen iyonunu diğer moleküllerden ayırarak lipid peroksidasyonuna katkıda bulunur.
Nitrik oksit (NO)	L-arjinin'in nitrik oksit sentetaz enzimi ile reaksiyonu sonrası üretilir. Kendisi radikal değildir ama radikal üretimine katkıda bulunabilir.	Süperoksit anyonuyla birleşerek glutatyon, sistein, deoksiriboz ve thiollerle reaksiyona giren peroksinitriti oluşturur.
Hipoklorik asit (HOCl)	Hidrojen peroksitin miyeloperoksidazla reaksiyonu sonrası oluşur.	Oldukça reaktiftir ve yağda çözünebilir. Protein yapıları, thiol, aminoasit ve metiyonini okside eder.

Serbest radikaller ve ROT sadece negatif yıkımlayıcı özelliklere sahip olmayıp, aynı zamanda farklı şekillerde fizyolojik fonksiyonlara pozitif etkide bulunurlar (Hermes-Lima ve ark 2004). Örneğin oksijen radikalleri nötrofil/makrofajlar tarafından gerçekleştirilen fagositoz sürecinde immün sistemin patojen etkenlere karşı savunma mekanizmasında önemli bir görev yapar. NO kas relaksasyonu, nörotransmisyon ve vazodilatasyon gibi önemli biyolojik süreçlerde etkindir (Valko ve ark 2007). Süperoksit, hidroperoksit ve hidroksil radikalleri subtoksik dozda oluşturdukları uyarıcı etkilerle hücre gelişimi, apopitoz ve hücre adhezyonu gibi farklı biyolojik olaylarda rol oynarlar (Peet 2012).

Enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olan serbest radikaller antioksidan savunma sistemi tarafından yeterli nötrale edilemediği durumlarda protein, lipid, karbonhidrat ve DNA oksidasyonu yaparak hücre zarında, hücre organellerinde ve DNA'larda patolojik değişiklikler oluşturarak etkilerini gösterirler (Durackova 2010). Hücre ölümü, doku hasarı ve nekroz sonucunda, organ veya sistemlerde fonksiyon yetersizliği meydana getirebilirler (Valko ve ark 2007, Adly 2010). Serbest radikal kaynakları ve oluşturduğu hasarlar Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Serbest radikallerin kaynakları ve etkileri (Young ve Woodside 2001)

Lipidlere etkileri

Tüm hücrel membranlar içerdikleri yüksek oranda doymamış yağ asitleri nedeniyle oksidasyona oldukça duyarlıdır (Dumaswala ve ark 1999). Oksidatif hasarın en önemli sonuçları genel anlamda lipid peroksidazlar ve serbest radikalleri oluşturan zincir reaksiyonlar yoluyla gelişir (Dotan ve ark 2004). Fenton reaksiyonu sonrası açığa çıkan hidroksil radikali zincir reaksiyonu başlatır ve çift katmanlı membrandaki doymamış yağ asidinden bir hidrojen atomu alır. Zincir reaksiyon, oksijenin eklenmesi durumunda lipid peroksil radikalleri ve lipid peroksitin oluşumuyla devam eder (Hermes-Lima 2004). Bu aşamada lipid yapısının bozulması sonucu MDA, etan ve pentan gibi son ürünler açığa çıkar (Grotto ve ark 2009). Ayrıca MDA, kanda ve idrarda belirlenebildiği için serbest radikal hasarının belirteci olarak kullanılabilir (Dotan ve ark 2004, Valko ve ark 2007). Lipid moleküllerinin peroksidasyonu, moleküler yapının değişmesine ya da hasar görmesine neden olabilmektedir. Oluşan aldehitlerin protein yapılarla çapraz reaksiyona girmesi membran yapısının tamamen bozulmasıyla sonuçlanmaktadır (Durackova 2010). Mitokondriyal membran bütünlüğünün bozulması ise daha fazla serbest radikal oluşumuna neden olabilmektedir (Kohen ve Nyska 2002, Peet 2012).

Malondialdehit hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlar doğurur. Bu özelliklerinden dolayı MDA, DNA'nın nitrojen bazları ile de reaksiyona girebildiğinden hücreler için genotoksik ve karsinogeniktir (Grotto ve ark 2009).

Proteinlere etkileri

Proteinlerin yapısındaki özellikle prolin, histidin, arjinin, sistein ve metiyonin amino asitleri hidroksil radikali ve oksidatif hasara oldukça duyarlıdır (Dumaswala ve ark 2009). Oksidatif hasar sonucu protein parçalara ayrılabilir ya da kalıntılar diğer kalıntılarla çapraz reaksiyonlara girebilir. Enzim veya reseptör olan membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonuna duyarlı oldukları için önemli hücrel fonksiyonlarını kaybetmektedirler (Kohen ve Nyska 2002, Peet 2012).

DNA üzerine etkileri

Serbest radikaller etkilerini özellikle DNA'yı oluşturan nükleotid yapısı içinde yer alan pürin ve pirimidin bazları üzerinde gösterirler. Radikaller aracılığı ile özellikle guanin hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkabilmektedir (Valko ve ark 2007, Peet 2012). Guanin hidroksilasyonunun son ürünlerinden biri olan 8-hidroksideoksiguanozin oksidatif stres belirteci olarak kullanılabilir (Kohen ve Nyska 2002).

Serbest radikallerin lipid, protein ve DNA üzerine etkileri, açığa çıkan ürünler ve sonuçları Çizelge 1.3'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.3. Serbest radikallerin lipid, protein ve DNA üzerine etkileri ve sonuçları

(Lugrin ve ark 2013)

Lipid hasarı	<i>Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu</i> ↓ Lipid peroksidasyonu Toksik aldehitler ↓ Membran bozuklukları Sitotoksosite	<i>Lipoprotein oksidasyonu</i> ↓ Okside LDL ↓ Pro-inflamatuvar etki Atherosklerozis	<i>Lipid nitrasyonu</i> ↓ Nitratlı lipidler ↓ Nitrik oksit taşıma Hücre sinyali	
Protein hasarı	<i>Sülhidril oksidasyonu (Cys)</i> ↓ Sülfenik asit Disülfid ↓ Protein parçalanması Fonksiyon kaybı	<i>Karbonilasyon (Pro, Thr, Lys, Arg)</i> ↓ Keton Aldehid ↓ Protein parçalanması Fonksiyon kaybı	<i>Fenolik nitrasyon (Tyr)</i> ↓ Nitratlı protein ↓ Fonksiyon kaybı	<i>Sülfür nitralizasyonu (Cys)</i> ↓ Nitröz protein ↓ Fonksiyon kaybı
DNA hasarı	<i>Nükleotid oksidasyonu</i> ↓ 8-oxoguanin oluşumu ↓ Mutasyon		<i>Deoksiriboz oksidasyonu</i> ↓ DNA sarmalı parçalanması ↓ Mutasyon	

1.2. Antioksidan Savunma Sistemi

Organizma, serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge kurarak oksidatif hasardan en az düzeyde etkilenmekte ve serbest radikallerin yararlı özelliklerinden faydalanmaktadır (Halliwell 2011). Antioksidan moleküller; endojen ve eksojen kaynaklı, enzimatik ve non-enzimatik yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi, hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirir (Percival 1998). Antioksidanlar etki şekillerine göre üç farklı grupta tanımlanmıştır (Nemec ve ark 2000);

Koruyucu antioksidanlar; yeni ROT oluşumunu engelleyenler (seruloplazmin, albumin, miyogloblin, ferritin, transferrin)

Temizleyici antioksidanlar; oluşan ROT'ları ortamdaki kaldırarak hasarı önleyenler (glutasyon, Vitamin A, C ve E, ürik asit, bilirubin)

Enzimatik antioksidanlar; ROT'un diğer molekülleri okside etmesini engelleyenler (SOD, GSH-Px, CAT ve metalloenzimler)

Hasar öncesi radikal oluşumunu önleyen, oksidatif hasarı onaran, hasara uğramış molekülleri temizleyen ve mutasyonları önleyen hücre içi antioksidanlar Çizelge 1.4'de, hücre dışında aktivite gösteren antioksidanlar da Çizelge 1.5'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.4. Organizmada önemli hücre içi antioksidanların fonksiyon ve yerleşimleri

(Sorg 2004)

HÜCRE İÇİ ANTIOKSİDANLAR		
Antioksidan	Fonksiyonu	Bulunduğu Yerler
Enzimler		
Cu, Zn, Mn-SOD	O ₂ 'nin H ₂ O ₂ ve O ₂ 'ye dismutasyonunu sağlar.	Sitozol, çekirdek, lizozomlar ve mitokondri
GSH-Px	GSH'nin GSSG'ye oksidasyonu ile bağlantılı olarak sırasıyla H ₂ O ₂ 'yi ve yağ asit hidroksiperoksitlerini indirger.	Sitozol, mitokondri ve çekirdek
CAT	H ₂ O ₂ yi H ₂ O ve O ₂ 'ye dönüştürür.	Peroksizomlarla sınırlı
GSH Redüktaz	GSSG'yi GSH'ye indirger ve böylece peroksizomlarla beraber çalışır.	Peroksizomlarla beraber
GSH-S-transferaz	GSH ile birleşerek ksenobiotikleri metabolize eder.	Sitozol ve membrana bağlı
Protein-disülfid izomeraz	Yeni disülfid bağ oluşumunu ve enzim aktif bölgesindeki ditiyol\disülfid grup değişimini katalize eder.	Genellikle endoplazmik retikulum lümeninde
Tiyoredoksin	Tiyollere karşılık gelen protein disülfidlerini indirger, ayrıca H ₂ O ₂ ve lipid peroksitlerini metabolize eder.	Genellikle endoplazmik retikulumda
Peroksiredoksin	H ₂ O ₂ veya peroksitlerle tepkimeye girerek tiyol radikallerini uzaklaştırabilir.	Protein tipine bağlı olarak farklı yerlerde

Çizelge 1.4 Devam

Metal İyon Sekestresyonları		
Ferritin	Hücre içi demir deposudur.	Sitozol
Metallotiyoninler	Metal iyonu bağlarlar.	Sitozol ve çekirdek
Düşük Molekül Ağırlıklı Faktörler		
GSH	GSH-Px için kofaktör. Proteinlerin sülfhidril gruplarını oksidasyon ve çapraz bağlantılardan koruyarak aktif ürünleri temizler.	Tüm hücre
Vitamin C	Birçok enzim için kofaktör, GSH ile eşzamanlı çalışır ve doğrudan ROT'ları temizleme potansiyeli vardır.	Tüm hücre
Beta karoten	Vitamin A prekursorü peroksil temizleyicisi.	Hücre membranı
Vitamin E	Membranları oksidatif hasardan korur.	Tüm membranlar
Koenzim Q10	Mitokondriyal ve hücre membranlarındaki elektron transport zincirindedir. Biyolojik membranlarının oksidatif hasardan korunmasında Vitamin E ile birlikte çalışır.	Tüm membranlar

Çizelge 1.5. Önemli hücre dışı antioksidanlar ve fonksiyonları (Sorg 2004)

HÜCRE DIŞI ANTIOKSİDANLAR	
Antioksidan Savunma	Açıklamalar
Eritrosit	Hücre içi antioksidan savunmalarıyla metabolizma için O_2^- ve H_2O_2 'yi tutabilir.
Enzimler	
Peroksidaz	Hücre içi peroksidaza göre daha düşük konsantrasyonda bulunur.
Proteinler	
Transferrin ve Laktoferrin	Öncül-oksidan aktiviteden korumak için demiri bağlarlar.
Seruloplasmin	Fe^+ ve Cu^+ tarafından stimule edilen lipid peroksidasyonunu baskılayan akut faz proteindir.
Albümin	Hücre dışı tiyollerin en önemli kaynağıdır.
Haptoglobulin	Serbest hemoglobini bağlar.
Hemopeksin	Hemi bağlar ve istenmeyen redoks tepkimelerinden korur.
Apolipoproteinler	Metionin kalıntılarının fosfolipid ve kolesterol ester hidroperoksitlerini ilgili alkollere kimyasal olarak indirgeme potansiyelleri vardır.
Protein Olmayan Bileşikler	
Glukoz	Yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. H_2O_2 'yi temizleme potansiyeli vardır.
Ürik asit	ROT temizleyebilmesinin yanında demir ve bakır iyonlarını da bağlayabilmektedir.
Vitamin C	Farklı oksidanları etkin temizler. Plazma lipidleri için farklı oksidanlara karşı birinci basamak antioksidan savunmayı sağlar.
Bilirubin	ROT temizler ve yağ asitlerini oksidasyondan korur.
Vitamin E	Etkin LOO temizleyicisidir.
Selenyum	GSH-Px ve tiyoredoksinlerle çalışır.
Koenzim Q10	Çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Lipoproteinlerin birinci basamak yağda çözünebilir antioksidan savunmasında görev alır.

Enzimatik antioksidanlar

Antioksidatif savunma sistemi organizmada oluşan serbest radikalleri ilk aşamada SOD, GSH-Px ve CAT gibi enzimatik antioksidanlarla nötralize etmektedir (Valko ve ark 2007).

Süperoksit dismütaz, süperoksit anyonunun hidrojen peroksit ve oksijene dismütasyonunu sağlar ve devam eden zincir reaksiyonlarda başlatıcı olarak görev alır. Bu anlamda SOD, oksidatif stres oluşumuna karşı birincil savunma olarak da anılır (Peet 2012). SOD, sitozolde Cu-Zn, mitokondride Mn ve ekstraselüler Cu-Zn olmak üzere üç farklı izoenzim formunda bulunur. Süperoksit üretiminin arttığı kimyasal ya da patofizyolojik reaksiyonlar sonucu Cu-Zn SOD aktivitesi de artar (Young ve Woollside 2001).

Glutasyon organizmayı serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasara karşı koruyan maddelerin başında gelir. Glutasyon glutamat, sitein ve glisinden oluşan bir tripeptittir (Kohen ve Nyska 2002). GSH-Px tarafından katalizlenen reaksiyonlarda reaktif sülfhidril grupları hidrojen peroksiti suya, lipid peroksitlerini ise toksik olmayan alkollere redükte eder. GSH-Px, selenyum enzim ailesinin bir üyesi olup, farklı özelliklerde ve farklı dokularda dört alt tipi bulunmaktadır (Hermes-Lima 2004). Hücre içinde özellikle sitozol ve mitokondride bulunur ve peroksizomlar dışında açığa çıkan hidrojen peroksit radikalini temizlemekle görevlidir (Sorg 2004).

Çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşan hidrojen peroksit, Fenton ya da Haber Weiss reaksiyonlarına katılarak hidroksil radikaline dönüşmeden önce su formuna redükte edilmelidir. Hidrojen peroksiti redükte edebilecek en önemli enzimlerden biri CAT enzimidir (Hermes-Lima 2004). CAT, temel olarak peroksizomlarda ve daha az miktarda sitozol ve hücrenin mikrozomal fraksiyonlarında bulunur. Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu yapılar eritrositler ile yüksek peroksizomal içerik bulunduran karaciğer ve böbrektir (Young ve Woollside 2001). CAT, bağışıklık sistemi hücrelerini kendi ürettikleri serbest radikallere karşı koruma görevini de üstlenir (Peet 2012).

Nonenzimatik antioksidanlar

Antioksidatif yapıdaki nonenzimatik etkili maddeler vitamin A, C ve E ile hemoglobin, ferritin, miyoglobin, ürik asit, bilirubin, laktoferrin, transferrin, melatonin, askorbik asit, albümin, selenyum, koenzim Q10 ve sekonder bitkisel etken maddeleri (karotenoid ve bioflavonoid) kapsar (Young ve Woodside 2001, Sorg 2004).

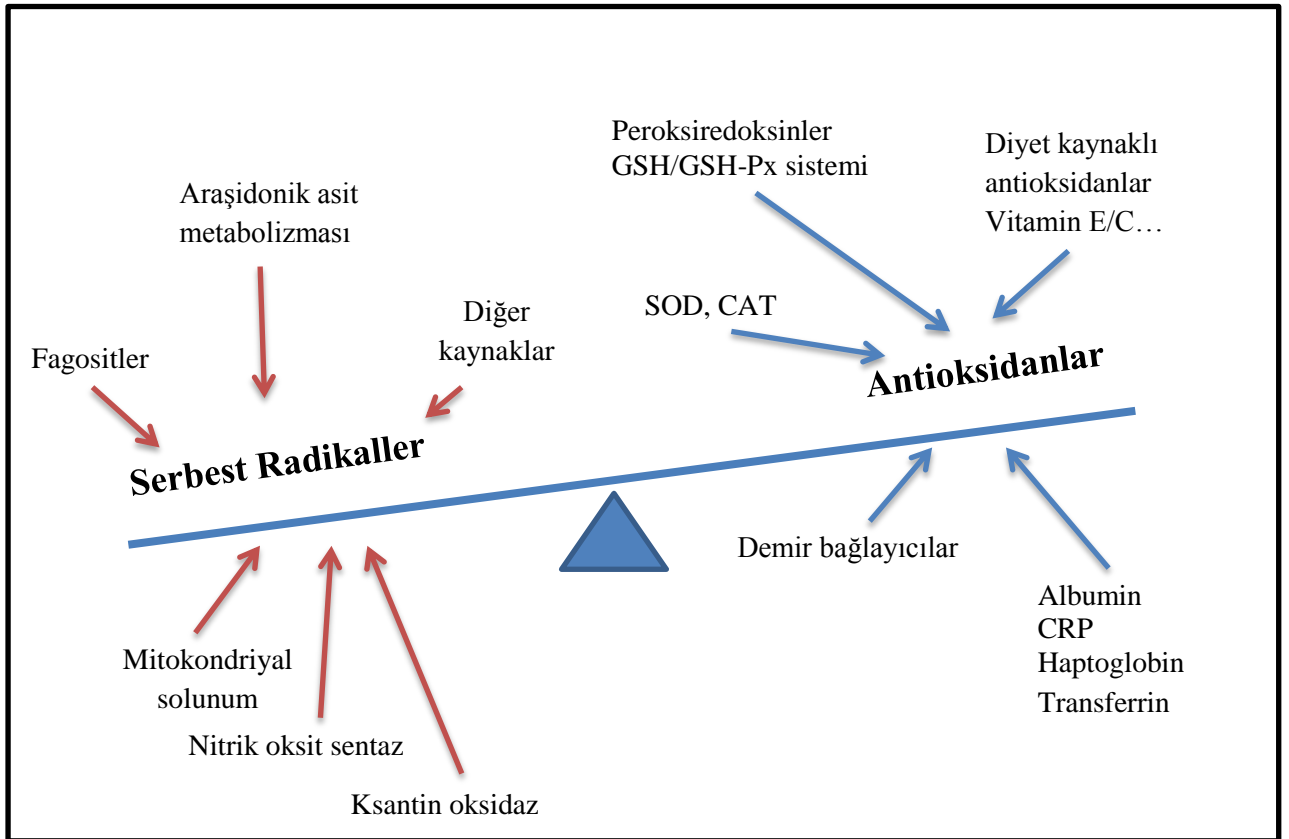
Vitamin E, hücre membranının en önemli antioksidanıdır. Lipit peroksit radikallerini redükte ederek daha az toksik formları olan lipit peroksil radikallerine dönüştürür. Okside olan vitamin E, hücre membranında bulunan askorbat tarafından redükte edilir. Eksikliği durumlarında eritrositlerin peroksidatif hemoliz riskinin arttığı belirtilmektedir (Harvey 2011). Selenyum, selenoproteinlerin aktif kısmı olan selenosisteinlerinden oluşturulmuş, GSH-Px, fosfolipid hidroksiperoksit glutatyon peroksidaz, tiyoredoksin redüktaz gibi eritrositlerde antioksidan sistem üzerine önemli etkileri olan enzimlerin yapısında bulunmaktadır (Sorg 2004). Vitamin E ve selenyum, yapı olarak birbirinden farklı antioksidanlar olup sinerjistik etki göstermektedirler. Selenyumun metabolik fonksiyonu E vitamini ile yakından ilişkilidir ve her iki bileşen de hücrel membranları oksidatif hasardan korumaktadır (Behera ve ark 2011, Cemek ve ark 2011).

1.3. Oksidatif Stres

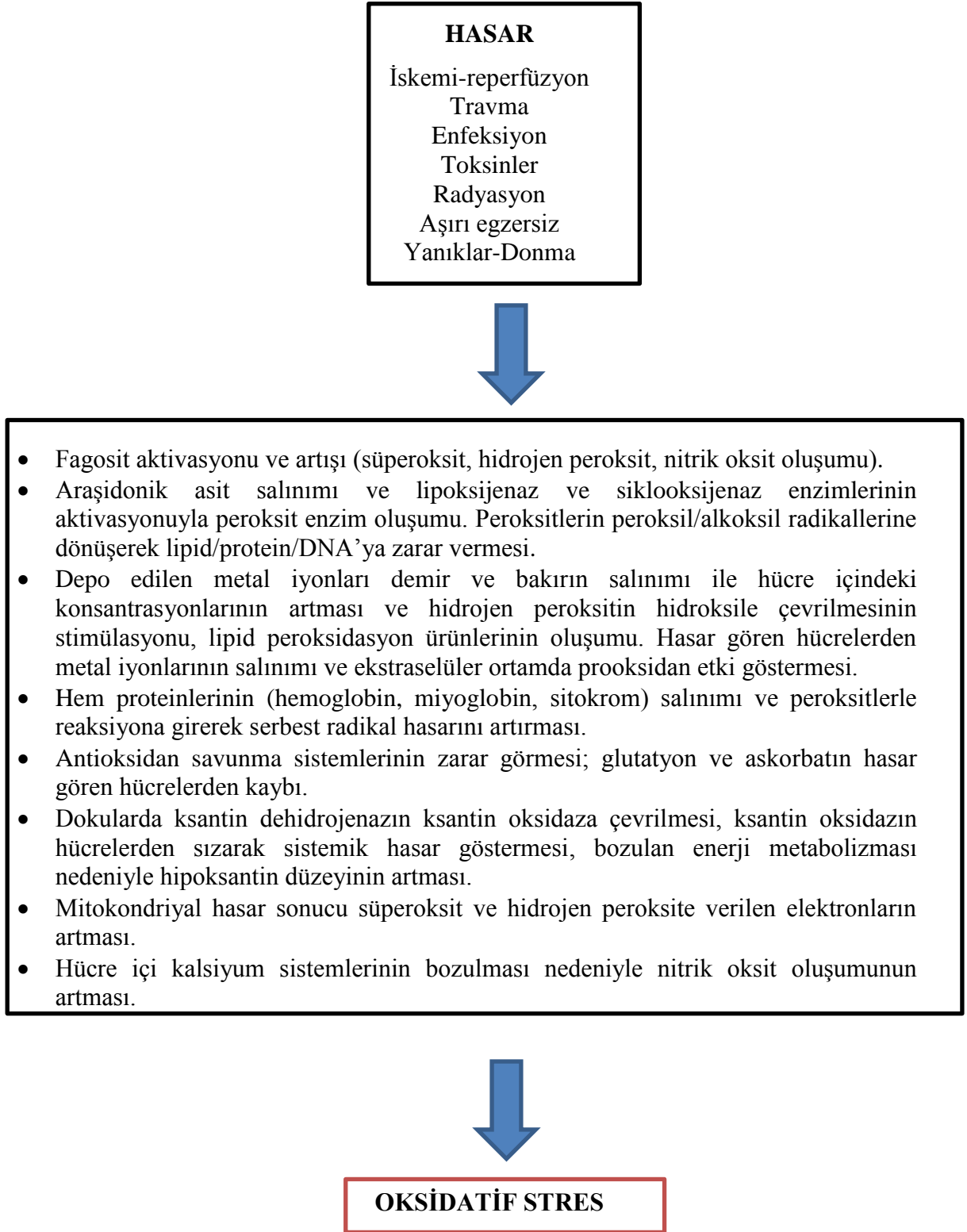
Oksidatif stres, reaktif serbest radikal türlerinin üretimi ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmaktadır. Prooksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin prooksidanlar yönünde bozularak potansiyel hasar oluşumunun ortaya çıkması olarak da ifade edilmektedir. Oksidatif stres temel olarak iki nedenle oluşur (Halliwell 2001);

1. Antioksidanların tükenmesi; enzimatik antioksidanları etkileyen mutasyonlar ya da savunma sistemi üzerine etkili toksik etkenler neden olabilir. Örneğin pek çok ksenobiyotik glutatyonun konjugasyonu ile metabolize olmaktadır. Ksenobiyotiklerin yüksek dozda uygulanması glutatyonun tükenmesine, ayrıca diyetle alınan antioksidanların yetersizliği de oksidatif strese neden olabilir.
2. ROT/RNT üretiminde artış; yüksek konsantrasyonda reaktif özellikte toksine maruz kalma ya da fizyolojik ROT/RNT üretim sistemlerinin aşırı aktive olması serbest radikal konsantrasyonunu artırarak oksidatif strese neden olabilmektedir.

Şekil 1.2’de oksidatif stres oluşumu, Şekil 1.3’de ise oksidatif strese neden olan mekanizmalar özetlenmiştir.



Şekil 1.2. Oksidatif stres oluşumu (Halliwell 2011)



Şekil 1.3. Oksidatif stres oluşumuna neden olan mekanizmalar (Gutteridge ve Halliwell 2010)

Oksidatif stres belirli bir dereceye kadar tolere edilebilir. Bu durum, antioksidan savunma sisteminde sentez veya aktivite artışı ile sağlanabilmekte ve bu şekilde oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki denge tekrar oluşturulabilmektedir (Halliwell 2011). Tolerans sınırının aşılması durumunda DNA hasarı, transmembranöz iyon transport sisteminde ve diğer proteinlerde hasarlar ve lipid peroksidasyonlarını kapsayan şiddetli hücre metabolizma bozuklukları gelişebilmektedir. Bu bozukluklar, hücre hasarlarından hücre ölümüne ya da doku hasarına kadar değişebilmektedir (Durackova 2010).

Oksidatif stres ve hasarın yangı, yaşlanma, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemik hasar, karsinogenez, mutagenез, immünolojik, nörolojik, ürolojik hastalıklar ve sindirim sistemi, göz, deri, akciğer ve karaciğer hastalıklarının patogeneğinde ve ilerlemesinde rolü olduğu ortaya konularak, insan hekimliğinde pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Sorg ve ark 2004, Valko ve ark 2007).

1.3.1. Oksidatif Stresin Ölçülmesi

Oksidatif stres, serbest radikallerin ya da oksidatif biyobelirteçlerin ölçülmesi ile ortaya konulabilmektedir. Bunun için plazma/serum, eritrosit, doku örnekleri gibi çeşitli materyallerde analiz yapmaya uygun yöntemler geliştirilmiştir (Dotan ve ark 2004, Bast ve Haenen 2013). Reaktif türlerin kesin olarak tanımlanabilmesi için serbest radikallerin ölçülmesi önemli olmakla birlikte, son derece reaktif ve kısa ömürlü olmaları nedeniyle zordur. Serbest radikalleri doğrudan ölçen tek analitik teknik, spin rezonans spektrometrisidir. Spin rezonans spektrometrisi ileri teknik donanım gerektirmesi, çok duyarlı olmaması ve mikromolar düzeyde sabit konsantrasyonlarda serbest radikaller gerektirmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bu nedenle klinik araştırmalarda oksidatif biyobelirteçlerin ölçümünün daha pratik olduğu bildirilmektedir (Dotan ve ark 2004, Valko ve ark 2007).

Oksidan/antioksidan durum; enzimatik (SOD, GSH-Px, CAT) ve/veya nonenzimatik (vitamin A, C ve E ile GSH/GSSG, ürik asit) antioksidanlar ile serbest radikaller tarafından okside edilen lipid (isoprostanlar, okside lipoproteinler, hidroksi peroksitler), protein (thiol grupları), karbonhidrat ve DNA ürünlerinin ve bazı özel enzimlerin (miyeloperoksidaz, ksanto oksidaz) ölçümünü kapsamaktadır (Dotan ve ark 2004, Lykkesfeldt ve Svendsen 2007). Serbest radikal hasarı sonunda oluşan ve oksidatif stresi değerlendirme amacıyla kullanılan bazı lipid, DNA ve protein kaynaklı

biyobelirteçler ile avantaj-dezavantajları Çizelge 1.6’da sunulmuştur. Oksidatif stresin değerlendirilmesi kapsamında analizleri yapılan önemli enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar, antioksidan kapasite ve dolaylı antioksidan aktivite testleri de Çizelge 1.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.6. Lipid, DNA ve protein kaynaklı önemli oksidatif stres biyobelirteçleri

(Bast ve Haenen 2013)

Biyobelirteç	Avantaj	Dezavantaj
Lipidler		
F₂-izoprostanlar; araşidonik asitin prostoglandin benzeri ürünleri	Oldukça spesifik	Ölçümü zor
MDA; lipid peroksidasyon ürünü	Sık kullanılan yöntem	Aldehit dehidrojenazlarca parçalanır
Lipid dienleri; lipid peroksidasyonu ile oluşan doymamış yağ asidi ürünleri	Basit	Düşük sensitivite ve spesifite
Ex vivo LDL oksidasyonu; izole LDL’nin oksidasyonunun sağlanan antioksidanlarla engellenmesi	Yarı kullanışlı	İzolasyon esnasında amfifilik antioksidanlar kaybedilir
DNA		
8-Hidroksi-2 deoksiguanozin; DNA hasarı sonucu oluşan nükleotid	Spesifik ve sensitif	Artefakt oluşabilir
Comet: DNA hasarı ve sarmal kırılması	Yarı kullanışlı	Prosedür iyi standartize edilmeli
Proteinler		
Protein karbonilleri; protein oksidasyon ürünleri	Göreceli olarak stabil	Selektif değil
Nitrotirozin; RNT’nin tirozinle reaksiyon ürünü	Spesifik	Örnek hazırlama sırasında tirozin nitrasyonu
Protein aktivitesi; genel olarak reaktif türlerle reaksiyon sonrası protein aktivitesi azalır	Yarı kullanışlı	Düşük sensitivite

Çizelge 1.7. Oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılan antioksidan biyobelirteçler ve dolaylı antioksidan aktivite testleri (Bast ve Haenen 2013)

Enzimatik antioksidanlar	Antioksidan aktivite	Aktif merkezdeki temel gruplar (İnsan)
SOD	$2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Cu, Zn (SOD1, SOD3), Mn (SOD2)
GSH-Px	$2 GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$	Selenosistein (GSH-Px 1-4, 6), Sistein (GSH-Px 5, 7, 8)
CAT	$2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$	Demir içeren hem grubu
Peroksiredoksin	$2 R-SH + ROOH \rightarrow R-S-S-R + H_2O + ROH$	Sistein

Çizelge 1.7 Devam

Glutasyon redüktaz (GR)	$GSSG+NADPH+H^+ \longrightarrow NADP^++2$ GSH	Visinal disülfid, FAD kofaktör
Thioredoksin (TRX)	Protein disulfid \longrightarrow protein dithiol	Visinal sistein ve selenosistein
Thioredoksin redüktaz (TR)	$TRX(S-Se)+NADPH+H^+ \longrightarrow NADP^+$ +TRX(SH SeH)	Visinal disülfid, FAD kofaktör
Non-enzimatik antioksidanlar	Temizlenen temel reaktif türler	Karakteri
Vitamin E	Lipid peroksil radikali	Lipofilik
Karotenoidler	Singlet oksijen	Lipofilik
Flavonoidler	Süperoksit radikali	Lipofilik - hidrofilik
Hidroksitirozol	Lipid peroksil radikali	Amfifilik
Vitamin C	Vitamin E radikalleri (rejenerasyon)	Hidrofilik
Glutasyon	Hidrojen peroksit (kofaktör olarak)	Hidrofilik
Antioksidan kapasite testleri	Antioksidan aktivite	Açıklamalar
ORAC	Yapay bir radikal tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonunun engellenmesi	İyi stardartize edilmiş bir prosedür kullanılmalıdır.
TEAC	Temizlenen ABTS radikali miktarı	İyi stardartize edilmiş bir prosedür kullanılmalıdır.
DPPH	Temizlenen DPPH radikali miktarı	İyi stardartize edilmiş bir prosedür kullanılmalıdır.
FRAP	Fe ⁺³ ün Fe ⁺² ye redüksiyon kapasitesi	Fe+3 redüksiyonu radikal oluşumuna neden olabilir.
Dolaylı antioksidan aktivite	Antioksidan aktivite	Bileşenler
NADPH oksidaz inhibisyonu	Süperoksit radikal üretiminin azaltılması	Flavanoid metabolitleri
Ksantin oksidaz inhibisyonu	Süperoksit radikal üretiminin azaltılması	Allopurinol
Demir şelasyonu	Hidroksil radikal üretiminin azaltılması	7-monohydroxyethylrutoside Deferoksamin

Oksidan/antioksidan denge kapsamında antioksidan ve oksidanların her birinin ölçümünün uzun zaman alması, pahalı olması ve karmaşık teknikler gerektirmesi nedeniyle bu parametreleri total olarak ifade edebilen çeşitli kolorimetrik yöntemler geliştirilmiştir. Bu kapsamda tüm antioksidanlar üzerinden tek bir değer ölçülebileceği Total Antioksidan Kapasite (TAK), Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite (TEAC) ve Ferrum Redükte Edici Antioksidan Kapasite (FRAP) gibi kolorimetrik yöntemler kullanılabilir (Dotan ve ark 2004, Celi 2011). Benzer şekilde oksidasyona uğrayan ürünlerin genel düzeyini belirleme amacıyla Total Oksidan Seviye (TOS), Serum Oksidasyon Aktivitesi, Total Peroksidasyon ve d-ROM ölçümü gibi yöntemler

geliştirilmiştir (Lykkesfeldt ve Svendsen 2007). TOS, kullanılan örnekteki oksidan moleküllerin ferröz iyonu ferrik iyonla oksitlemesine; TAK ise örnekteki antioksidan moleküllerin renkli Etilbenzotiazolin Sulfonik Asit (ABTS) radikalini redüklemesi sonucu renkli radikal antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olmasına dayanan kolorimetrik yöntemler ile ölçülebilmektedir (Erel 2004, Erel 2005).

TAK değerinin antioksidan alımı veya üretimindeki değişimleri ya da oksidatif stres düzeyinin artması sonucu tüketimini gösterebilecek, tüm antioksidan durum üzerine değerlendirme yapılmasını sağlayabilecek bir biyokimyasal parametre olarak öne çıktığı belirtilmektedir (Nemec ve ark 2000). Serum ve dokulardaki antioksidan bileşiminin oldukça farklı olması her bir antioksidanın ayrı ayrı ölçülmesini güçleştirmektedir. Buna ek olarak, bazı antioksidanlar arasında sinerjik bir yapı olması nedeniyle, yalnızca birinin değerlendirilmesi antioksidanların birlikte etkinliklerini yansıtmayabilir (Chapple 1997, Cao ve Prior 1998). Ayrıca TAK değerinin belirlenmesi henüz tanımlanmayan ya da ölçümü kolay olmayan bazı özel antioksidanların durumu hakkında bilgi vermesi yönüyle de oldukça önemlidir (Lamonta ve ark 1997).

1.3.1.1. Köpeklerde oksidan/antioksidan biyobelirteçlerin ölçüldüğü durum ve hastalıklar

Köpeklerde oksidatif stresin araştırıldığı farklı durum ve hastalıklar ile değerlendirilen oksidan ve antioksidan biyobelirteçler Çizelge 1.8’de özetlenmiştir.

Çizelge 1.8. Köpeklerde farklı durum veya hastalıklarda değerlendirilen oksidan/antioksidan biyobelirteçler

Araştırmacı	Araştırma konusu	Oksidan	Antioksidan
Simeonova ve ark 2004	Anestezi	MDA	
Choi ve ark 2011		TOS	TAK
Choi ve ark 2012			SOD, GSH-Px, CAT
Lee 2012		TOS	TAK
Lee ve Kim 2012			SOD, GSH-Px, CAT
Kozan ve ark 2010	Askaridiozis	MDA	GSH, AOA
Kapun ve ark 2012	Atopik dermatitis	MDA	SOD, GSH-Px, TAK
Buranakarl ve ark 2009	Azotemi	MDA	GSH, CAT
Murase ve ark 1996	Babesiosis	MDA	
Otsuka ve ark 2002		TBARS	

Çizelge 1.8 Devam

Chaudhuri ve ark 2008		MDA	SOD, CAT
Crnogaj ve ark 2010		MDA	
Rossi ve ark 2014			Paroksonaz-1
Ciftci ve ark 2014		8-OHdG, NO	TAK
Kargin ve Fidanci 2001	Böbrek hastalıkları	MDA	SOD, GSH-Px, CAT, beta karoten, askorbik asit
Romanucci ve ark 2011	Çinkoya yanıt veren dermatozlar		Cu/Zn-SOD
Dimri ve ark 2008		MDA	SOD, GSH, CAT
Martínez-Subiela ve ark 2014	Demodikosis		Paroksonaz-1, TAK
Beigh ve ark 2014	Dermatofitosis	MDA	SOD, CAT, Vitamin C, B-karoten
Chansaisakorn ve ark 2009	Diabetes mellitus	TBARS	GSH, CAT
Freeman ve ark 1999	Dilate kardiyomiyopati	MDA	SOD, GSH-Px, vitamin A, C, E
Cesselli ve ark 2001		Nitrotirozin	
Dimri ve ark 2012	Dirofilariosis	MDA	SOD, GSH-Px, GSH-ST, GSH, CAT
Karadeniz ve ark 2008	Distemper	MDA, nitrat/nitrit	GSH, vitamin C, retinol, beta karoten
Pasquini ve ark 2010		d-ROM	BAP
Hinchcliff ve ark 2000	Egzersiz	İzoprostan	TAK, Vitamin E
Kumar ve ark 2006		MDA	
Da Silva ve ark 2013	Ehrlichiosis	TBARS, NO, AOPP	Glutasyon redüktaz
Walker ve ark 2007	Gastrik dilatasyon volvulus	MDA, F2-izoprostan	GSH-Px, ORAC, vitamin C, E
Ulutas ve ark 2006	Gastrik mukozal hasar	MDA	GSH, vitamin C
Vanucchi ve ark 2008	Gebelik	TBARS, karbonil protein	Vitamin E, vitamin A
Kiral ve ark 2005	Hepatozoonosis	MDA, NO	GSH
Pesillo ve ark 2004		MDA	Vitamin E
Tan ve ark 2012	Immun kaynaklı hemolitik anemi		Peroksiredoksin-2
Kizil ve Yuce 2010	Koksidiosis	MDA	GSH, GSH-Px, CAT, vitamin A, C, E
Freeman ve ark 2005	Konjestif kalp yetmezliği	MDA, F2-izoprostan, protein karbonilleri	GSH, GSSG, ORAC, vitamin A, C, E
Silva ve ark 2013	Kronik böbrek yetmezliği	TBARS, süperoksit	TAK
Xia ve ark 2013	Ksilitol toksikasyonu	MDA	SOD, GSH-Px, vitamin E, vitamin C
Bildik ve ark 2004		MDA	GSH, askorbik asit, beta karoten, retinol
Britti ve ark 2008			SOD, GSH-Px
Heidarpour ve ark 2012	Leishmaniosis	MDA	TAK, albumin
Almeida ve ark 2013		TOS, MDA	TAK, GSH, albümin, ürik asit
Longoni ve ark 2013			Fe-SOD
Vajdovich ve ark 2005	Lenfoma	MDA	SOD, GSH-Px, GSH,

Çizelge 1.8 Devam

			GSSG, FRAP, vitamin C, E
Winter ve ark 2009		MDA, izoprostan	GSH-Px, alfa tokoferol, ORAC
Pasquini ve ark 2015		d-ROM	BAP
Finotello ve ark 2014	Mast hücre tümörü	d-ROM	BAP, alfa tokoferol
Szczubial ve ark 2004	Meme tümörü	TBARS, SH grupları	SOD, GSH-Px
Kumaraguruparan ve ark 2005		TBARS, lipid hidroperoksitleri, konjuge dienler	SOD, CAT, GSHPx, GSSG, GSH-ST, vitamin C
Askar ve ark 2009		MDA, NO	Vitamin C
Todorova ve Dinev 2010		MDA	CAT, vitamin C, E
Stavinohová ve ark 2012		TBARS, thiol grupları	Vitamin E
Karayannopoulou ve ark 2013		TBARS	Alfa tokoferol
Leonel ve ark 2014		GSH, GSH-Px, GSH-ST	
Alkan ve ark 2014		MDA, NO	SOD, GSH-Px, CAT, GSH
Ertekin ve ark 2003		Nefrotoksisite	MDA
Varzi ve ark 2007	MDA		TAK
Tanja ve ark 2008	Neoplazi		TAK, SOD, GSH-Px, CAT
Macotpet ve ark 2013		MDA	
Lee ve ark 2013	Ortopedik cerrahi	TOS	TAK
Goranov 2007	Osteoarthritis	MDA	CAT
Serin ve ark 2008	Ovariektomi	MDA	GSH
Lee ve Kim 2014		TOS	TAK
Panda ve ark 2009	Parvoviral enfeksiyon	MDA	SOD, CAT
Nemec ve ark 2013	Periodontal hastalıklar	Nitrozil hemoglobin, NO, 3-nitrotirozin	
Silva ve ark 2013	Prerenal azotemi	MDA	TAK
Emanuelli ve ark 2012	Pyometra	TBARS	
Camkerten ve ark 2009	Sarkoptik uyuz	TBARS, TOS	TAK
Behera ve ark 2011		MDA	SOD, GSH-Px, CAT
Singh ve ark 2011		MDA	SOD, GSH-Px, CAT
Sithanukul ve ark 2010	Urolithiasis	MDA	GSH, CAT
Aydın ve ark 2009	Venereal tümör	MDA, NO	TAK, vitamin A, C
Sarma ve ark 2015	Vektör kaynaklı hastalıklar	MDA	SOD, GSH, CAT
Vivano ve Vanderwielen 2013	Yoğun bakım hastaları	8-izoprostan	GSH, vitamin E, Se, sistein

1.4. Köpeklerde Anemi

Anemi başlı başına bir hastalık olmayıp birçok hastalığın seyri veya sonucunda ortaya çıkan bir semptomdur. Bu semptom temel olarak eritrosit yapımı ile yıkımı veya kaybı arasındaki dengenin bozulması sonucu gelişir (Mills 2012). Köpeklerde de sık rastlanılan, şiddeti ve tipi ile ilişkili olarak organizmanın tamamında önemli olumsuzluklara neden olabilen bu semptom, orta ve şiddetli derecede olduğunda klinik olarak belirlenebilir. Buna karşın hafif şiddetteki anemiler ancak laboratuvar bulgularla ortaya konulabilir (Tvedten 2010). Laboratuvar bulgusu olarak anemi, ilgili türde eritrosit sayısı veya hematokrit değeri (HCT) ile hemoglobin (HGB) konsantrasyonunun fizyolojik alt sınırın altına düşmesi ile karakterize edilir (Mills 2012, Furman 2014). Anemi tiplerinden çoğunda her üç laboratuvar parametresinde azalma belirlenirken, demir noksanlığı anemisinde eritrosit (RBC) sayısı normal sınırlar içinde bulunabilirken, HCT değeri ve HGB konsantrasyonu azalır (Tvedten 2010).

Anemiye ilgili klinik bulgular dokulara taşınan oksijenin azalması veya bu duruma ilgili kompanse mekanizmalarının yetersiz kalması sonucu soluk muköz membranlar, letarji, egzersiz intoleransı, taşipne ve/veya dispne, taşikardi veya dolaşım bozukluğunun neden olduğu üfürümler şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Kilo kaybı, iştahsızlık, ateş veya lenfadenopati gibi genel bulgular ise altta yatan hastalığa bağlı olarak gelişmektedir. Eritrosit yıkımına bağlı splenomegali, ikterus ve hemoglobinüri veya bilirubinüri sonucu idrar renginde koyulaşma özel bulgular olarak belirlenebilmektedir (Thrall 2012, Furman 2014).

Anemiye ilgili klinik bulguların şiddeti, hastalığın başlama süresine bağlı olarak değişebilmektedir. Kronik kan kaybı veya kemik iliği disfonksiyonunda hipoksi dışındaki bulgular çoğunlukla kompanse edilebilmektedir. Kompansasyon mekanizmaları kapsamında eritrosit 2,3 difosfogliserat (2,3 DPG) konsantrasyonu artarak oksijen-hemoglobin affinitesini azaltır ve dokulara oksijen sağlanmasına yardımcı olur (Thrall 2012). Bununla birlikte kalpten çıkan kan miktarı artırılarak yaşamsal organlara kan akımı sağlanmaya çalışılır. Buna karşın, sürenin kısalığı veya şiddetin fazlalığı nedeniyle kompanse mekanizmalarının yetersiz kaldığı şiddetli akut kan kaybı ya da eritrosit yıkımlanması ölümle sonuçlanabilir (Harvey 2010).

Aneminin şiddeti HCT değerine göre hafif, orta, şiddetli ve çok şiddetli olarak derecelendirilmektedir (Tvedten 2010). Köpeklerde HCT değerine göre aneminin şiddeti Çizelge 1.9'da belirtildiği gibi tanımlanmaktadır.

Çizelge 1.9. Şiddetine göre aneminin derecelendirilmesi (Tvedten 2010)

Anemi derecesi	HCT (%)
Hafif	>30-≤ 36
Orta	>20-≤ 30
Şiddetli	>13-≤ 20
Çok şiddetli	<13

Aneminin varlığı ve şiddeti ortaya konulduktan sonra prognozun belirlenebilmesi ve uygun sağıaltım için aneminin nedeninin araştırılması gerekmektedir.

Anemi temel olarak iki şekilde sınıflandırılmaktadır;

1. Eritrosit boyutu ve hemoglobin konsantrasyonunun değerlendirildiği morfolojik sınıflandırma,
2. Kemik iliğinin anemiye olan yanıtı ve mekanizmaların değerlendirildiği patofizyolojik sınıflandırma,

Morfolojik sınıflandırma

Anemiler, eritrosit sayısı ve HGB konsantrasyonu ile belirlenen ortalama eritrosit hacmi [mean cell volume (MCV)] ve ortalama eritrosit HGB konsantrasyonu [mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)] değerleri kullanılarak sınıflandırılabilir. Köpeklerde normal MCV değeri 60-77 fL, MCHC değeri de 32-36 veya 30-36 g/dL olarak belirtilmektedir (Tvedten 2010). Eritrosit hacminin normalden küçük olması mikrositik, normal olması normositik, normalden büyük olması ise makrositik anemi olarak tanımlanmaktadır. Anemide eritrositlerin normalden daha az HGB içermesi hipokromik, normal HGB konsantrasyonu ise normokromik anemi olarak ifade edilmektedir. Anemiler hiperkromik özellikte oluşmamakta, fakat intravasküler hemoliz, lipemi veya Heinz cisimciklerinin etkileriyle MCHC hatalı olarak yüksek ölçülebilmektedir (Thrall 2012). Morfolojik sınıflandırma kapsamında şekillenebilecek anemi tipleri Çizelge 1.10'da sunulmuştur.

Çizelge 1.10. Anemilerin morfolojik sınıflandırması (Tvedten 2010)

MCV (60-77 fL)	MCHC (32-36 g/dL)	Anemi
N	N	Normositik, normokromik
N	↓	Normositik, hipokromik
↑	N	Makrositer, normokromik
↑	↓	Makrositer, hipokromik
↓	N	Mikrositer, normokromik
↓	↓	Mikrositer, hipokromik

N: normal değer aralığında; ↑: artma; ↓: azalma.

Morfolojik sınıflandırma etiyolojiye yönelik bilgiler de vermekte, örneğin mikrositik anemilerin çoğunlukla demir eksikliği sonucu oluştuğu belirtilmektedir. Ek olarak mikrositosis, portosistemik şantlarda ya da Akita ve Shiba Inus ırkı köpeklerde fizyolojik olarak da görülebilmektedir (Mills 2012). Retikülositlerin normal eritrositlere göre daha büyük olması nedeniyle makrositik anemiler, kemik iliğinin fonksiyonel şekilde çalıştığının göstergesi olarak yorumlanabilir. Fakat polikromazi ya da retikülositosis olmadan da makrositosisin görüldüğü durumlar bilinmektedir. Normositik anemiler genellikle non-rejeneratif ya da hemoraji veya hemoliz sonrası retikülositlerin sirkülasyona henüz verilmediği prerejeneratif dönemlerde görülmektedir. Bazı rejeneratif anemilerde de normositosis belirlenebilmektedir (Thrall 2012). Anemili köpeklerde yapılan bir çalışmada rejeneratif tipte anemisi olan köpeklerin yalnızca %11,8’inde beklenen makrositik hipokromik aneminin görüldüğü belirtilmektedir (Hodges ve Christopher 2011).

Patofizyolojik sınıflandırma

Kemik iliğinin anemiye olan yanıtının ve mekanizmalarının değerlendirilmesi ile yapılan patofizyolojik sınıflandırma tanısal anlamda oldukça önemlidir. Rutinde periferel kandaki olgunlaşmamış eritrositlerin (retikülosit) sayısı değerlendirilerek anemi, rejeneratif ve nonrejeneratif olarak ikiye ayrılır (Cowgill ve ark 2003). Kemik iliği primer olarak böbrek dokusundaki üretim, sekonder olarak hipoksi sonucu eritropoietin düzeyinin arttığı durumlarda retikülositlerin dolaşıma salınmasını hızlandırmaktadır. Akut kan kaybı ya da hemoliz sonrasında kemik iliğinin yanıtı ile dolaşımdaki retikülosit miktarı artmakta ve bu durum rejeneratif anemi olarak tanımlanmaktadır (Thrall 2012). Kemik iliğinin gösterdiği rejeneratif yanıtın fizyolojik bir sınırı vardır. En yüksek rejeneratif yanıt hemolitik anemilerde 6-8 kat düzeyinde oluşurken, hemorajik anemilerde ise 2-4 kat düzeyinde bir artış olur. Hemolitik ya da hemorajik anemilerin başlangıcından sonra 2-4

gün boyunca periferal kanda rejenerasyona dair bir bulgu gözlenmeyebilir. Bu durum eritrositlerin kemik iliğindeki üretim süreci ile ilişkilidir (Furman ve ark 2014). Anemi sonucunda periferal kanda retikülositlerin sayısının beklenenden az olması ya da hiç görülmemesi ise nonrejeneratif anemi olarak tanımlanır. Nonrejeneratif anemiler kemik iliği veya eritrosit üretiminin azalması, eritropoezisteki bozukluklar sonucunda oluşabilmektedir (Mills 2012).

Absolut retikülosit sayısı, periferal kan örneğinden New Methylene Blue boyama ile hazırlanan frotilerde manual olarak hücrelerin sayılması ile hesaplanabilmekte veya gelişmiş otomatik kan sayım cihazlarında ölçülebilmektedir. Köpeklerde anemilerin retikülosit sayısına göre patofizyolojik sınıflandırılması Çizelge 1.11’de gösterilmiştir.

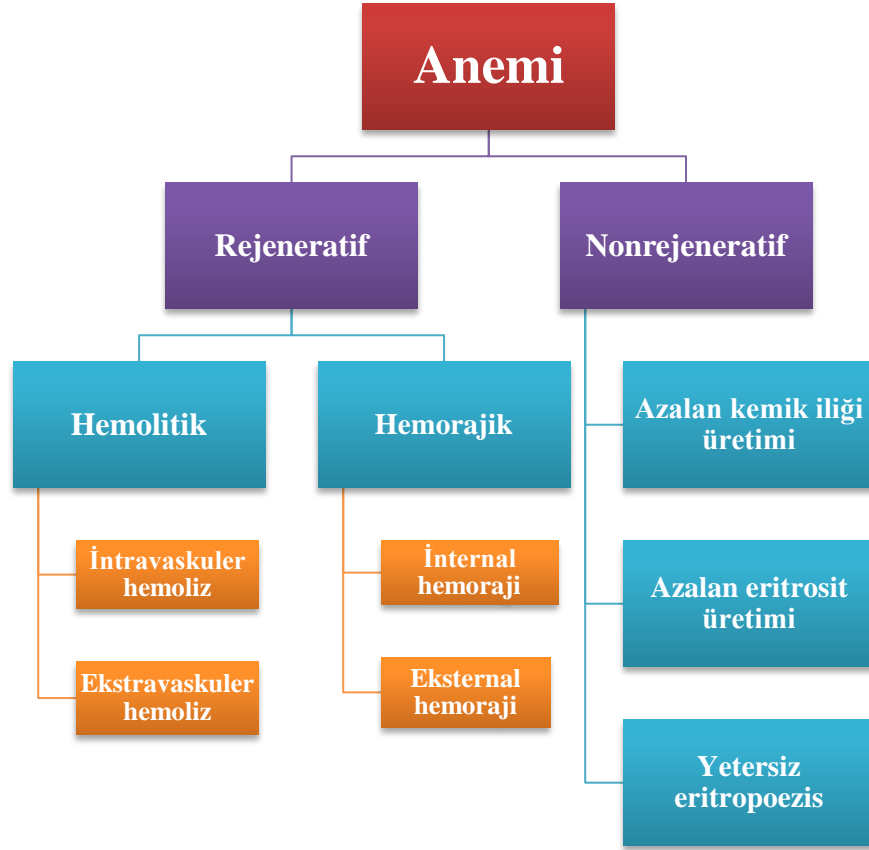
Çizelge 1.11. Anemilerin retikülosit sayısına göre sınıflandırılması (Cowgill ve ark 2003)

Retikülositer yanıt		Absolut retikülosit sayısı ^a
Normal/Nonrejeneratif ^b		<80.000
Rejeneratif	Hafif	80.000-150.000
	Orta	150.000-300.000
	Şiddetli	>500.000

^a Absolut retikülosit sayısı (/ μ l)= retikülosit yüzdesi x RBC sayısı (10^3 / μ l)

^b Anemi durumlarında nonrejeneratif olarak değerlendirilir.

Rejeneratif ve nonrejeneratif özellikteki anemilerin genel sınıflandırılması Şekil 1.4’de, oluşum mekanizmaları ve nedenleri ise Çizelge 1.12’de özetlenmiştir.



Şekil 1.4. Köpeklerde aneminin genel nedenleri (Mills 2012)

Çizelge 1.12. Köpeklerde anemilerin etyopatogenezisi (Mills 2012)

Aneminin		Nedenler	Mekanizma
Tipi	Kategorisi		
Nonrejeneratif	Azalan kemik iliği üretimi	Radyasyon Toksosite Virus Hormon (östrojen) İlaçlar (sulfanamidler) Enfeksiyöz (Ehrlichiosis, Leishmaniosis)	Kemik iliği aplazisi (pansitopeni ya da bisitopeni)
		Kemik iliği neoplazmı, lökemi, metastaz (karsinoma, melanoma) Miyelofibrozis Granulomatöz yangısal hastalıklar (histoplazmozis, milier tüberküloz)	Miyelofitiz (pansitopeni ya da bisitopeni)
	Azalan eritrosit üretimi	İmmun kaynaklı	Eritrosit aplazisi
		Kronik renal yetmezlik Endokrin yetersizlik (hipotiroidizm, hiperöstrojenizm)	Eritropoetinde azalma ve sitokinlerin üretimi baskılaması
		Yangısal hastalığa bağlı anemi Kronik parazitizm Kronik karaciğer hastalıkları	Sitokinlerin üretimi baskılaması ve farklı kompleks mekanizmalar
	Yetersiz eritropoezis	Folik asit, vitamin B ₁₂ , kobalt ve faktör eksiklikleri (kemoterapi, sulfanamidler, antiepileptik ilaçlar)	Nükleotid sentezinde bozukluklar
Fe ⁺ eksikliği anemisi (kronik kan kaybı, gastrointestinal hasar) Cu ⁺ ve vitamin B ₆ eksiklikleri Kurşun zehirlenmesi		Hemoglobin sentezinde bozukluklar	
Rejeneratif	Hemolitik	Anormal eritrosit membran, şekil bozuklukları Biyokimyasal bozukluklar (piruvat kinaz, fosfofruktokinaz, methemoglobin redüktaz eksiklikleri)	Eritrositlerdeki genetik hasarlar
		Biyokimyasal farklılıklar (hipofosfatem, Heinz cisimcikleri) Kimyasal hemolizinler (ağır metaller) Bakteriyel, hayvan ve bitki hemolizinleri (<i>Clostridium haemolyticum</i> , örümcek ve sinek venomları) İmmun kaynaklı hemolitik anemi Eritrositlerin mekanik hasarı Enfeksiyöz (babesiosis)	Eritrositlerdeki edinsel hasarlar
	Hemorajik	Travma (karaciğer, dalak rupturu) Operasyon İç/dış paraziter enfestasyon (kene, bit, pire, kancalı kurt enfestasyonu) Koagulopati Trombosit hasar ve eksiklikleri Anevrizma ya da neoplazm rupturu (hemangiosarkom) Gastrointestinal veya ürogenital sistem kanamaları	Kan kaybı

1.4.1. Anemi ve Oksidatif Stres

Eritrositler, temel fonksiyonu olan doku reoksijenizasyonu yanında kanın antioksidan kapasitesinin önemli bir bileşenidir. Bu hücreler SOD, CAT ve GSH sistemi gibi önemli hücre içi enzimatik antioksidanları yapısında bulundurur (Durackova 2010, Mohanty 2013, Niedzwiedz ve Jaworski 2014). Fakat eritrositler, hem diradikal yapısındaki oksijeni taşımaları, hem de plazmada sürekli bulunan hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil gibi oksidanlara maruz kalmaları nedeniyle oksidatif strese duyarlıdırlar (Nagababu ve ark 2008, Hess 2010). Eritrosit membranı, doymamış yağ asitlerinden zengin lipid yapısı nedeniyle ilk hasar gören bölgelerden biridir. Oksihemoglobinin methemoglobine çevrilmesi sırasında süperoksit, hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek oldukça reaktif hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olur (Kanas ve Acker 2010). Bu süreçten sonra eritrosit yüzeyinde reversibl veya irreversibl nitelikte hemikromlar şekillenebilir. Hemoglobin hidroksit ve dihistidin ferrihemokrom gibi hemikromlar tekrar methemoglobine dönüştürülüp ardından hemoglobine indirgenebilir. Irreversibl hemikromlarda ise hemoglobin denaturasyonu devam eder ve agregat oluşumuna neden olur (Nagababu ve ark 2008). Çoğunlukla eritrosit yüzeyinde oluşan bu agregatlara Heinz cisimcikleri adı verilir. Heinz cisimcikleri oksidatif strese maruz kalan eritrositlerde görülen ilk lezyonlar olarak tanımlanmaktadır (Thrall 2012). Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan yapısal membran bozuklukları, akışkanlığın ve esnekliğin kaybı ile iyonlara karşı artan permeabilite eritrosit membranının rupturu ve içeriğinin dışarı salınmasına neden olabilmektedir (Crnogaj ve ark 2010).

Anemi sürecinde oksidatif stres oluşumu detaylı olarak incelenmemiştir. Bununla birlikte şekil değiştirme yetenekleri azalan, sitozolik kalsiyum miktarı ve membran sertliği artan eritrositlerin oksidatif strese katkıda bulunabileceği belirtilmektedir (Pfafferott ve ark 1982, Damonte ve ark 1992, Lang ve ark 2006). Anemi sürecinde artan oksidatif stres, lipid peroksidasyonunun artmasına, GSH-Px'in de içinde bulunduğu enzimatik antioksidan sistemin zayıflamasına (Kumerova ve ark 1998) ve eritrositlerin pro-oksidanlara duyarlılığının artmasına neden olur (Melhorn ve ark 1971).

Şiddetli anemik koşullarda eritrositlerin daha fazla oksidatif strese maruz kaldığı gösterilmiştir (Nagababu ve ark 2008). Oksidatif stresin temel olarak membranda şekillendiği, buradan salınan ROT'ların hem doğrudan eritrositlere hem de dolaşıma katılarak komşu dokulara hasar verdiği ve anemiyle ilişkili patolojilere katkıda bulunduğu

belirtilmektedir (Dumaswala ve ark 1999). Oksidatif strese bağlı eritrosit hasarı hücrenin yaşam süresini kısaltmakta, aynı zamanda eritrosit membranındaki şekil değiştirme yeteneğinin azalması ve fosfatidilserin oluşumu sonucu dolaşımdan daha kısa sürede kaldırılmalarıyla sonuçlanmakta ve anemiye neden olmaktadır (Lang ve ark 2006). Bu şekilde aneminin şiddetinin artabileceği rapor edilmektedir (Nagababu ve ark 2008, Khanna ve ark 2010, Iuchi 2012).

Hipoksi sonucu eritrositlerdeki yetersiz oksijenizasyonun hemoglobinin otooksidasyona neden olduğu gösterilmiştir (Balagopalakrishna ve ark 1996). Hipoksi ve eritrositlerdeki oksidatif stres arasındaki bu ilişki, aneminin eritrositlerde oksidatif strese nasıl neden olduğunu açıklamaktadır (Mohanty 2013). Azalan RBC sayısı ve HGB miktarı dokulardaki parsiyel oksijen basıncını azaltmakta ve eritrositler dokulara daha fazla miktarda oksijen vermek zorunda kalmaktadır. Hemoglobin oksidasyonuna neden olan bu durum methemoglobin ve süperoksit oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Hebert ve ark 2004). Oluşan methemoglobinin büyük miktarı sitokrom b5 redüktaz ile tekrar fonksiyonel forma dönüştürülmesine rağmen, anemi durumlarında bu süreç yetersiz kalır ve methemoglobin miktarı artar (Nagababu ve ark 2008).

Anemi, Dünya Sağlık Örgütü tarafından insanların %30'unu etkilediği belirtilen yaygın bir sağlık sorunudur. İnsanlarda demir eksikliği anemisi başta olmak üzere orak hücreli anemi, talasemi, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz eksikliğine bağlı gelişen anemi olgularında oksidatif stres gelişimi ve böyle durumlarda antioksidan kullanımının getirebileceği yararları kapsayan çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Amer ve ark 2006, Wood ve Granger 2007, Jilani ve İqbal 2011, Iuchi 2012).

Köpeklerde ise soğan, sarımsak, parasetamol, aspirin, metilen mavisi, çinko, naftalin ve vitamin K toksikasyonu, Diabetes mellitus ve T hücre lenfoması gibi durumların farklı mekanizmalarla eritrositlerin oksidatif hasarına neden oldukları rapor edilmektedir (Harvey 2010). İlaç kaynaklı oksidatif doku hasarı, uygulanan ilaçların dozu ve etken maddeye göre değişiklik göstermektedir. Oksidatif hasar hücre membranlarında doku hasarı ve protein yapı bozukluklarına neden olur. Eritrositlerde hemoglobin içerisindeki demir methemoglobine okside olur (Kaniyas ve Acker 2010). Methemoglobin miktarı vücuttaki total hemoglobinin %10'unu aştığı durumlarda mukoz membranlar siyanotik görünüm alır. Sülfidril gruplar ve hemoglobin molekülleri arasındaki çapraz reaksiyonlar Heinz cisimciklerinin oluşumuna neden olur (Nagababu ve ark 2008).

Çeşitli enfeksiyöz hastalıklarda etken makrofajlar tarafından fagosite edilirken bu hücreler de konak savunma mekanizması kapsamında süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve nitrik oksit gibi serbest radikallerin üretilmesine neden olur (Durackova 2010). Bu şekilde anemiyle seyreden enfeksiyöz hastalıklarda etken yanında oksidatif stresin de anemiye katkıda bulunabileceği belirtilmektedir (Heidarpour ve ark 2012).

Köpeklerde oksidatif stresin değerlendirildiği anemiyle seyrebilen enfeksiyöz hastalıklar, ölçülen oksidan/antioksidan parametreler ve değişimleri Çizelge 1.13'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.13. Literatürde köpeklerde oksidatif stresin değerlendirildiği, anemiyle seyrebilen enfeksiyöz hastalıklar

Araştırmacı	Araştırma konusu	Oksidan	Antioksidan
Murase ve ark 1996	Babesiosis	MDA ↑	
Otsuka ve ark 2002		TBARS ↑	
Chaudhuri ve ark 2008		MDA ↑	SOD ↑, CAT ↑
Crnogaj ve ark 2010		MDA ↑	
Rossi ve ark 2014			Paroksonaz-1 ↓
Ciftci ve ark 2014		8-OHdG ↑, NO ↓	TAK ↓
Dimri ve ark 2012	Dirofilariosis	MDA ↑	SOD ↑, GSH-Px ↓, CAT ↓, GSH ↓
Kumar ve ark 2006	Ehrlichiosis	MDA ↑	
Da Silva ve ark 2013		TBARS ↑, NO ↑, AOP ↑	Glutasyon redüktaz ↑
Kiral ve ark 2005	Hepatozoonozis	MDA ↑, NO ↑	GSH ↑
Bildik ve ark 2004	Leishmaniosis	MDA ↑	GSH ↓, askorbik asit ↓, beta karoten ↓, seruloplazmin ↓, retinol ↓
Britti ve ark 2008			SOD ↑, GSH-Px ↓
Paltrinieri 2009		d-ROM ↓	
Heidarpour ve ark 2012		MDA ↑	TAK ↓, albumin ↓
Almeida ve ark 2013		TOS ↑, MDA ↑	TAK ↓, GSH ↑, albumin ↓, ürik asit ↓

↑: Artma, ↓: Azalma, ↓↑: Değişikliğin olmaması

Babesiosis, eritrositleri mekanik olarak parçalaması sonucu hemolitik anemiye neden olan enfeksiyöz bir hastalıktır. *Babesia gibsoni* ile enfekte köpeklerde etken içermeyen eritrositlerin de hemolize uğradığı ve bunun nedeninin oksidatif stres olabileceği ileri sürülmüştür (Otsuka ve ark 2002). Ayrıca *B. gibsoni* ile enfekte köpeklerde makrofajların eritrofagositik aktivitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiş,

artan serbest radikal salınımının etken ve aktive makrofajlardan ileri gelebileceği rapor edilmiştir (Otsuka ve ark 2002). Babesiosisli köpeklerde aneminin şiddeti ile parazitemi düzeyinin her zaman orantılı olmamasının oksidatif stresle ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Chaudhuri ve ark 2008, Rossi ve ark 2014). Crnogaj ve ark (2010), *Babesia canis* ile enfekte köpeklerde serum MDA konsantrasyonunun sağlıklı köpeklere göre önemli düzeyde yüksek olduğunu göstermişler ve aneminin şiddetine göre gruplandırılan köpeklerde gruplar arası önemli bir fark saptamamışlardır. *Theileria annulata* ile enfekte sığırlarda aneminin şiddeti ile oksidatif hasarın değerlendirildiği bir başka çalışmada ise serum MDA konsantrasyonu ile anemi şiddeti arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir (Rezeai ve Dalir-Naghadeh 2006).

Sürekli ve artan serbest radikal üretiminin antioksidan savunma sistemlerini azaltabileceği belirtilmektedir (Durackova 2010, Almeida 2013). Chaudri ve ark (2008), *B. gibsoni* ile enfekte köpeklerde eritrosit MDA konsantrasyonu ile SOD ve CAT aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, sağlıklı köpeklere göre enfekte köpeklerin eritrosit SOD ve CAT aktivitelerindeki önemli düzeyde artışı organizmanın oksidatif stresi sınırlama amacıyla kendini tamir etme mekanizmasıyla açıklamışlardır. Ek olarak, intravasküler hemoliz sonucu rejeneratif tipte anemiye neden olan *Babesia* enfeksiyonlarında retikülosit sayısının arttığı ve SOD ile CAT aktivitelerinin retikülositlerde daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Otsuka ve ark 2001).

Visseral leishmaniosiste gelişen hemolitik anemide oksidatif stresin de önemli bir rolü olduğu belirtilmektedir (Britti ve ark 2012, Heidarpour ve ark 2012). Otoimmün hemolitik anemili köpeklerde oksidatif stresin değerlendirildiği bir çalışmada, lipid peroksidasyonu sonucu plazma MDA konsantrasyonunun anlamlı düzeyde yükseldiği, antioksidan savunma sistemi rezervlerini gösteren Vitamin E konsantrasyonunun ise önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir (Pesillo ve ark 2004).

Kogika ve ark (2014), kronik böbrek yetmezliğine bağlı anemili köpeklerde HCT değeri ile TBARS düzeyi arasında aneminin şiddetine göre her iki grupta ($HCT > \%22$, $HCT \leq \%22$) negatif bir korelasyon belirlemiş ve kronik böbrek yetmezliği olan köpeklerde de aneminin gelişimi ve ROT üretilmesini dolaşımdaki üremik toksinler ve kronik yangısal süreç ile açıklamışlardır. Aynı çalışmada aneminin şiddeti arttıkça SOD aktivitesinin de arttığı fakat yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) konsantrasyonunun azaldığı saptanmıştır. SOD aktivitesindeki artış oksidatif strese karşı gelişen kompanzasyon mekanizmasıyla,

eritrosit içi GSSG konsantrasyonlarının azalması ise eritrositlerin antioksidan savunmadaki rolü ile açıklanmıştır.

Sonuç olarak, farklı etiyojilerden ileri gelen aneminin çeşitli mekanizmalarla oksidatif strese neden olduğu, oksidatif stresin de eritrositlerin yaşam süresini kısalttığı, oksijen taşıma kapasitelerini azalttığı ve dolaylı olarak aneminin şiddetini artırdığı belirtilmektedir (Nagababu ve ark 2008, Harvey 2010, Iuchi 2012). Fakat, bu anlamda köpeklerde aneminin patofizyolojik sınıflandırmasına göre oksidatif stresin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

1.5. Köpeklerde Kan Transfüzyonu

Kan, yaşamın devamlılığı için gerekli bileşenleri yapısında bulundurur. Kan transfüzyonu, uygun bir donörden alınan tam kanın veya bileşenlerinden bir veya birkaçının (eritrosit, lökosit, trombosit, pıhtılaşma faktörleri, plazma) diğer bir canlıya aktarılması olarak tanımlanır (Kisielewicz ve Self 2014). Günümüzde kan transfüzyonu veteriner hekimlikte de ilerleyen teknoloji ve artan donanım ile birlikte yaygın olarak kullanılabilen, yerinde uygulandığı durumlarda hayat kurtarıcı rol üstlenen gelişmiş bir sağaltım yöntemi haline gelmiştir (Gibson ve Abrams-Ogg 2012, Davidow 2013).

Tam kan transfüzyonu temel olarak büyük miktarlardaki kan kayıplarında volüm eksikliğinin giderilmesi ve kanın sıvı veya her bir selüler komponentinin artırılması veya iyileştirilmesinde endikedir (Kisielewicz ve Self 2014). Bir transfüzyon olmamakla birlikte hemopoetik sistemin uyarılması amacıyla köpeklerde 10-30 ml tam kan, deri altı veya kas içi tekrarlanan dozlarda uygulanabilmektedir. Akut anemili köpeklerde HCT < %10, kronik anemili köpeklerde ise HCT < %15 olduğu durumlarda kan transfüzyonunun endike olduğu belirtilmektedir (Nolte ve ark 1988, Gibson ve Abrams-Ogg 2012). Tam kan ve kan ürünlerinin bileşenleri, endikasyonları, saklama koşulları ve kullanım önerileri Çizelge 1.14'de özetlenmiştir.

Kan transfüzyonları günümüzde sıklıkla gerekli görülmelerine ve hayat kurtarıcı rol üstlenmelerine rağmen, uyumsuzluk durumları ya da saklama koşullarındaki olumsuzluklarda istenmeyen ve ölümlü sonuçlanabilecek reaksiyonlara neden olabilmektedir (Kisielewicz ve Self 2014). Bu anlamda, kan transfüzyonu basitleştirilmiş bir organ nakli olarak değerlendirilmekte ve nakledilen organın kan olduğu belirtilmektedir (Hohenhaus 2012).

Veteriner hekimlikte kan bankalarının ve kanın bileşenlerine ayrıştırılmasının yaygın olmaması ve ihtiyaç halinde istenilen özelliklere sahip donörün kolayca bulunamaması nedeniyle, alınan tam kanın saklanılarak kullanılması daha da önem kazanmaktadır (Gibson ve Abrams-Ogg 2012).

Çizelge 1.14. Tam kan ve kan ürünlerinin bileşenleri, endikasyonları, saklama koşulları ve kullanım önerileri (Feldman ve Sink 2008)

Kan ya da Kan Ürünleri	Bileşenleri	Endikasyon	Saklama Koşulları	Kullanım Süresi	Doz	Hız
Taze Tam Kan	Tüm kan elementleri; Eritrosit, trombosit, pıhtılaşma faktörleri	Anemi (Kan kaybı, hemoliz, nonrejeneratif), koagülopati, trombositopeni, hemangiosarkom, hazır kan bulunmadığı durumlar	1– 6 °C	24 Saat	2 ml/kg, HCT’de %1 artış sağlar	3-4 ml/kg/saat
Tam Kan Saklanmış Tam Kan	Eritrosit, plazma proteinleri, labil koagülasyon faktörleri	Hipoproteinemi ile seyreden anemi, hipovolemik şok, kan ürünleri hazırlanamayan durumlar	1– 6 °C	ACD, CPD, CP2D; 21 Gün CPDA-1; 35 Gün	2 ml/kg, HCT’de %1 artış sağlar	3-4 ml/kg/saat
Konsantre Eritrosit	Eritrosit	Anemi	1– 6 °C	ACD, CPD, CP2D; 21 Gün CPDA-1; 35 Gün. Ek sol; 42 Gün	1 ml/kg, HCT’de %1 artış sağlar	4-6 ml/dk
Taze Plazma	Tüm koagülasyon faktörleri, plazma proteinleri	Trombositopeni, hipovolemi, hipoproteinemi, koagülasyon bozuklukları	– 18 °C ↓	1 Yıl	6-10 ml/kg	4-6 ml/dk
Donmuş Plazma	Vitamin K’ya bağlı faktörler, albumin, immunoglobulinler	Koagülasyon ve karaciğer bozuklukları, DIC, kumarin toksikasyonu, pankreatitis	– 18 °C ↓	5 Yıl	10 ml/kg	3-6 saat içinde, 4-6 ml/dk
Kriyosipitat	Fibrinojen, fibronektin, von Willebrand faktör, faktör VIII – XI – XIII, albumin, immunoglobulinler	Koagülopati	– 18 °C ↓	1 Yıl	1 ünite/10 kg	Kanama kontrol edilene kadar
Trombositten Zengin Plazma	Trombosit, tüm koagülasyon faktörleri, plazma proteinleri	Trombositopeni	22–25 °C	Hemen Kullanılmalı	1 ünite/10 kg	2 ml/dk

1.5.1. Tam Kanın Saklanması

Tam kan, uygun bir donörden antikoagülan içeren kan torbasına toplanan bir ünite kan olarak tanımlanır. İlk 24 saat içerisinde kullanıldığında veya işlendiğinde taze tam kan, 24 saat depolamadan sonra saklanmış tam kan olarak isimlendirilmektedir (Lanevschi ve Wardrop 2001, Davidow 2013). Kan transfüzyonunun ulaşılabilir, güvenli, etkin ve ucuz olarak yapılabilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda tam kanın saklanması, ulaşılabilirliği artırmakta ve maliyetini de oldukça düşürmektedir (Gibson ve Abrams-Ogg 2012).

Eritrositler ilk olarak Rous ve Turner (1915) tarafından, antikoagülan amaçlı sitrat, besleyici olarak da glukoz eklenerek 4 hafta kadar canlı tutulmuştur. Fakat glukozun otoklav ısılarında karamelize olması nedeniyle, solüsyonun sterilitesi sağlanamamıştır. Loutit ve Mollison (1943), solüsyonun pH'sının 5'e düşürülmesi ile şekerin 100 °C üzerinde stabilitesini sağlayarak, sterilize edilebilen ilk kan saklama solüsyonu Asit-Sitrat-Dekstroz'un (ACD) bulunmasını ve eritrositlerin 3 hafta kadar süreyle %70 oranında canlı kalarak saklanabilmesini sağlamışlardır. Bu süreçte eritrositlerin fosfat kaybettiği ve adenini katabolize ettiği ortaya konmuştur (Hess 2006). Eritrositlerin saklama sırasında hemolize uğradığı ve mannitol gibi şekerlerin saklama solüsyonlarına eklendiğinde hücre membranını stabilize ederek ve antioksidan özellik göstererek hemolizi azaltabildiği belirtilmiştir. Bu sürecin devamında saklanan tam kanın kalitesini artırma ve hemolizi azaltma amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Hemoliz oranı polivinil klorid içerikli plastik torbalarda saklanan kanda 4 kat, lökoredüksiyon filtre kullanılarak hazırlanan kanda ise ek olarak 2 kat daha azaltılabilmektedir (Lanevschi ve Wardrop 2001, Hess 2010).

Geliştirilen solüsyonlar eklenen içeriklere göre farklı isimlerle adlandırılmıştır. ACD, fosfatın eklenmesiyle sitrat-fosfat-dekstroz (CPD) ve adeninin eklenmesiyle sitrat-fosfat-dekstroz-adenin (CPDA veya CPDA-1) adını almıştır. 1970'li yıllarda saklama amacıyla cam şişeler yerine plastik torbaların kullanılmaya başlamasıyla kan ürünlerinin ayrıştırılabilmesine olanak sağlanmıştır (Gibson ve Abrams-Ogg 2012, Lacerda ve ark 2014). Plazmanın ayrılmasıyla elde edilen eritrositler için spesifik solüsyonlar geliştirilmiştir. Bu tip sistemlerde tam kan ACD ya da CPD solüsyonları içerisine alınarak eritrositler, plazma ve trombositler ayrı ayrı torbalara alınmış ve eritrosit solüsyonları bu torbalar içine eklenmiştir. Bu anlamda hazırlanan ilk solüsyon tuz-adenin-glukoz içerikli olmuş, daha sonra mannitolün eklenmesiyle tuz-adenin-guanin-mannitol haline getirilmiştir (Hess 2010, Dawidow 2013).

Koruyucu solüsyonlar içeren torba sistemlerinde birincil torbada genel olarak CPD solüsyonu bulunmaktadır (Lanevschi ve Wardrop 2001). Bu sistemlerin uydu torbalarında ise, hücresel metabolizmayı sürdürmek ve canlılığı devam ettirmek için gerekli dekstroz, adenin, mannitol ve sodyum klorid gibi maddeleri içeren, ancak protein taşımayan katkı solüsyonları bulunmaktadır (Davidow 2013). Plazması ayrılmış insan konsantre eritrositlerine ilave edilen Adsol, Nutricel ve Optisol katkı solüsyonlarının saklama sürelerini 35-37 güne kadar uzattığı bildirilmektedir (Hess 2006, Lacerda ve ark 2014). Koruyucu solüsyonların içerdikleri yoğun konsantrasyonda dekstroz ve adenin maddelerinin eritrosit enerji metabolizmasında kullanılmasıyla eritrosit saklama süresini uzattığı belirtilmektedir (Gibson ve Abrams-Ogg 2012).

Günümüzde sıklıkla kullanılan CPDA-1 içerikli kan torbalarında 63-70 ml antikoagülanlı solüsyon bulunmaktadır. Depolama sırasında oluşan biyokimyasal değişimleri yanında, eritrosit içeren ürünlerin saklama süresinin koruyucu solüsyona bağlı olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Lanevschi ve Wardrop 2001). Saklama süresince eritrositlerde gözlenen değişimler "saklama lezyonları" olarak isimlendirilmekte ve bu lezyonlar ATP, 2,3-DPG, glukoz konsantrasyonlarında düşme, pH azalması ile plazma potasyum (K^+) konsantrasyonu, laktik asit ve pirüvik asit artışını kapsamaktadır (Lelubre ve Vincent 2013, Lacerda ve ark 2014). Saklama lezyonları eritrositlerde canlılık ve fonksiyon kaybına yol açmakta, dolayısıyla kan naklini etkisiz hale getirebilmektedir. Eritrosit naklinin doku reoksijenizasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde, 15 günün üzerinde saklanan eritrositlerde ATP kaybından dolayı esneklik kaybı şekillenebileceği (Hess 2006), bu nedenle eritrositlerin kapillar dolaşımı engellenerek doku reoksijenizasyonunda problem yaşanacağı belirtilmektedir (Hess 2010). CPD ve ACD antikoagülan solüsyonları konsantre eritrosit ürününün 21 gün boyunca saklanmasına olanak sağlamaktadır. CPDA-1 antikoagülan solüsyonunun eritrosit fonksiyon ve canlılığını desteklediği, 2,3-DPG ve ATP'yi daha iyi koruduğu ve saklama sürelerini 3-5 haftaya (21-35 gün) kadar uzattığı belirtilmektedir (Kisielewicz ve Self 2014). American Association of Blood Banks standartlarına göre, eritrosit canlılığının 35 günlük saklama sonunda ve nakilden 24 saat sonra %75 oranında sürmesi istenmektedir. Kan naklinin başarılı sayılabilmesi için nakil sonrası canlılığın devamının bir kriter olduğu da belirtilmektedir (Gibson ve Abrams-Ogg 2012).

Tam kan ve kan hücrelerinin daha uzun süre ve kaliteli saklanabilmesi amacıyla farklı içerikte solüsyon hazırlamaya yönelik çalışmalar halen sürdürülmektedir.

1.5.2. Saklanan Tam Kanda Meydana Gelen Değişiklikler

Eritrositlerde saklama süresince metabolik değişiklikler, şekil değişiklikleri, reolojik değişiklikler, membran karbonhidratlarının kaybı, lipid ve proteinlerin oksidatif hasarı, oksijen tutulumu ve taşınmasında değişiklik, eritrositlerin endotelial hücrelere adhezyonunda artış, kısalan yaşam süresi ve sekonder olarak K^+ konsantrasyonunda artış, aktif protein, lipid, mikrovezikül ve bakteriyel kontaminant saçılımı gibi lezyonlar meydana gelebilmektedir (Lanevski ve Wardrop 2001, Hess 2010, Lelubre ve Vincent 2013). Bunların bir kısmı ve aralarındaki ilişki tamamen anlaşılmış fakat fizyolojik anlamları ve klinik etkileri üzerine tartışmalar devam etmektedir (D'Alessandro ve ark 2015). İnsan kanının saklanma süresince eritrosit ve plazmada görülen bazı önemli değişiklikler Çizelge 1.15'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.15. Saklama süresince eritrosit ve plazmada görülen bazı önemli değişiklikler (Lelubre ve Vincent 2013)

Eritrosit	Plazma
<i>Metabolik değişiklikler</i>	
<ul style="list-style-type: none">➤ Bozulan oksijen dağıtımı nedeniyle azalan 2-3 DPG,➤ Azalan fosfat ve adenin (AMP, ADP, ATP) miktarı,➤ Azalan glutatyon düzeyi,➤ Artan laktat düzeyi.	<ul style="list-style-type: none">➤ Azalan pH,➤ Artan K^+ konsantrasyonu,➤ Çeşitli moleküllerin salınımı;<ul style="list-style-type: none">○ Proinflamatuvar sitokinler (IL-1 beta, IL-6, IL-8, TNF-alfa),○ Platelet aktive edici faktör gibi biyolojik olarak aktif lipidler,○ Serbest hemoglobin,○ Potansiyel oksidatif hasar, sitotoksikite ve yangıya neden olacak hem ve demir.
<i>Oksidatif stres</i>	
<ul style="list-style-type: none">➤ Protein oksidasyonu; hücre iskeletinde hasar,➤ Lipid peroksidasyonu; lisofosfolipid, protoglandin ve izoprostan oluşumu.	
<i>Şekil ve membran değişiklikleri</i>	
<ul style="list-style-type: none">➤ Ekinositlerden sferoekinositlere dönüşüm,➤ Prokoagulan özellikli mikrovezikül oluşumu,➤ Eritrositlerde elastikiyet kaybı ve vasküler endotele tutunma.	

Metabolik ve biyokimyasal değişiklikler

Eritrositler kan bankalarında 1-6 °C arasında, donması veya yüksek ısılarda besleyici solüsyonları çabuk tüketmesi önlenerek saklanmaktadır (Hess 2010). Eritrositlerin tek enerji kaynağı glikolizistir. Glikoliziste ATP yapımı amacıyla glukoz yıkımlanırken, laktik asit ve protonlar açığa çıkar. Biriken protonlar saklama solüsyonu ve eritrositleri daha asidotik bir hale getirerek fosfofruktokinazın inhibe edilmesiyle glikolizisi, dolayısıyla ATP üretimini yavaşlatır (D'Alessandro ve ark 2015). Eritrositlerdeki ATP konsantrasyonu, eritrositlerin canlılığı ve yaşam süresine ilişkin en önemli parametredir. Glikolizis +3 °C'de, oda sıcaklığına göre 10 kat yavaşlamaktadır (Ruddell ve ark 1998).

Eritrositler pH değeri yaklaşık 7,35 olan venöz kandan pH 5,5-5,8 aralığındaki CPD solüsyonunu içeren torbalara toplanmaktadır. Sonuç olarak, süspansiyon yaklaşık 7,1 pH değerine ulaşmakta, fakat donörün hemoglobin konsantrasyonu, ventilasyon düzeyi ve alınan kanın miktarına göre değişiklikler olabilmektedir. Düşük pH düzeyinde 2,3 DPG yıkımı artmakta ve bu durum ATP üretiminde bir yükselmeye neden olmaktadır. Aynı zamanda pH'nın düşmesi ve inhibe edilen fosfofruktokinaz, pentoz fosfat yolunda kullanılacak glukoz-6-fosfat ve antioksidan özelliğiyle kullanılan GSH miktarını artırmaktadır (Hess 2010).

ATP gerektiren Na⁺-K⁺ pompasının düşük sıcaklıkta kapanması nedeniyle elektrolitlerin geçişi düzgün sağlanamamaktadır. Saklanmış insan tam kanında, eritrosit dışına yavaşça sızan K⁺ yaklaşık 1 mEq/gün artarak, kan torbasındaki ekstraselüler sıvıda birikir (Hess 2010). Bu durum, eritrosit içi K⁺ konsantrasyonu yaklaşık 100 mmol/L olan insanlar için, transfüzyon sonrası hiperkalemi gibi istenmeyen etkilere yol açabilir. Fakat bu durum tüm türlerde benzer değildir (Sousa ve ark 2012). Örneğin köpeklerde eritrosit içi K⁺ konsantrasyonu (5,7 mmol/L) ekstraselüler sıvıya yakın olduğu için, saklama süresince ekstraselüler sıvıda yüksek oranda birikim söz konusu değildir (Trumel ve ark 2003). Farklı türlerde eritrosit içi ve plazma K⁺ konsantrasyonları Çizelge 1.16'da özetlenmiştir.

Saklama süresinin köpek kan konservesi üzerine etkileri farklı açılardan değerlendirilmiş, saklama süresince hematolojik (HCT, PLT, WBC, MCV) ve kan gazları (pH, HCO₃, PCO₂) değerlerinde azalmalar serbest hemoglobin, laktat, Na⁺ ve K⁺ konsantrasyonlarında ise artışlar belirlenmiştir (Nolte ve ark 1988).

Çizelge 1.16. Farklı türlerde hücre (eritrosit) içi ve plazma K⁺ konsantrasyonları
(Harvey 2010)

Tür	Eritrosit içi* (mmol/L)	Plazma (mmol/L)
İnsan	102	3,5-5,1
Köpek	5,7	3.9-5.1
Kedi	5,9	3.7-6.1
Sığır	22	3.6-4.9
At	120	2.9-4.6
Koyun	98,7	4.3-6.3
Keçi	76,1	3.8-5.7

*Ortalama değer

Şekil değişiklikleri

Saklama süresince eritrositler yavaşça şekil değiştirmektedir. Pürüzsüz, bikonkav disklere benzeyen eritrositler, zamanla oldukça engebeli yüzeye sahip sferoekinosit adı verilen kürelere dönüşmektedir. Bu şekil değiştirme, gençleştirme olarak adlandırılan hücrelerin ısıtılması ve nötral pH'daki bileşenlerle karıştırılmasıyla genel olarak reversible bir süreç olarak değerlendirilir (D'Alessandro ve ark 2015). Gençleştirme sürecinde ATP konsantrasyonu ve DPG rejenerasyonu da artar. Buna rağmen sferoekinosit sürecin uzadığı durumlarda, membran üzerindeki ekinotik çıkıntılarının kopması sonucu mikroveziküller oluşabilir. Aynı zamanda, membran kaybı fizyolojik olarak eritrositlerin programlı hücre ölümü sürecinde ve okside olan lipidler ya da hasar gören proteinler nedeniyle de görülebilmektedir (Lelubre ve Vincent 2013). Eritrositlerdeki şekil değişimi ve mikrovezikülasyon artan viskozite ve azalan akım gibi reolojik değişiklikler nedeniyle de olmaktadır. Yapay ya da fizyolojik koşullarda deneysel olarak ortaya konulan bu değişimlerin de reversible olduğu belirtilmektedir (Hess 2010).

Bazı değişimlerin ise irreversible olduğu vurgulanmaktadır. Saklanan tam kanda lökositlerin yıkımlanmasıyla glikozidaz, lipaz ve proteaz enzimleri serbest kalmaktadır. Bu enzimler eritrosit yüzeylerinde immun koruyucu şekerleri ve proteinleri parçalayarak ve lipidleri de-alkalize ederek hemolize neden olmaktadır (Sparrow ve ark 2007).

Farklı türlerde saklama süresince hematolojik ve hemolizle ilgili parametrelerde belirlenen değişiklikler Çizelge 1.17'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.17. Farklı türlerde kanın saklama süresince hematolojik ve hemolizle ilgili parametrelerde belirlenen değişiklikler

Araştırmacı	Tür	Örnek	Koruyucu solüsyon	Saklama süresi	RBC	HGB	HCT	MCV	MCHC	Plazma HGB	K ⁺	LDH
Nolte 1986	Köpek	Tam kan	CPDA-1	21 gün	↓	↓	↓	↓				
Seidl 1991	İnsan	Tam kan	CPDA-1	35 gün	↓	↓	↓					
Sommer ve ark 1994	Kedi	Tam kan	CPDA-1	42 gün	↓	↓	↓			↑	↑	
Sousa ve ark 2013	Koyun	Tam kan	CPDA-1	35 gün	↓		↓	↑		↑	↑	
Barthell 1999	At	Tam kan	CPDA-1	35 gün	↓	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑
Price ve ark 1988	Köpek	RBC	CPDA-1	35 gün				↑	↓			
Wardrop 1997	Köpek	RBC	CPDA-1	35 gün			↑					
Beutler ve ark 1982	İnsan	RBC	CPDA-2	35 gün				↑	↓	↑	↑	
Turner ve ark 1987	İnsan	RBC	CPDA-1	35 gün				↑	↓	↑	↑	

↑: Artma, ↓: Azalma, ↓: Değişikliğin olmaması

1.5.2.1. Saklanan kanda oksidatif stres

Eritrositler, sürekli ve yüksek konsantrasyonda oksijen radikallerine maruz kalması, çekirdek ve mitokondrisinin bulunmaması, yeni protein ve detoksifiye edici enzim sentezleyememesi nedeniyle oksidatif strese karşı oldukça duyarlıdır (Hess 2010, Lelubre ve Vincent 2013, D'Alessandro ve ark 2015).

Lipid ve proteinlerin oksidatif hasarı saklama süresince eritrositlere zarar vermektedir (Dumaswala ve ark 1999). Venöz kandan toplanan eritrositlerin yaklaşık %75'i oksijen doygunluğuna ulaşmış haldedir. Oksijen molekülleri sürekli ferro (Fe^{+2}) hemoglobin molekülünden ayrılarak, diğer hemoglobin moleküllerine bağlanırlar. Fakat bu istenen bir reaksiyon değildir. Bazen oksijen molekülü elektron alarak süperoksit radikali ve ferri (Fe^{+3}) methemoglobin oluşumuna neden olur. Normal koşullarda eritrositler sahip oldukları SOD ve methemoglobin redüktaz ile oluşan hasarı kısa sürede düzeltirler (Kanas ve Acker 2010). Saklama koşullarında ise glikolitik yol üzerinden akış yavaşladığı için glutasyon konsantrasyonu azalır. Serbest demir ya da hemin bulunduğu koşullar altında süperoksit radikali su ile birleşerek fenton reaksiyonuna girer ve hidroksil radikalinin açığa çıkmasına neden olur (Hess 2010). Hidroksil radikalleri özellikle lipid ve proteinler için oldukça zararlıdır. Trialkil gliserol gibi lipidler dealkalize olarak aktif biyolojik formları olan dialkil gliserollere çevrilebilir. Doymamış yağlar okside ya da polimerize edilebilir (Dumaswala ve ark 1999). Proteinler, aminoasit sıraları değiştirilerek ya da eksiltilebilir zararlı formlara dönüştürülebilir. Bu dönüşüm, glukozun hemoglobine bağlanarak HGB-A1c oluşturması gibi sık görülen oksidatif bir süreç olabileceği gibi, eritrositlerdeki Band III'e verilen oksidatif hasarla hemolize de neden olabilmektedir (D'Alessandro ve ark 2015).

Saklanan kanda hemoglobin, membran proteinleri ve lipidlerinin oksidasyonu gelişirken bu durumlara antioksidan savunma sistemleri ile karşılık verilir (Şekeroğlu ve ark 2012, D'Alessandro ve ark 2015).

Hemoglobin oksidasyonu

Eritrositlerin ana proteini olan hemoglobin, sitoplazma içerisinde paketlenmiş halde bulunur ve hücre ağırlığının %90'ını oluşturmaktadır. Hemoglobin etkin bir antioksidan sistemle korunmasına rağmen, içerisinde bulunan Fe^{+2} sürekli ve yüksek konsantrasyonda oksijene maruz kalması nedeniyle yavaşça methemoglobine okside olmaktadır (Kanas ve Acker 2010). Methemoglobin formu oksijeni bağlayamaz ve taşıyamaz. Normal koşullarda

eritrositteki methemoglobin konsantrasyonu total HGB'in %1'inden daha azdır. Oksidatif stres durumlarında ise bu oran yükselmektedir (Hess 2010). Aynı zamanda HGB oksidasyonu yakındaki globin zincirleri ile disülfid bağlantıların oluşmasına ve Heinz cisimciği adı verilen hemoglobinin temel yapısını bozan görülebilir partiküllerin açığa çıkmasına neden olur (Kanas ve Acker 2010). Sınırlı oksidatif hasara maruz kalan hücrelerdeki Heinz cisimcikleri monosit-makrofaj sistemi tarafından temizlenebilirken, artan oksidasyon hücrenin hemolizine neden olabilir (D'Alessandro ve ark 2015). Hiperglisemi durumlarında glukozun hemoglobine oksidatif bağlanımı sonucunda şekerleşmiş hemoglobin formu olan HGB-A1c oluşturulur. HGB-A1c seviyesi Tip II diabetes hastalarında protein oksidasyonu ve şekerleşme ile yakından ilgilidir (Hess 2010).

Membran proteinlerinin oksidasyonu

Serbest radikaller hemoglobin yanında eritrositlerdeki diğer proteinleri de hedef alırlar (Lelubre ve Vincent 2013). Eritrosit hücre membranı iskeleti lipid katman arasında bulunan spektrin, anikrin, aktin ve protein 4.1 gibi proteinlerden oluşturulmaktadır. Spektrin ve aktin hücrenin viskoelastik yapısını sağlayan yapısal proteinlerdir. Hücre membranı protein-protein ve protein-lipid bağlantılarıyla iskeletin korunmasını sağlamaktadır. Serbest radikaller aminoasit yapısındaki yan zincirleri bozarak istenmeyen protein-protein bağlantılarının oluşmasına ve normal protein yapısının denatürasyonu sonucu, pek çok oksidasyon ürününün açığa çıkmasına neden olurlar (D'Alessandro ve ark 2015). Yaşlanma, diyabet ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda da eritrosit proteinlerinde bozulmalar meydana gelebilmektedir (Hess 2010).

Membran lipidlerinin oksidasyonu

Eritrosit plazma membranı oksidasyona duyarlı çoklu doymamış yağ asitleri bakımından oldukça zengindir (Dumaswala ve ark 1999). Eritrosit membranı, hücre iskeleti ve çift katlı lipid bariyer tarafından oluşturulmaktadır. Lipid bariyerin dış yapısını kolesterol oluşturmakta, fosfolipidler ise bariyer içinde düzensiz olarak dağılmış şekilde bulunmaktadır. Kolesterol, bariyerin esnek ve sağlam olmasını sağlamaktadır. Membran yapısındaki protein ve glikoproteinler lipid bariyere gömülü halde bulunmaktadır (Hess 2010).

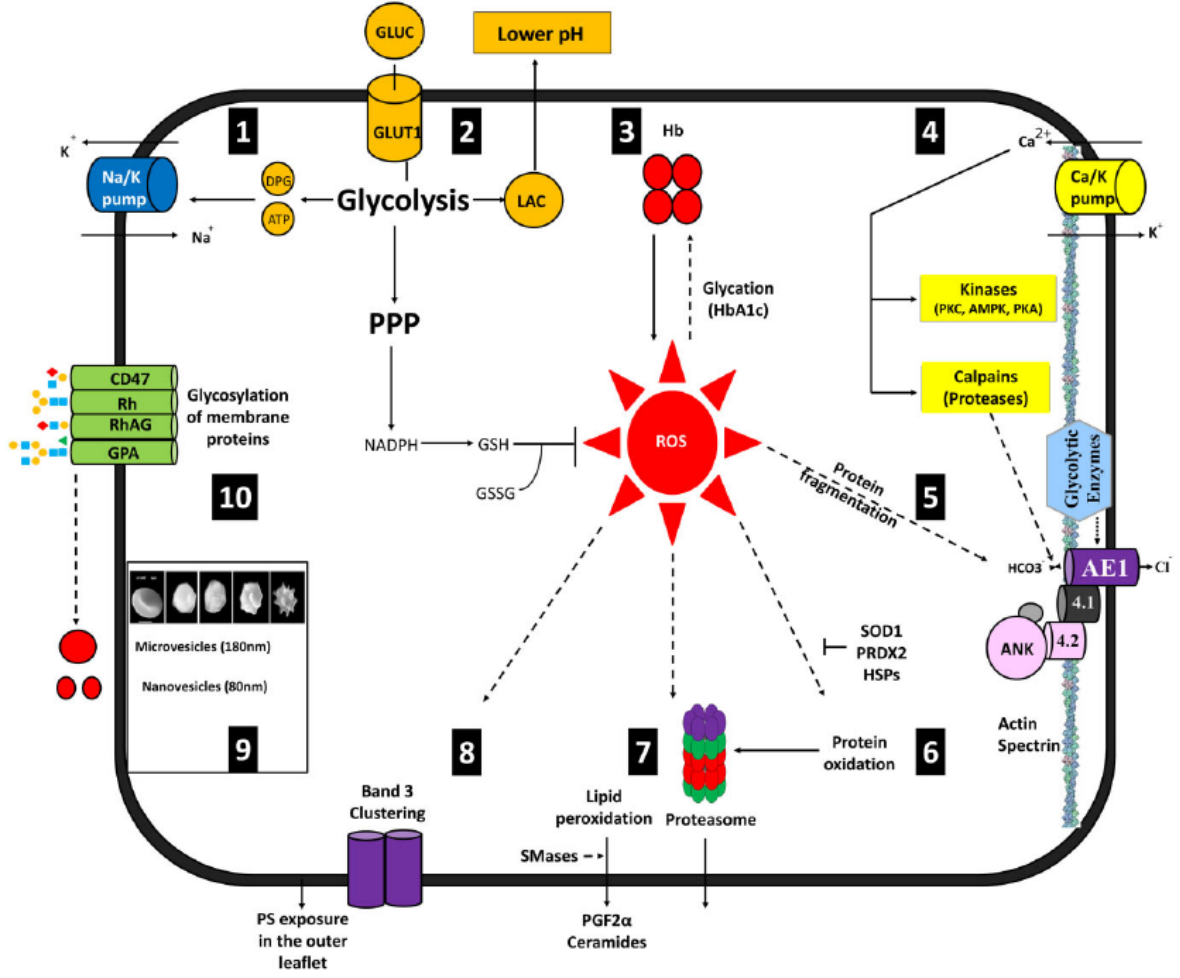
Lipidler, eritrositin şeklini koruması için kritik öneme sahiptir. Membran yüzeyindeki küçük değişiklikler bile morfolojik ve fonksiyonel bozukluklara neden olabilmektedir. Serbest radikallere maruz kalınması lipid peroksidasyonu ve istenmeyen

ürünlerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Nagababu ve ark 2008, Lelubre ve Vincent 2013). Böyle durumlarda ana lipid peroksidasyon ürünü olan MDA veya TBARS ölçümü yapılarak lipid peroksidasyonunun varlık ve düzeyinin belirlenebileceği bildirilmektedir (Dumaswala ve ark 1999).

Antioksidan sistem

Eritrositler yüksek miktarlarda enzimatik ve non-enzimatik yapıda antioksidan içermektedir (Hermes-Lima 2004, Mohanty 2013). Redükte glutatyon, askorbik asit, alfa tokoferol ve diğer tiol grupları, en temel endojen non-enzimatik antioksidanlardır. Alfa tokoferol peroksil radikallerini temizleyerek hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu engeller (Sorg 2004). Oksidatif strese neden olan pek çok durumda alfa tokoferol seviyelerinin azaldığı belirtilmektedir. Birincil hücre antioksidanlarından olan askorbik asit, membran ve diğer hidrofobik parçaları, alfa tokoferolün rejenerasyonuna yardım ederek korur (Durackova 2010). Glutatyon ise farklı yönleriyle hücreyi oksidanlara karşı koruma potansiyeline sahiptir. Glutatyonun temel rolü, eritrositlerdeki hemoglobini yapısı bozulmadan korumaya çalışmaktır. Eritrosit membranının korunmasını membrandaki tiol gruplarının onarılması ile sağlar (Young ve Woolside 2001). Aynı zamanda GSH-Px ve GSH S transferaz gibi enzimatik antioksidanların yapısına girerek etkinlik gösterir. SOD, GSH-Px ve CAT gibi enzimler ise eritrositlerdeki antioksidan sistemin enzimlerini oluşturmaktadırlar (Hess 2010, D'Alessandro ve ark 2015).

Saklama süresince eritrositlerde gözlenen temel biyokimyasal değişiklikler Şekil 1.5'de özetlenmiştir.



Şekil 1.5. Saklama süresince eritrositlerde gözlenen temel biyokimyasal değişiklikler (D'Alessandro ve ark 2015). (1) Düşük sıcaklıklarda katyon homeokinesisinin bozulması sonucu ATP ve DPG'nin tükenmesi. (2) ATP ve laktat üretimi için glukozun glikolizis yoluyla tüketilmesi ve pH değerinin düşmesi. (3) Düşük sıcaklık ve oksidatif stresin (hemoglobinin kaynaklı fenton reaksiyonları) pentoz fosfat yolunu uyararak glutatyon homeokinesisini bozması. (4) Kalsiyum homeokinesisindeki bozuklukların kinaz (PKC, PKA, AMPK) ve proteolitik enzimleri (kalpain) uyararak Band 3 ve yapısal proteinlere zarar vermesi. (5) AE1 klor değişikliği ile pH'nın kontrol altında kalmasını sağlarken dolaylı yoldan HGB-oksijen bağlanması ve gaz değişimlerine etki eder. AE1'in parçalanmasının (ROT, kalpain ve kaspazlar tarafından) glikolitik enzim ve yapısal proteinlere etki etmesi (ANK, Band 4.2 ve Band 4.1). (6) Protein oksidasyonu antioksidan savunma sistemleri (SOD, Peroksiredoksin) ve eşlik eden proteinler (ısı şok proteinleri) tarafından kontrol altına alınmaya çalışılır. Fakat saklama süresince redoks değişiklikleri protein (karbonilasyon, HGB glikasyonu, parçalanma) ve lipid hasarına devam eder. (7) Saklamanın protein (proteozom yardımıyla supernatantta) ve lipid (sfingomiyelinaza bağlı seramid birikimi) parçalanması üzerine etkisi. (8) Saklama, membranda AE1 parçalarının birikimine, fosfatidilserinin membran dışına çıkmasına ve eritrositin proimmünojenik yapısını bozacak lipid kümelerinin oluşumuna neden olur. (9) Bu değişiklikler membran esnekliğinin bozulmasına, ozmotik frajilitenin artmasına ve yapısını geri dönüşümsüz olarak kaybeden proteinlerin mikro-nanoveziküller halinde saçılmasına neden olur. (10) Saçılan veziküller HGB, lipid kümeleri ve bozuk membran parçalarıyla birleşebilir.

Tüm bu süreçler dolaşımdaki eritrositlerde de gerçekleşebilmektedir (D'Alessandro ve ark 2015). Saklama koşullarında sıcaklığın düşmesi ile reaksiyon hızı yavaşlatılarak bu hasarlar azaltılabilmektedir. Fakat, saklanan kanda gerçekleşen oksidatif hasar transfüzyon sonrası akut akciğer hasarına kadar ulaşan komplikasyonlara neden olabilmektedir (Pallota ve ark 2014). Eritrosit yüzeyindeki lipidlerin oksidasyonu mikroveziküllerin oluşumuna neden olmakta, açığa çıkan prokoagülan ve proinflamatuvar yüzeyler ise transfüzyon sonrası tromboz gelişim riskini artırmaktadır (Hess 2010).

Eritrosit yaşam süresini kısaltan, oksijen taşıma kapasitesini azaltan ve transfüzyon sonrası komplikasyon riskini artıran bu tip oksidatif reaksiyonları anlamaya ve azaltmaya veya önlemeye yönelik araştırmalar özellikle insan tam kanı üzerinde devam etmektedir (D'Alessandro ve ark 2015). Saklanmış tam kanda oksidatif stresin değerlendirildiği çalışmalar, amaçları, değerlendirilen günler ve parametreler Çizelge 1.18'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.18. Saklanmış tam kanda oksidatif stresin değerlendirildiği çalışmalar

Araştırmacı	Tür	Amaç	Değerlendirme zamanı	Oksidan	Antioksidan
Jozwik ve ark 1997	İnsan	Eritrosit ve plazma antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi	1, 3, 7, 12, 16, 20, 25. gün		SOD ↓, GSH-Px ↓, CAT ↑, TRAP ↓, GSSH ↓
Racek ve ark 1997	İnsan	Donörlere antioksidan uygulamasının kanın kalitesi üzerine etkileri	0, 10. gün	MDA ↑	SOD ↓, GSH-Px ↓, AOC ↓
Dumaswala ve ark 1999	İnsan	Protein ve lipid oksidasyonu ile glutasyonun rolü	0, 42, 84. gün	MDA ↑	GSH ↓, GSH-Px ↓, CAT ↓
Gültekin ve ark 2000a	İnsan	Kan torbasına melatonin eklenmesinin koruyucu etkisi	1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35. gün	TBARS ↑	AOP ↓
Gültekin ve ark 2000b	İnsan	Kan torbasına Vitamin C eklenmesinin koruyucu etkisi	1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28, 35. gün	TBARS ↑	AOP
Marjani 2006	İnsan	Plazma lipid peroksidasyonu ve total antioksidan seviye	0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35. gün	MDA ↑	TAK ↓
Marjani ve ark 2007	İnsan	Plazma lipid peroksidasyonu ile eritrosit SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri	0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35. gün	MDA ↑	SOD ↓, GSH-Px ↓
Ogunro ve ark 2010	İnsan	Saklamanın eritrosit ve plazma antioksidan düzeyleri üzerine etkisi	1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40. gün	MDA ↑	TAK ↓, SOD ↓, GSH-Px ↓, CAT ↓
Singkaya ve ark 2010	Köpek	Saklanmış tam kanda oksidatif değişiklikler	0, 3. saat, 14, 28, 42. gün		GSH ↓, TAK ↑
Küçükakin ve ark 2011	İnsan	Oksidatif stres biyobelirteçleri ve eritrositlerdeki değişiklikler	1,3, 7, 14, 21, 28, 35. gün	MDA ↑	alfa tokoferol ↓, askorbik asit ↑
Chaudhary ve Katarina 2012	İnsan	Saklama süresince eritrositlerdeki saklama lezyonlarına oksidatif stresin etkisi	0,14, 28. gün	MDA ↑	
Sekeroglu ve ark 2012	İnsan	Kan torbasına melatonin ya da propofol eklenmesinin koruyucu etkisi	0, 7, 14, 21, 28. gün	MDA ↑	SOD ↓, GSH-Px ↓, CAT ↓, GSH ↓,
Hsieh ve ark 2014	Rat	Kan torbasına kurkumin eklenmesinin koruyucu etkisi	0, 5, 10, 15, 20. gün	TBARS ↑	SOD ↑, CAT ↑, AOP ↑
Ozcelik 2014	İnsan	Kan torbasına melatonin eklenmesinin koruyucu etkisi	0, 7, 14, 21. gün	MDA ↑	SOD ↓
Pallotta ve ark 2014	İnsan	Kan torbasına vitamin C ve N-asetil sistein eklenmesinin koruyucu etkisi	0, 7, 21, 28, 42. gün	MDA ↑	GSH

↑: Artma, ↓: Azalma, ⇆: Anlamlı değişikliğin olmaması

Saklanmış insan tam kanında oksidatif stresin değerlendirilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 1.18). Tekniğine uygun olarak alınan ve uygun koşullarda saklanan tam kanda belirli periyotlarda oksidatif biyobelirteçlerin analizleri yapılmış ve oksidatif hasar şekillenmeden, güvenli saklama süresinin yaklaşık 10 (Webster ve ark 1986, Ogunro ve ark 2010), 12 (Jozwik ve ark 1997) veya 14 gün (Fagiolo ve ark 1986) düzeyinde olduğu belirtilmiştir.

Donörlere farklı antioksidanlar verilerek saklanan tam kanda oksidan/antioksidan denge değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, konserve amaçlı kan alımı öncesinde donörlere 10 gün süreyle 36 mg beta karoten, 200 mg vitamin E, 300 mg vitamin C ile 40 mg selenyum içeren bir preparat oral yolla verilmiş, torbalara kan alımı sonrası 0. ve 10. günlerde oksidatif duruma yönelik parametreler değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, antioksidan verilen donör eritrositlerinin serbest radikal hasarından daha az etkilendiği belirtilmiştir (Racek ve ark 1997). Maeda ve ark (1992) da kan alımı öncesi donörlere antioksidan ve vitamin uygulamasının serbest radikallere duyarlılık açısından kanın kalitesini artırabileceğini belirtmiştir.

Racek ve ark (2001), saklama süresince oluşan ve hemolize neden olan serbest radikallerin kaynağını değerlendirme amacıyla lökoredüksiyon uygulanmış ve uygulanmamış kanlardaki oksidan ve antioksidan durumu değerlendirmiş, lökoredüksiyon uygulanan grupta oksidan düzeylerinin diğer gruba göre daha düşük, antioksidan düzeylerinin ise daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Donörlere antioksidan uygulaması dışında birçok çalışmada saklanan tam kan ya da konsantre eritrosit süspansiyonu içerisine antioksidan etkili maddelerin eklenmesiyle oksidatif stres değerlendirilmiştir. Gültekin ve ark (2000a), CPDA-1 içerikli torbalara alınan insan kanına melatonin eklemiş ve bunun saklama süresince serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını azaltarak, eritrositlerin yaşam yeteneği ve süresini artırılabilirliğini göstermişlerdir. Benzer şekilde kan torbası içerisine melatonin (Sekeroglu ve ark 2012, Ozcelik 2014), propofol (Sekeroglu ve ark 2012), kurkumin (Hsieh ve ark 2014), vitamin C (Gültekin ve ark 2000b) ve N-asetil sistein (Pallotta ve ark 2014) eklenerek saklama süresince oksidatif durum değerlendirilmiştir.

Saklanmış köpek tam kanında oksidatif stres gelişimi Singkanya ve ark (2010) tarafından araştırılmış ve 42 günlük saklama süresinde GSH konsantrasyonunun azaldığı, TAS değerinin ise arttığı belirlenmiştir. Ancak literatürde antioksidan uygulanan

donörlerden alınarak saklanan köpek tam kanında bu uygulamanın oksidan/antioksidan durum üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

1.6. Sağlıklı Köpeklerde Bazı Oksidan ve Antioksidan Biyobelirteçlerin Değerleri

Veteriner hekimlikte oksidatif stres özellikle son 10 yılda birçok çalışmada değerlendirilmiştir. Değerlendirmelerin farklı durum ve hastalıklarda oksidan/antioksidan durumun belirlenmesine yönelik olduğu görülmektedir (Çizelge 1.8). Bu çalışmalarda ağırlıklı olarak söz konusu durumun ortaya konulması amacıyla sağlıklı köpeklerde de oksidan/antioksidan duruma ilgili ölçümler yapılmış (Çizelge 1.19) ve kontrol grubu değeri olarak kullanılmıştır.

Çizelge 1.19’da görüldüğü üzere, sağlıklı köpeklerde oksidan/antioksidan denge ile ilişkili parametrelerin ölçümü çoğunlukla kısıtlı sayıda hayvanda farklı örnek tipleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Literatürde köpeklerde oksidan ve/veya antioksidan biyobelirteçlerin referans değerleri sınırlı sayıdaki araştırmada (Nemec 2000, Todorova ve ark 2005) bildirilmektedir.

Örnek tiplerindeki farklılık ve kullanılan hayvan sayısının kısıtlılığı dışında oksidatif strese ilgili parametelerin ölçüm tekniğinde de bir örneklik bulunmamaktadır. Oksidatif stresin değerlendirilebilmesi amacıyla oksidan ve/veya antioksidanların doğrudan ya da dolaylı ölçülmesine yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam etmektedir (Dotan ve ark 2004). Her bir belirtecin ölçülmesinin kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmakla birlikte, aynı biyobelirteç farklı yöntemlerle de değerlendirilebilmektedir. Ayrıca reaktif yapıları nedeniyle oksidan ve antioksidanların ölçümü uygun teknik ekipman ve tecrübe gerektirmektedir. Bu nedenle aynı amaca yönelik çalışmalarda bile yöntemdeki farklılıklar nedeniyle sonuçların büyük varyasyon gösterdiği dikkati çekmekte (Çizelge 1.19) ve sonuçlar karşılaştırılamayabilmektedir (Celi 2010).

Literatürde sağlıklı köpeklerde bildirilen MDA, SOD, GSH-Px, CAT, TOS ve TAK değerleri Çizelge 1.19’da özetlenmiştir.

Çizelge 1.19. Sağlıklı köpeklerde belirlenen MDA, SOD, GSH-Px, CAT, TOS ve TAK değerleri

Parametre	Araştırmacı	Örnek tipi	n	Ortalama Değer	Birimi
MDA	Kumar ve ark 2006	Eritrosit	6	1,42	nmol MDA/mg HGB
	Chaudri ve ark 2008	Eritrosit	6	1,89	nmol MDA/mg HGB
	Sarma ve ark 2015	Eritrosit	6	1,22	nmol MDA/mg HGB
	Buranakarl ve ark 2009	İdrar	15	5,39	umol/gCr
	Buranakarl ve ark 2009	Plazma	15	9,89	nmol/mL
	Aydin ve ark 2009	Plazma	10	1,51	nmol/mL
	Kargın ve Fidancı 2001	Plazma	20	15,1	umol/L
	Bildik ve ark 2004	Plazma	18	17,41	umol/L
	Kiral ve ark 2005	Plazma	10	12,43	umol/L
	Todorova ve ark 2005	Plazma	28	1,82	umol/L
	Karadeniz ve ark 2008	Plazma	6	16,23	umol/L
	Crnogaj ve ark 2010	Plazma	14	8,13	umol/L
	Kapun ve ark 2012	Plazma	7	0,73	umol/L
	Heidarpour ve ark 2012	Plazma	30	1,82	nmol/mL
	Almeida ve ark 2013	Plazma	30	17,80	umol/L
SOD	Kargın ve Fidancı 2001	Eritrosit	20	306	U/g HGB
	Todorova ve ark 2005	Eritrosit	28	4035	U/g HGB
	Britti ve ark 2008	Eritrosit	33	82,6	U/g HGB
	Kapun ve ark 2012	Eritrosit	7	1587	U/g HGB
	Chaudri ve ark 2008	Eritrosit	6	0,006	U/mg HGB
	Sarma ve ark 2015	Eritrosit	6	2,86	U/mg HGB
	Tanja ve ark 2008	Eritrosit	31	11,9	umol/g HGB
GSH-Px	Kargın ve Fidancı 2001	Eritrosit	20	23527	nmol/NADPH ⁺ H ⁺ /dak/mg- HGB
	Britti ve ark 2008	Eritrosit	33	1013,4	U/L
	Tanja ve ark 2008	Eritrosit	31	5,52	umol/g HGB
	Kapun ve ark 2012	Eritrosit	7	494	U/g HGB
CAT	Kargın ve Fidancı 2001	Eritrosit	20	124	k/g- HGB
	Todorova ve ark 2005	Eritrosit	28	1216	U/g HGB
	Tanja ve ark 2008	Eritrosit	31	0,625	umol/g HGB
	Buranakarl ve ark 2009	Eritrosit	15	11,19	Kunit/g HGB
	Chaudri ve ark 2008	Eritrosit	6	0,074	U/mg HGB
	Sarma ve ark 2015	Eritrosit	6	2,10	U/mg HGB
TOS	Camkerten ve ark 2009	Plazma	15	12,22	umol H ₂ O ₂ equiv/L
	Lee 2012	Plazma	18	13,17	umol H ₂ O ₂ equiv/L
	Lee ve Kim 2014	Plazma	6	11,50	umol H ₂ O ₂ equiv/L
TAK	Camkerten ve ark 2009	Plazma	15	1,65	mmol Trolox equiv/L
	Lee 2012	Plazma	18	1,45	mmol Trolox equiv/L
	Lee ve Kim 2014	Plazma	6	4,30	mmol Trolox equiv/L
	Nemec ve ark 2000	Plazma	20	1,17	mmol/L
	Tanja ve ark 2008	Plazma	31	0,87	mmol/L
	Kapun ve ark 2012	Plazma	7	1,15	mmol/L
	Heidarpour ve ark 2012	Plazma	30	5,83	mmol/L
	Ciftci ve ark 2014	Plazma	10	0,87	mmol/L

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Bu araştırma, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun 07.10.2011 tarih ve B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050.04/2011/075 sayılı iznine dayanarak gerçekleştirildi.

Araştırmanın hayvan materyalini 50'si anemili ve 14'ü donör olmak üzere 20 sağlıklı, farklı ırk, yaş ve her iki cinsiyetten toplam 70 köpek oluşturdu.

Anemili köpekler, Mart 2013-Ekim 2013 tarihleri arasında ADÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Küçük Hayvan Kliniği'ne muayene ve sağaltım amacıyla getirilen, herhangi bir antioksidan verilmeyen hayvanlardan seçildi. Anemili köpeklerin sistemik klinik muayenelerini takiben aneminin şiddet ve tipinin belirlenmesine yönelik laboratuvar analizleri gerçekleştirildi.

Sağlıklı 20 köpek, iç ve dış parazit mücadeleleri ile aşı uygulamaları düzenli olarak yapılmış, aşılama veya sağlık kontrolü amacıyla kliniğe getirilen hayvanlardan klinik ve laboratuvar muayene sonuçları temelinde belirlendi. Sağlıklı 20 köpekten donör özelliği taşıyan (tercihen erkek, >1 yaş, 25-30 kg vücut ağırlığında) 14 köpek sahiplerine bilgilendirilmiş onam formu onaylatılarak çalışmaya alındı. Bunlardan vitamin E + selenyum uygulanan 7 köpek **antioksidan grup**, %0,9 NaCl uygulanan 7 sağlıklı köpek de **kontrol grubu** olarak tanımlandı. Donör olarak kullanılan sağlıklı 14 köpeğe ilaveten diğer 6 köpek de aneminin şiddet ve tipine göre oksidan/antioksidan denge ile ilgili parametrelerin değerlendirilebilmesinde kontrol olarak tutuldu. Donör olarak kullanılan köpeklerin ırk, yaş, cinsiyet dağılımları ve vücut ağırlığı Çizelge 2.1'de gösterildi.

Çizelge 2.1. Donör köpeklerin ırk, yaş ve cinsiyet dağılımları ile vücut ağırlıkları

Grup	İrk	Yaş	Cinsiyet	Vücut ağırlığı (kg)
Antioksidan	Alman Çoban Köpeği	7	♂	26
	Amerikan Mastiff	2	♂	32
	Doberman Pinscher	4	♂	28
	Labrador Retriever	3	♀	25
	Labrador Retriever	4	♂	27
	Melez	5,5	♀	32
	Melez	3	♂	27
Kontrol	Doberman Pinscher	4	♂	27
	Golden Retriever	3	♀	28
	Labrador Retriever	2	♂	25
	Melez	3	♀	26
	Melez	3	♂	26
	Melez	5	♂	28
	Melez	6	♂	26

2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Kan Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmanın birinci bölümünde anemili ve sağlıklı köpeklerden kan örnekleri *Vena cephalica antebrachi*'den 18 G holder iğnesi (Vacutest Kima, İtalya) kullanılarak vakumlu heparinli, EDTA'lı 4 ml (Vacuette, Almanya) ve antikoagülsüz 9 ml şeffaf plastik (Vacuette, Almanya) tüplere bir kez alındı.

Alınan heparinli tam kan örneklerinde aynı gün kan sayımı (RBC, HCT, HGB, WBC, PLT, MCV, MCHC, MCH) otomatik kan sayım cihazında (Abacus Junior Vet 5, Diatron, Macaristan) belirlendi. Retikülosit sayımı, EDTA'lı tam kan örneklerinden New Methylene Blue boyama ile hazırlanan frotilerde mikroskopta manuel olarak gerçekleştirildi (Cowgill ve ark 2003). Heparinli plazma örneklerinde TOS, TAK değerleri ve MDA konsantrasyonu ile eritrosit hemolizatında SOD, GSH-Px, CAT enzimlerinin aktiviteleri ölçümü amacıyla örnekler analiz yapıluncaya kadar -20 °C'de (Derin Dondurucu, Bosch, Almanya) saklandı.

Anemili köpekler aneminin şiddetine göre Tvedten (2010) tarafından bildirilen kriterler dikkate alınarak (Çizelge 2.2) hafif (n=18), orta (n=18) ve şiddetli (n=14) anemik hastalar olarak gruplandırıldı. Elli anemili köpek içerisinde HCT değeri < %13 köpek belirlenmediği için çok şiddetli grup oluşturulmadı. Retikülosit sayısına göre de rejeneratif (n=26) ve nonrejeneratif (n=24) anemili köpekler olarak sınıflandırıldı (Çizelge 2.3). Sağlıklı köpekler ise kontrol (n=20) olarak tutuldu.

Çizelge 2.2. Şiddetine göre anemilerin derecelendirilmesi (Tvedten 2010)

Anemi şiddeti	HCT (%)
Hafif	>30≤ 36
Orta	>20≤ 30
Şiddetli	>13≤ 20
Çok şiddetli	<13

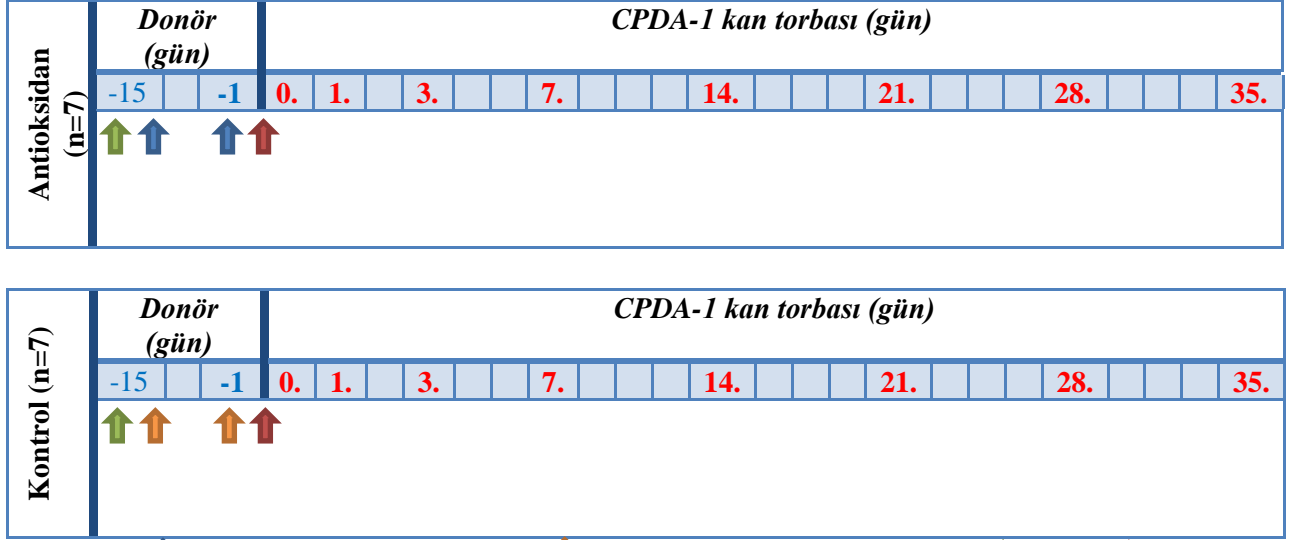
Çizelge 2.3. Absolut retikülosit sayısına göre anemilerin sınıflandırılması (Cowgill ve ark 2003)

Retikülositer yanıt	Absolut retikülosit sayısı ^a	
Normal/Nonrejeneratif^b	<80.000	
Rejeneratif	Hafif	80.000-150.000
	Orta	150.000-300.000
	Şiddetli	>500.000

^a Absolut retikülosit sayısı (/µl)= retikülosit yüzdesi x RBC sayısı (10³/µl)

^b Anemi durumlarında nonrejeneratif olarak değerlendirilir.

Çalışmanın ikinci bölümünde donörlere vitamin E + selenyum uygulamasının CPDA-1 torbalarda +4 °C’de saklanan tam kan kalitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla 14 sağlıklı köpek seçildi. Donör olarak seçilen köpekler iki eşit gruba ayrıldı. Antioksidan grubundaki köpeklere (n=7) 14 gün arayla (-15 ve -1. gün) 2 kez, deri altı yolla, 150 mg vitamin E + 0,5 mg selenyum/20 kg VA (Selen-E-Sol, İnterhas, Türkiye), kontrol grubundaki köpeklere (n=7) ise aynı günlerde eşdeğer hacimde %0,9 NaCl uygulamaları yapıldı. Donörlere anestezi yapılmadan, CPDA-1 solüsyonu içeren plastik torbalara, torbadaki CPDA-1 solüsyonunda orantısal azaltma yapılarak, *Vena jugularis*’den ~ 300 ml tam kan alındı. Bu girişimden önce antioksidan grubu donörlerden -15. gündeki ilk antioksidan, kontrol grubu donörlerden ise aynı hacimde %0,9 NaCl uygulamaları öncesi ile uygulama “**Pre**” ve -1. gündeki ikinci antioksidan ve %0,9 NaCl uygulamaları sonrası “**Post**” olarak tanımlandı. Belirtilen süreçte iki kez *Vena cephalica antebrachi*’den vakumlu 4 ml heparinli tüplere kan örnekleri alındı (Şekil 2.1).



↑ : Antioksidan uygulaması ↑ : %,0,9 NaCl uygulaması ↑ : Pre ↑ : Post

0., 1., 3., 7., 14., 21., 28., 35.: Kan torbasından örnek alımı

Şekil 2.1. Donör köpeklere antioksidan uygulamasının saklanan tam kanın kalitesi üzerine etkileri kapsamında yapılan araştırmanın deneysel dizaynı

Donör köpeklerden tam kan, asepsiyi bozmadan tekrarlanabilir kan örneği alınmasına olanak veren, çift torbalı, 450 ml kan için hazırlanmış 63 ml CPDA-1 içeren (Birsat Çiftli Kan Torbası, BB-02, Birtan Medikal, Ankara, Türkiye) torbalara alındı. CPDA-1 solüsyonunun 100 ml içeriğinde 0,327 g sitrik asit, 2,630 g sodyum sitrat, 0,222 g sodyum bifosfat, 3,190 g dekstroz, 0,0275 g adenin ve enjeksiyonluk su bulunmaktadır. Kan alımından önce torbadaki CPDA-1 solüsyonu vakumlu boş tüpler kullanılarak 21 ml azaltıldı ve donörlerden hassas terazi ile ölçülerek ~ 300 ml kan alındı. Kan torbalarının yalnızca 450 ml kapasiteli ilk torbası ve örnek alımı için oluşturulmuş, vakumlu tüp tutacağı bulunan 15 ml kapasiteli uydu torbası kullanıldı. Plazmanın ayrılması amacıyla bulunan ikinci torba kullanılmadı (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. CPDA-1 içeren kan torbası

CPDA-1 solüsyonu içeren plastik kan torbaları $+4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında (Bosch, Almanya) saklandı. Her bir torbadan hematolojik ve biyokimyasal parametrelerin analizi için 0. ,1. ,3., 7., 14., 21., 28. ve 35. saklama günlerinde, 9 ml vakumlu antikoagülsüz (Vacuette, Almanya) tüplere kan örneği alındı. Alınan sitratlı kan örneği tam kan sayımı için kullanıldıktan sonra santrifüj edilerek plazma TOS, TAK değerleri, MDA, HGB ve K konsantrasyonları ile LDH aktivitesi, hazırlanan eritrosit hemolizati ise SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinin ölçümü amacıyla -20°C 'de saklandı.

Eritrosit hemolizatının hazırlanması

Anemili ve sağlıklı köpeklerden heparinli tüplere, CPDA-1 solüsyonu içeren kan torbalarından ise antikoagülsüz vakumlu tüplere alınan sitratlı kan 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj (Hettich, Almanya) edildi ve plazma kısmı ayrıldı. Altta kalan eritrosit hacmine eşit oranda $+4^{\circ}\text{C}$ 'lik %0.9 NaCl eklenerek yavaşça karıştırıldı ve tüpler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki kısmın atılması ile eritrositlerin yıkanması gerçekleştirildi. Eritrosit yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Elde edilen eritrosit süspansiyonu 300 μl 'lik porsiyonlar halinde Eppendorf tüplerine aktarıldı ve aynı miktarda $+4^{\circ}\text{C}$ distile su ile karıştırılarak elde edilen eritrosit hemolizati analizler gerçekleştirilinceye kadar derin dondurucuda -20°C 'de saklandı (Anonim 2004).

2.3. Laboratuvar Analizleri

2.3.1. Hematolojik Analizler

Araştırmada hematolojik analizler aynı gün içerisinde köpek kanı için de kalibrasyonu ve kontrolü yapılmış otomatik tam kan sayım cihazında (Abacus Junieur Vet 5, Diatron, Macaristan) gerçekleştirildi.

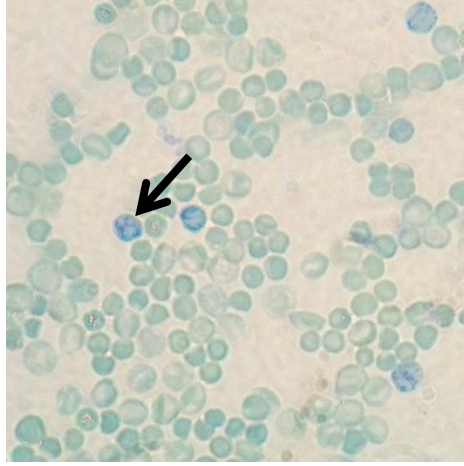
Çalışmanın birinci ve ikinci bölümünde ölçülen hematolojik parametreler ve yöntemleri Çizelge 2.4’de özetlendi.

Çizelge 2.4. Hematolojik analizler ve kullanılan yöntemler

	Parametre	Birim	Örnek	Yöntem	Cihaz
<i>Hematolojik</i>	RBC	$10^{12}/L$	Tam kan	Coulter Counter	Abacus Junieur VET5
	HCT	%	Tam kan	Coulter Counter	
	HGB	g/dL	Tam kan	Kolorimetrik	
	MCV	fL	Tam kan	Coulter Counter	
	MCHC	g/dL	Tam kan	Coulter Counter	
	MCH	Pg	Tam kan	Coulter Counter	
	WBC	$10^9/L$	Tam kan	Coulter Counter	
	PLT	$10^9/L$	Tam kan	Coulter Counter	
	Retikülosit sayısı	%	Tam kan	Manuel	Olympus CX31

Retikülosit sayımı

Retikülositlerin sayımı için New Methylene Blue boyama yöntemi kullanıldı (Cowgill ve ark 2003, Tvedten ve Moritz 2010). Bu amaçla New Methylene Blue ile aynı miktardaki EDTA’lı tam kan karıştırılarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Karışımdan ince yayma preparat hazırlanarak mikroskopta (CX31, Olympus, Japonya) x1000’lik büyütmede RNA partikülleri içeren agregat eritrositler sayıldı (**Şekil 2.3**). En az 1000 eritrosit değerlendirilerek elde edilen retikülosit yüzdesi, eritrosit sayısı ile çarpılarak absolut retikülosit sayısı bulundu (Cowgill ve ark 2003). Anemili köpekler absolut retikülosit sayıları değerlendirilerek nonrejeneratif ve rejeneratif olarak gruplandırıldı (**Çizelge 2.3**).



Şekil 2.3. Retikülosit içerisindeki RNA partiküllerinin New Methylene Blue boyama ile gösterilmesi

2.3.2. Biyokimyasal Analizler

Araştırma kapsamında ölçülen biyokimyasal parametreler ile kullanılan örnek, ölçüm yöntemleri ve cihazlar Çizelge 2.5’te özetlendi. Oksidatif stresin değerlendirilmesi amacıyla yapılan analizlere ait detaylı bilgi ise başlıklar halinde verildi.

Çizelge 2.5. Biyokimyasal analizler ve kullanılan yöntemler

	Parametre	Birim	Örnek	Yöntem	Cihaz
Biyokimyasal	TOS	$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L	Plazma	Kolorimetrik	Sinnowa D280
	TAK	mmol Trolox Equiv./L	Plazma	Kolorimetrik	Sinnowa D280
	MDA	$\mu\text{mol/L}$	Plazma	Kolorimetrik	Shimadzu UV-1601
	SOD	U/g HGB	Eritrosit	Kolorimetrik	Sinnowa D280
	GSH-Px	U/g HGB	Eritrosit	Kolorimetrik	Sinnowa D280
	CAT	U/g HGB	Eritrosit	Kolorimetrik	Shimadzu UV-1601
	HGB	g/dL	Plazma	Kolorimetrik	Sinnowa D280
	K⁺	mmol/L	Plazma	ISE	Sinnowa D360
	LDH	U/L	Plazma	Enzimatik	Sinnowa D280

2.3.2.1. Plazma Total Oksidan Seviye (TOS)

Plazma TOS değeri Rel Assay Diagnostics (RL009, Gaziantep-Türkiye) marka ticari kit kullanılarak otoanalizörde (Sinnowa D280, Çin) gerçekleştirildi. Erel (2005) tarafından belirtilen ölçüm, serum/doku örneklerinde bulunan oksidanların ferröz iyo ortodanisidin kompleksini ferrik iyona oksitlemesi ve ferrik iyonun asidik ortamda kromojen ile mavi-yeşil renkli kompleks oluşturması prensibine dayanmaktadır. Örneklerde bulunan toplam oksidan miktarı ile orantılı olan kompleksin renk yoğunluğu, spektrofotometrik olarak 530 nm dalga boyunda ölçülür. Hidrojen peroksit ile kalibre edilir. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L olarak ifade edilir.

2.3.2.2. Plazma Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Plazma TAK değerinin ölçümü Rel Assay Diagnostics (RL010, Gaziantep-Türkiye) marka ticari kit kullanılarak otoanalizörde (Sinnowa D280, Çin) ölçüldü. Erel (2004) tarafından tanımlanan analiz, serum/doku örneklerinde bulunan antioksidanlar tarafından koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalinin renksiz ABTS formuna redüklenmesi prensibine dayanmaktadır. Antioksidanların miktarlarına ve kapasitelerine bağlı olan ABTS redüksiyonunun derecesi, spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda renk farkından kaynaklanan absorbans değişikliği ile belirlenir. Yöntem, "Trolox ekivalanı" olarak adlandırılan ve vitamin E analogu olan stabil bir antioksidan standart çözelti ile kalibre edilir. Sonuçlar mmol Trolox Equiv./L olarak ifade edilir.

2.3.2.3. Plazma Malondialdehit (MDA)

Plazma MDA konsantrasyonu Yoshiko ve ark (1979) tarafından bildirilen yöntem kullanılarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Japonya) ölçüldü. Bu yöntemin prensibi tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın asidik pH ve sıcak ortamda tepkimesi sonucu oluşan pembe renkli pigmentin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Analiz için örneklerden alınan 250 μl plazma vida kapaklı cam tüplere konuldu, üzerine 1,25 ml %10'luk Triklorasetik asit (TCA) çözeltisinden ilave edilip karıştırılmasını takiben 0,5 ml %0,67'lik TBA eklendi. Kör okuma amacıyla kullanılacak tüpe ise TCA'dan 1,5 ml ve TBA'dan 0,5 ml konuldu. Tüplerin ağızları sıkıca kapatılıp 30 dakika kaynar su banyosunda tutulduktan sonra çeşme suyu altında soğutuldu ve 2 ml n-butanol ilave edilip karıştırılarak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki faz 535 nm'de okundu. Absorbans sonuçları 155,5 kat sayısı ile çarpılarak MDA konsantrasyonu $\mu\text{mol/L}$ cinsinden belirlendi.

2.3.2.4. Eritrosit Süperoksit Dismütaz (SOD)

Eritrosit hemolizatında SOD aktivitesi Randox (Ransod, SD125, İngiltere) marka ticari test kitleri kullanılarak Sinnowa D280 otoanalizörde ölçüldü. Süperoksit dismutazın rolü oksidatif enerji basamağında üretilen toksik O_2^- radikalini H_2O_2 ve moleküler O_2 'ye dismutasyonunu hızlandırmaktır. Bu yöntemde ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak süperoksit radikali 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) ile kırmızı boya formuna dönüştürülür. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür. Deney koşullarında INT redüksiyonunda %50 inhibisyon sağlanması bir ünite SOD olarak ifade edilmektedir (Woolliams ve ark 1983). Enzim aktivitesinin ölçümü, eritrosit hemolizati kullanılarak üretici firma tarafından belirtilen yöntemle uygun şekilde gerçekleştirildi. Aynı zamanda örneklerde HGB düzeyleri belirlenerek, GSH-Px değerleri gr HGB başına (U/g HGB) spesifik aktivite cinsinden verildi.

2.3.2.5. Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Eritrosit hemolizatında GSH-Px aktivitesi Ransel, RS505, İngiltere) marka ticari test kitleri kullanılarak Sinnowa D280 otoanalizörde ölçüldü. Paglia ve Valentine (1967) tarafından geliştirilen yöntemle göre, GSH-Px indirgenmiş glutasyonun kümen hidroperoksit tarafından okside edildiği reaksiyonu katalizler. Ortamda glutasyon redüktaz (GR) ve nikotin adenin dinükleotid fosfat hidrojen (NADPH) var ise yükseltgenmiş glutasyon (GSSG), NADPH'ın NADP'ye oksidasyonu ile GSH'a indirgenir. Enzim aktivitesi, eritrosit hemolizati kullanılarak üretici firma tarafından belirtilen yöntemle uygun şekilde ölçüldü. Aynı zamanda örneklerde HGB düzeyleri belirlenerek, GSH-Px değerleri gr HGB başına (U/g HGB) spesifik aktivite cinsinden verildi.

2.3.2.6. Eritrosit Katalaz (CAT)

Eritrosit hemolizatında CAT enzim aktivitesi Luck ve ark (1965) tarafından bildirilen yöntem kullanılarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-1601, Japonya) gerçekleştirildi. Bu yöntemin prensibi H_2O_2 'nin CAT tarafından O_2 ve H_2O 'ya parçalanması esnasında reaksiyon karışımındaki absorbans değişiminin ölçümü esasına dayanmaktadır. H_2O_2 ışık spektrumunun UV alanında dalga boyunun azalmasıyla artan bir absorpsiyon verir. Uygun bir tampon içinde bulunan H_2O_2 'nin numunede bulunan katalaz enzimi etkisiyle yıkılması sonucu bu maddenin 240 nm'de neden olduğu absorbansta azalma meydana gelir ve bu azalma CAT enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır. H_2O_2 içeren ve içermeyen fosfat tamponu içerisine numune eklenerek 0., 15. ve 30. saniyede 240

nm'de absorbanslar okundu ve logaritmik formülde azalmalar hesaplanarak sonuçlar elde edildi. Katalaz değerleri (U/mL) gerekli dilüsyon faktörleri ile çapılarak, gr HGB başına (U/g HGB) spesifik aktivite cinsinden verildi.

2.4. İstatistiksel Değerlendirme

Gruplarda her örnekleme zamanında hematolojik ve serum biyokimyasal parametrelerinin aritmetik ortalaması (\bar{X}), standart sapması (s) ve minimal-maksimal değerleri (Xmin-Xmax) hesaplandı. Sayısal verilerin dağılımı Kolmogorov–Smirnov veya Shapiro-Wilk testi kullanılarak değerlendirildi. Dağılımı normal olan ve dönüşümden (logaritmik veya karekök) sonra normal dağılım gösteren parametrelerde ikiden fazla grup (aneminin tipi, aneminin şiddetine göre gruplandırma) karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA), post-hoc karşılaştırmada Tukey testi kullanılarak gruplar arası farklar ve belirlenen farkın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığı test edildi. Normal dağılım göstermediği belirlenen parametreler nonparametrik metotlarla analiz edildi. İki gruplu karşılaştırmalarda parametrelerin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi, post-hoc karşılaştırmalar eşleştirilmiş metot kullanılarak gerçekleştirildi. Aneminin şiddeti ve aneminin tipi ile oksidan/antioksidan denge ile ilişkili parametreler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde parametrelerdeki dağılım dikkate alınarak Pearson veya Spearman testi kullanıldı. Korelasyon katsayısı (r veya rho) yüksek ($r > 0.60$), orta ($r = 0.30-0.60$) ve zayıf ($r < 0.30$) olarak değerlendirildi (Kogika ve ark 2014).

Kontrol ve antioksidan uygulanan gruplarda her grupta uygulama öncesi ile sonrası normal dağılım gösteren parametrelerde bağımlı gruplar için *t*-Testi, göstermeyenlerde ise Wilcoxon Testi kullanılarak değerlendirildi. İki grubun (kontrol ve antioksidan) uygulama öncesi ve sonrası parametrelerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren ve göstermeyen parametreler için sırasıyla bağımsız gruplar için *t*-Testi veya Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Kontrol ve antioksidan uygulanan donörlerden kan saklama torbalarına alınan kanda incelenen parametrelerin zaman, uygulama (grup), grup-zaman değişimi, normal dağılım gösteren parametrelerde tekrarlı ölçümler varyans analizi, normal dağılım göstermeyen parametrelerde ise Friedman testi uygulandı. Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden CPDA-1 içerikli torbalara alınan kanda çıkış değerine (0. gün) göre saklama süresince olası değişiklikler için gruplarda 0. gün değerleri ile takibi süreçteki 7 örnekleminin (1, 3, 7, 14, 21, 35. günler) karşılaştırılması yanında aynı örnekleme zamanında (gün) iki grup arasındaki farklar değerlendirildi. Tüm analizlerde olasılık (p

değeri) < 0,05 anlamlı kabul edildi. Oldukça yüksek anlam belirlenen parametrelerde p değeri tabloda p=0.000, metinde ise p<0,001 olarak ifade edildi. Hematolojik bulgular ve oksidan/antioksidan biyobelirteç değerleri çizelge ve şekillerde $\bar{X} \pm s$ olarak sunuldu. Çizelgelerde ayrıca grupların hematolojik parametrelerinin ve oksidan/antioksidan biyobelirteçlerinin (Xmin-Xmax) değerleri gösterildi. İstatistiksel değerlendirmelerde, SPSS 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, ABD) paket programı kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Laboratuvar Bulgular

Çalışmanın laboratuvar bulguları; alt bölüm 3.1.1'de **anemili köpeklerde hematolojik ve biyokimyasal bulgular**, alt bölüm 3.1.2'de de donörlere antioksidan veya %0,9 NaCl uygulamasında ve belirtilen uygulamanın yapıldığı köpeklerden CPDA-1 içeren torbalara alınan kanda +4 °C'de 35 günlük saklama süresince **antioksidan uygulamasının tam kanın kalitesi üzerine etkileri** olarak sunuldu.

3.1.1. Anemili Köpeklerde Hematolojik ve Biyokimyasal Bulgular

Şiddeti ve tipi dikkate alınmaksızın araştırmada değerlendirilen anemili toplam 50 köpeğin hemogram bulguları yanında, oksidan/antioksidan denge ile ilgili biyobelirteç değerleri Çizelge 3.1'de özetlendi. Şiddetine ve tipine göre anemili köpeklerde oksidan/antioksidan denge ile ilgili bulgular da sırasıyla alt bölüm 3.1.1.1 ve 3.1.1.2'de sunuldu.

Çizelge 3.1. Anemili köpeklerde hematolojik bulgular ve oksidan/antioksidan durum

Parametre	Sağlıklı (n=20)	Anemili (n=50)	Gruplar arası fark p=
WBC (x10 ⁹ /L)	10,20 ± 2,80 (6,08-15,67)	15,98 ± 10,85 (0,50-53,32)	0,001 F: 18,92
RBC (x10 ¹² /L)	6,41 ± 0,60 (5,49-7,43)	4,13 ± 1,05 (2,18-6,28)	0,000
HGB (g/dL)	14,77 ± 1,93 (12,10-17,90)	8,97 ± 2,46 (4,80-15)	0,000
HCT (%)	43,32 ± 4,90 (37,23-53,80)	26,40 ± 6,47 (15,16-35,99)	0,000
MCV (fL)	65,70 ± 2,97 (61-70)	64,22 ± 5,30 (51-79)	0,145
MCH (pg)	22,87 ± 0,99 (20,70-24,60)	21,68 ± 2,83 (16,00-35,80)	0,002
MCHC (g/dL)	34,51 ± 1,18 (32,20-36,10)	33,13 ± 2,98 (16,90-37,70)	0,014
PLT (x10 ⁹ /L)	356 ± 91 (201-495)	301 ± 256 (1-818)	0,119
Retikulosit (hücre/μL)	47341 ± 2164 (23840-11880)	89256 ± 54453 (6280-226200)	0,001
Oksidan/antioksidan durum			
TOS (μmol H ₂ O ₂ Equiv./L)	4,27 ± 0,86 (3,17-6,39)	6,88 ± 1,96 (3,98-14,59)	0,000
TAK (mmol Trolox Equiv./L)	0,74 ± 0,08 (0,61-0,96)	0,88 ± 0,14 (0,39-1,29)	0,000
MDA (μmol/L)	16,04 ± 5,24 (4,20-25,35)	20,85 ± 9,55 (9,17-72,00)	0,011
SOD (U/g HGB)	816,77 ± 87,19 (613,33-967,10)	896,82 ± 200,66 (460-1340)	0,107
GSH-Px (U/g HGB)	472,43 ± 7 (335,52-617,38)	422,05 ± 108,37 (282,40-723)	0,038
CAT (U/g HGB)	6,07 ± 2,20 (2,23-10,47)	5,07 ± 2,29 (1,12-9,94)	0,100

Çizelge 3.1’de görüldüğü üzere, sağlıklı köpeklere göre anemili 50 köpeğin ortalama veya ortanca TOS ve TAK değerleri ve MDA konsantrasyonunun önemli düzeyde yüksek, GSH-Px aktivitesinin düşük olduğu, eritrosit SOD ve CAT aktivitelerinin ise gruplar arası farklarının istatistiksel anlamlı olmadığı belirlendi.

Elli anemili köpeğin anemi laboratuvar tanı parametreleri (HCT, RBC, HGB) ve retikulosit sayısı ile oksidan/antioksidan biyobelirteçler arasındaki ilişkiler, verilerin dağılımları dikkate alınarak Pearson veya Spearman Korelasyon Testi ile değerlendirildi. Buna göre, RBC sayısı ile eritrosit GSH-Px arasında negatif bir ilişki belirlenirken diğer değişkenler arasındaki ilişkilerin istatistiksel anlamlı olmadığı saptandı (Çizelge 3. 2.).

Çizelge 3.2. Köpeklerde anemi laboratuvar tanı parametreleri (HCT, RBC, HGB) ve retikulosit sayısı ile oksidan/antioksidan biyobelirteçler arasındaki korelasyon (n=50)

		TOS	TAK	MDA	SOD	GSH-Px	CAT
HCT	r	,073	,097	-,017	-,034	-,219	,078
	p	,613	,504	,905	,817	,127	,590
RBC	rho	-,021	,093	-,114	-,106	-,280*	,036
	p	,885	,521	,432	,462	,049	,802
HGB	r	,037	,096	-,011	-,036	-,187	,037
	p	,799	,508	,940	,806	,193	,799
Retikulosit sayısı	r	-,053	-,078	-,113	,091	,071	,115
	p	,714	,593	,433	,531	,623	,426

* p<0,05

3.1.1.1. Aneminin şiddetine göre oksidan/antioksidan durum

Araştırmanın ilk bölümünde anemili köpeklerde oksidatif stresin değerlendirilmesine yönelik olarak köpekler aneminin şiddetine göre hafif, orta ve şiddetli anemik olarak üç alt gruba ayrıldı. Hafif, orta ve şiddetli anemili köpeklerin verileri sağlıklı köpekler ile karşılaştırıldı. Sağlıklı grup ile aneminin şiddetine göre gruplandırılan köpeklerin hematolojik bulguları ve oksidan/antioksidan durum Çizelge 3.3’de gösterildi.

Şiddetine göre gruplandırılan anemili köpeklerde gruplar arasında istatistik anlamlı farklılıklar belirlenen bazı hematolojik parametreler (MCH, PLT, retikulosit sayısı) ile oksidan/antioksidan durum biyobelirteçleri (TOS, TAK, GSH-Px) Şekil 3.1-3.6’da sunuldu.

Çizelge 3.3. Köpeklerde aneminin şiddetine göre hematolojik bulgular ve oksidan/antioksidan durum

Parametre	Sağlıklı (n=20)	Anemi şiddeti			Gruplar arası fark p=
		Hafif (n=18)	Orta (n=18)	Şiddetli (n=14)	
WBC (x10 ⁹ /L)	10,20 ± 2,80 (6,08-15,67)	17,78 ± 9,04 (3,50-33,52)	12,64 ± 8,53 (2,19-33,16)	17,96 ± 14,75 (0,05-53,32)	0,054 χ ² : 7,62
RBC (x10 ¹² /L)	6,41 ± 0,60 (5,49-7,43)	5,23 ± 0,49 (4,60-6,28)	4,05 ± 0,41 (3,39-4,85)	2,83 ± 0,34 (2,18-3,24)	
HGB (g/dL)	14,77 ± 1,93 (12,10-17,90)	11,27 ± 0,93 (10-13)	8,98 ± 1,82 (7-15)	5,99 ± 0,67 (4,80-7,10)	
HCT (%)	43,32 ± 4,90 (37,23-53,80)	33,25 ± 1,60 (31,27-35,99)	26,17 ± 2,57 (21,39-29,98)	17,87 ± 1,53 (15,16-19,55)	
MCV (fL)	65,70 ± 2,97 (61-70)	64,16 ± 4,78 (51-71)	64,66 ± 3,91 (56-71)	63,71 ± 7,44 (51-79)	0,375 χ ² : 3,10
MCH (pg)	22,87 ± 0,99 ^a (20,70-24,60)	21,61 ± 1,62 ^b (18,20-23,80)	21,53 ± 1,76 ^b (18,10-25,40)	21,97 ± 4,75 ^b (16-35,80)	0,021 χ ² : 9,74
MCHC (g/dL)	34,51 ± 1,18 (32,20-36,10)	33,72 ± 1,81 (30-36,50)	33,31 ± 1,95 (30-37,70)	32,15 ± 4,77 (16,90-36,80)	0,065 χ ² : 7,32
PLT (x10 ⁹ /L)	356 ± 91 ^a (201-495)	405 ± 264 ^a (1-818)	285 ± 215 ^{a,b} (1-680)	186 ± 257 ^b (1-679)	0,020 χ ² : 9,87
Retikulosit (hücre/μL)	47341 ± 2164 ^a (23840-11880)	111796 ± 5356 ^b (35340-211680)	90261 ± 5528 ^a (8700-226200)	58982 ± 4165 ^a (6280-152600)	0,001 F: 6,70
Oksidan/antioksidan durum					
TOS (μmol H ₂ O ₂ Equiv./L)	4,27 ± 0,86 ^a (3,17-6,39)	7,05 ± 2,51 ^b (3,98-14,59)	6,87 ± 1,97 ^b (4,02-11,42)	6,69 ± 1,04 ^b (4,91-8,31)	0,000 F: 10,68
TAK (mmol Trolox Equiv./L)	0,74 ± 0,08 ^a (0,61-0,96)	0,88 ± 0,13 ^b (0,68-1,29)	0,92 ± 0,13 ^b (9,17-72)	0,82 ± 0,15 ^a (0,39-1,06)	0,000 χ ² : 20,84
MDA (μmol/L)	16,04 ± 5,24 (4,20-25,35)	19,88 ± 7,07 (10,11-40,43)	22,01 ± 13,15 (9,17-72)	20,61 ± 6,98 (10,11-38,88)	0,077 χ ² : 6,85
SOD (U/g HGB)	816,77 ± 87,19 (613,33-967,10)	853,22 ± 201,32 (587-1340)	945,05 ± 212,40 (648-1310)	890,85 ± 184,08 (460-1324)	0,154 F: 1,81
GSH-Px (U/g HGB)	472,43 ± 7 ^a (335,52-617,38)	400,47 ± 123,8 ^b (282,40-723)	405,80 ± 99,0 ^b (289,60-561,40)	470,68 ± 88,4 ^a (331-639)	0,021 χ ² : 9,73
CAT (U/g HGB)	6,07 ± 2,20 (2,23-10,47)	5,44 ± 2,46 (1,39-9,94)	5,06 ± 2,09 (2,13-9,50)	4,60 ± 2,39 (1,12-9,09)	0,294 F: 1,26

* Aynı satırda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır.

F: ANOVA testi; χ²: Kruskal Wallis testi.

Köpekler HCT değeri kullanılarak (Çizelge 2.2) aneminin şiddetine göre gruplandırıldı. Bu nedenle, HCT değeri ve ilişkili olan RBC sayısı ile HGB konsantrasyonunun gruplar arası farkı istatistiksel olarak incelenmesine rağmen değerlendirilmeye alınmadı.

MCH değeri ile PLT ve retikulosit sayılarının gruplar arası farkının anlamlı olduğu, incelenen diğer hematolojik parametrelerin (WBC, MCV, MCHC) ise gruplar arası farkının istatistiksel anlamlı olmadığı saptandı. MCH değerinin sağlıklı gruba göre, hafif (p<0,05), orta (p<0,001) ve şiddetli anemi (p<0,05) gruplarında düşük olduğu belirlendi.

PLT sayısı şiddetli anemili grupta, hafif anemili ve sağlıklı gruba göre $p<0,001$ düzeyinde düşük bulundu. Absolut retikulosit sayısı sağlıklı gruba göre hafif anemili grupta yüksek ($p<0,001$) bulundu. Anemili gruplar arasında ise hafif anemili gruba göre orta ve şiddetli anemili grupta düşük ($p<0,001$) belirlendi (Çizelge 3.3).

Aneminin şiddetine göre gruplandırılan köpeklerin araştırma kapsamında değerlendirilen oksidan/antioksidan denge ile ilgili biyobelirteçlerden TOS ve TAK değerleri ile GSH-Px aktivitesinin gruplar arası farkının istatistiksel anlamlı olduğu görüldü. Bu kapsamda, plazma TOS değeri sağlıklı gruba göre, hafif, orta ve şiddetli anemili gruplarda yüksek ($p<0,001$) bulunurken, anemi grupları arasında farkların istatistiksel anlamlı olmadığı belirlendi. Plazma TAK değeri sağlıklı gruba göre, hafif ve orta anemili köpeklerde yüksek ($p<0,001$) bulundu. Eritrosit GSH-Px aktivitesi ise sağlıklı gruba göre hafif ve orta anemili gruplarda düşük ($p<0,05$) bulunurken, hafif ve orta anemili grupta değer şiddetli anemili gruba göre $p<0,05$ düzeyinde düşük saptandı (Çizelge 3.3).

HCT değeri dikkate alınarak aneminin şiddetine göre gruplandırılan köpeklerin laboratuvar tanı parametreleri (HCT, RBC, HGB) ile oksidan/antioksidan biyobelirteçler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde hafif anemili grupta HCT değeri ile TOS arasında negatif ($p<0,05$) ilişki saptanırken, diğer değişkenler arasındaki ilişkilerin istatistiksel anlamlı olmadığı belirlendi (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Aneminin şiddetine göre anemi laboratuvar tanı parametreleri (HCT, RBC, HGB) ile oksidan/antioksidan biyobelirteçler arasındaki korelasyon

Anemi şiddeti	Parametreler		TOS	TAK	MDA	SOD	GSH-Px	CAT
Hafif (HCT>30-≤36)	HCT	rho	-,527*	-,189	-,283	,424	-,094	-,176
		p	,025	,453	,255	,079	,711	,484
	RBC	r	,017	,288	,229	,151	-,026	-,283
		p	,948	,247	,360	,549	,919	,255
	HGB	r	-,240	-,042	-,170	,396	-,114	-,229
		p	,337	,869	,500	,104	,653	,361
Orta (HCT >20-≤30)	HCT	r	,331	-,307	,183	,084	,037	-,288
		p	,179	,215	,468	,740	,883	,246
	RBC	r	,436	-,318	,276	,061	-,070	-,348
		p	,071	,198	,267	,810	,782	,158
	HGB	r	,092	-,124	,084	-,092	,166	-,193
		p	,716	,623	,741	,717	,511	,444
Şiddetli (HCT>13-≤20)	HCT	r	-,295	-,402	-,087	-,132	,427	-,402
		p	,306	,154	,768	,652	,128	,751
	RBC	r	-,044	-,026	,179	-,080	,248	-,026
		p	,880	,930	,541	,785	,393	,859
	HGB	r	-,270	-,321	,036	,017	,250	-,321
		p	,350	,263	,902	,955	,389	,601

* p<0,05

3.1.1.2. Aneminin tipine göre oksidan/antioksidan durum

Aneminin tipine göre oksidatif stresin değerlendirilmesinde köpekler retikülosit sayılarına göre (izelge 2.3) rejeneratif ve nonrejeneratif anemili olarak iki alt gruba ayrıldı. Rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerin verileri sağlıklı köpekler ile karşılaştırıldı. Sağlıklı grup ile rejenerasyon kapasitesine göre gruplandırılan köpeklerin hematolojik bulguları ve oksidan/antioksidan durumu izelge 3.5’de gösterildi.

Tipine göre gruplandırılan anemili köpeklerde gruplar arasında istatistik anlamlı farklılıklar belirlenen hematolojik parametreler (WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, PLT) ve oksidan/antioksidan durum biyobelirteçleri (TOS, TAK, MDA, GSH-Px) Şekil 3.7-3.18’de sunuldu.

Çizelge 3.5. Köpeklerde aneminin tipine göre hematolojik bulgular ve oksidan/antioksidan durum

Parametre	Sağlıklı (n=20)	Anemi tipi		Gruplar arası fark p=
		Rejeneratif (n=26)	Nonrejeneratif (n=24)	
WBC (x10 ⁹ /L)	10,20 ± 2,80 ^a (6,08-15,67)	18,89 ± 8,98 ^b (2,19-33,52)	12,83 ± 11,97 ^a (0,05-53,32)	0,001 χ^2 : 13,11
RBC (x10 ¹² /L)	6,41 ± 0,60 ^a (5,49-7,43)	4,25 ± 1,09 ^b (2,18-5,88)	4,01 ± 1 ^b (2,71-6,28)	0,000 F: 41,37
HGB (g/dL)	14,77 ± 1,93 ^a (12,10-17,90)	9,64 ± 2,53 ^b (5-15)	8,24 ± 2,20 ^c (4,80-12,40)	0,000 F: 49,20
HCT (%)	43,32 ± 4,90 ^a (37,23-53,80)	27,99 ± 6,23 ^b (15,23-35,97)	24,67 ± 6,40 ^c (15,16-35,99)	0,000 F: 59,74
MCV (fL)	65,70 ± 2,97 ^a (61-70)	66,76 ± 4,55 ^a (60-79)	61,45 ± 4,69 ^b (51-68)	0,000 χ^2 : 15,46
MCH (pg)	22,87 ± 0,99 ^a (20,70-24,60)	22,77 ± 3,15 ^a (18,50-35,80)	20,50 ± 1,85 ^b (16-22,90)	0,000 χ^2 : 19,44
MCHC (g/dL)	34,51 ± 1,18 ^a (32,20-36,10)	32,90 ± 3,86 ^b (16,90-37,70)	33,39 ± 1,61 ^b (30,70-36,80)	0,047 χ^2 : 6,10
PLT (x10 ⁹ /L)	356 ± 91 ^a (201-495)	363 ± 249 ^a (1-818)	234 ± 251 ^b (1-734)	0,033 χ^2 : 6,84
Retikulosit (/µL)	47341 ± 21643 (23840-11880)	129916 ± 42037 (81280-226200)	45206 ± 22419 (6280-77760)	
Oksidan/antioksidan durum				
TOS (µmol H ₂ O ₂ Equiv./L)	4,27 ± 0,86 ^a (3,17-6,39)	6,80 ± 1,76 ^b (4,44-11,42)	6,97 ± 2,19 ^b (3,98-14,59)	0,000 F: 25,40
TAK (mmol Trolox Equiv./L)	0,74 ± 0,08 ^a (0,61-0,96)	0,86 ± 0,09 ^b (0,65-1,06)	0,90 ± 0,18 ^b (0,39-1,29)	0,000 χ^2 : 18,28
MDA (µmol/L)	16,04 ± 5,24 ^a (4,20-25,35)	19,41 ± 11,29 ^a (10,11-72)	22,41 ± 7,13 ^b (9,17-40,43)	0,003 χ^2 : 11,73
SOD (U/g HGB)	816,77 ± 87,19 (613,33-967,10)	907 ± 192 (587-1340)	884,79 ± 212,99 (460-1324)	0,218 F: 1,55
GSH-Px (U/g HGB)	472,43 ± 79 ^a (335,52-617,38)	439 ± 111,79 ^{a,b} (289,6-723)	403,50 ± 103,65 ^b (282,40-639)	0,048 F: 3,18
CAT (U/g HGB)	6,07 ± 2,20 (2,23-10,47)	5,16 ± 1,96 (2,13-9,68)	4,97 ± 2,64 (1,12-9,94)	0,252 F: 1,40

*Aynı satırda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki fark anlamlıdır.

F: ANOVA testi; χ^2 : Kruskal Wallis testi.

Aneminin tiplendirilmesi ve gruplandırılması retikulosit sayısına göre yapıldığı için, retikulosit sayısının gruplar arası farklılıkları değerlendirilmedi.

İncelenen hematolojik parametrelerden WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC ve PLT değerlerinin gruplar arası farklarının anlamlı olduğu belirlendi. WBC sayısı rejeneratif grupta sağlıklı ve nonrejeneratif gruba göre yüksek (p<0,01) bulundu. RBC sayısı sağlıklı gruba göre rejeneratif ve nonrejeneratif grupta düşük (p<0,001) olduğu belirlendi. HGB konsantrasyonu ve HCT değeri sağlıklı gruba göre rejeneratif ve

nonrejeneratif gruplarda düşük ($p<0,001$) bulunurken, değerlerin nonrejeneratife göre rejeneratif grupta yüksek ($p<0,05$) olduğu görüldü. MCV ve MCH değerleri nonrejeneratif grupta sağlıklı ve rejeneratif gruba göre düşük ($p<0,001$) bulundu. MCHC değerinin sağlıklı gruba göre nonrejeneratif ve rejeneratif gruplarda düşük ($p<0,05$) olduğu saptandı. PLT sayısının ise nonrejeneratif grupta sağlıklı ve rejeneratif gruplara göre düşük ($p<0,05$) olduğu belirlendi (Çizelge 3.5).

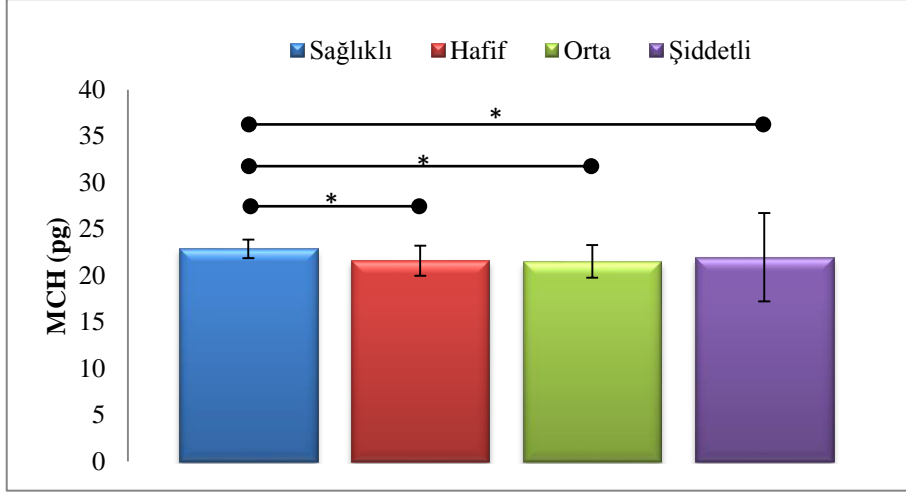
Aneminin tipine göre gruplandırılan köpeklerde oksidan/antioksidan durum ile ilgili biyobelirteçlerden TOS ve TAK değerleri, MDA konsantrasyonu ve GSH-Px aktivitesinin gruplar arası farklarının istatistiksel anlamlı olduğu saptandı. Plazma TOS ve TAK değerleri sağlıklı gruba göre, rejeneratif ve nonrejeneratif gruplarda yüksek ($p<0,001$) bulundu. Plazma MDA konsantrasyonunun ise nonrejeneratif grupta sağlıklı ($p<0,001$) ve rejeneratif gruba göre yüksek ($p<0,05$) olduğu belirlendi. Eritrosit GSH-Px aktivitesi sağlıklı gruba göre, nonrejeneratif grupta düşük ($p<0,05$) olduğu, eritrosit SOD ve CAT aktivitesinin ise aneminin tipine göre gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılıklar göstermediği görüldü (Çizelge 3.5).

Retikulosit sayısı dikkate alınarak 2 gruba ayrılan anemili köpeklerde, nonrejeneratif anemi grubunda anemi laboratuvar tanı parametreleri (HCT, RBC, HGB) ile eritrosit GSH-Px aktivitesi arasında negatif ($p<0,01$) ilişkilere belirlenirken, söz konusu grupta diğer değişkenler arasında, rejeneratif anemili grupta ise tüm laboratuvar tanı parametreleri ve retikulosit sayısı ile oksidan/antioksidan biyobelirteçler arasındaki ilişkilere istatistiksel anlamlılıktaki olmadığı görüldü (Çizelge 3.6).

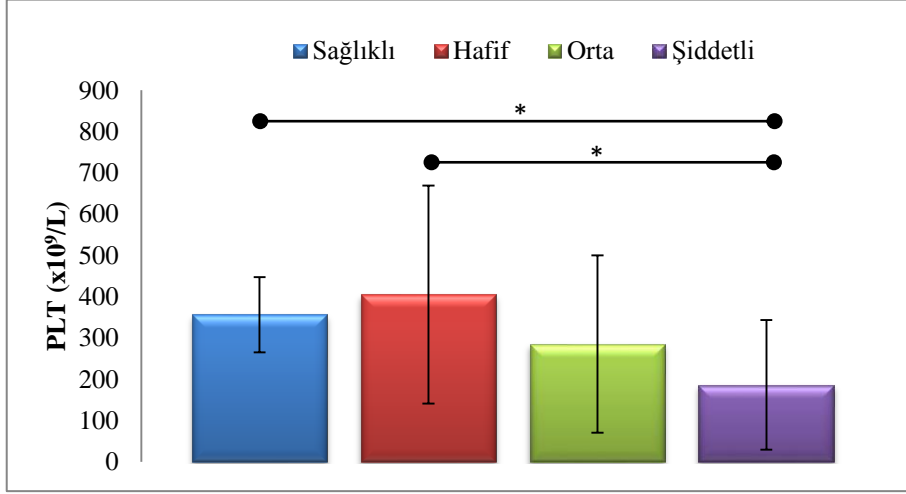
Çizelge 3.6. Retikulosit sayısı ve anemi laboratuvar tanı parametreleri (HCT, RBC, HGB) ile oksidan/antioksidan biyobelirteçler arasındaki korelasyon

Anemi tipi	Parametreler		TOS	TAK	MDA	SOD	GSH-Px	CAT
Rejeneratif (>80.000/μl)	Retikulosit sayısı	r	-,006	,138	,006	,101	,000	,116
		p	,979	,502	,977	,622	1,000	,573
	HCT	r	,039	,059	-,016	,096	-,042	,226
		p	,849	,776	,938	,641	,838	,267
	RBC	r	,062	,036	,021	,053	-,040	,205
		p	,764	,863	,919	,797	,847	,315
	HGB	r	,018	,132	-,002	,057	-,032	,145
		p	,932	,521	,991	,782	,878	,478
Nonrejeneratif (<80.000/μl)	Retikulosit sayısı	r	-,078	-,117	,056	,033	-,320	,199
		p	,717	,587	,794	,877	,127	,352
	HCT	rho	-,068	,062	,066	-,239	-,577**	,006
		p	,753	,774	,759	,260	,003	,977
	RBC	rho	-,067	,177	,039	-,215	-,580**	-,068
		p	,754	,409	,857	,312	,003	,753
	HGB	rho	-,112	,063	,078	-,197	-,590**	-,034
		p	,603	,771	,718	,356	,002	,875

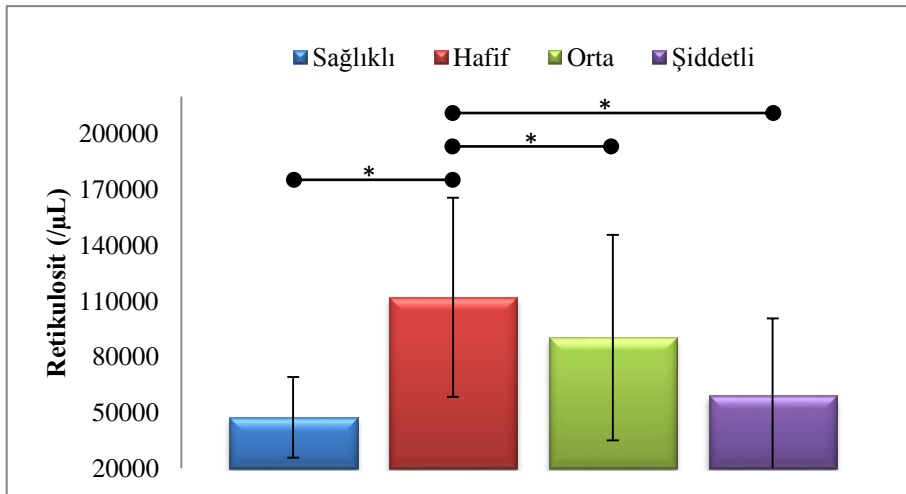
** p<0,01



Şekil 3.1. Sağlıklı ile hafif, orta ve Şiddetli anemili köpeklerde MCH değerleri

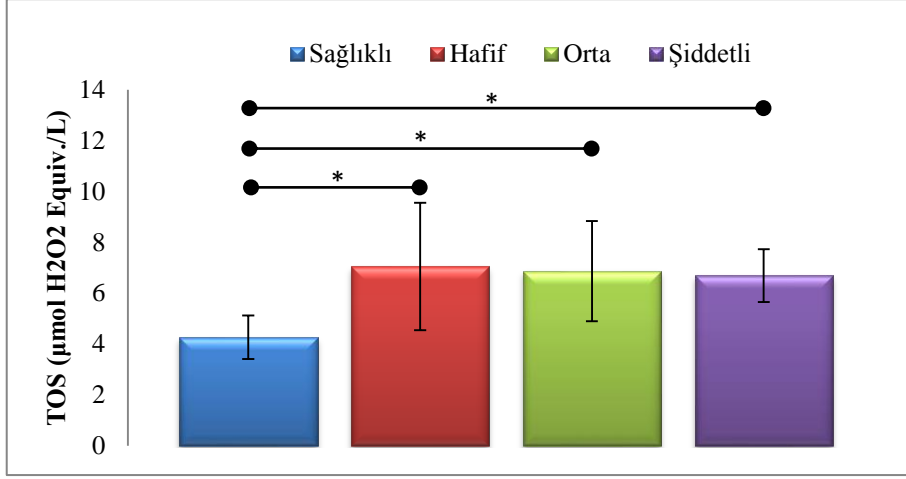


Şekil 3.2. Sağlıklı ile hafif, orta ve Şiddetli anemili köpeklerde PLT sayıları

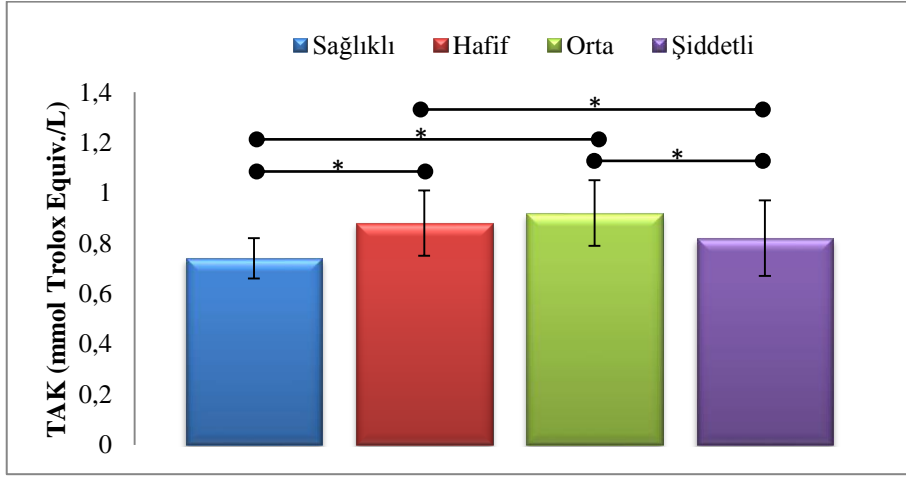


Şekil 3.3. Sağlıklı ile hafif, orta ve Şiddetli anemili köpeklerde retikulosit sayıları

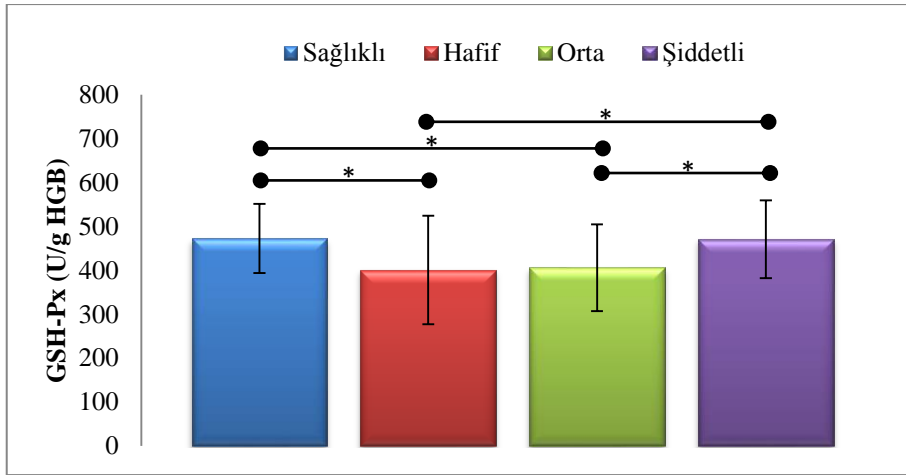
*Şekil 3.1-3.3'de gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılıklar bağlantı çizgisi ve yıldız ile gösterildi.



Şekil 3.4. Sağlıkli ile hafif, orta ve şiddetli anemili köpeklerde plazma TOS değerleri

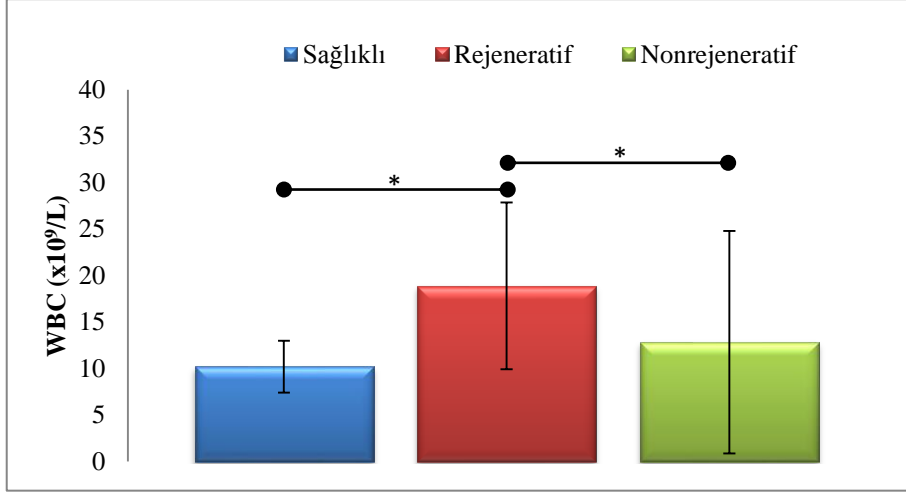


Şekil 3.5. Sağlıkli ile hafif, orta ve şiddetli anemili köpeklerde plazma TAK değerleri

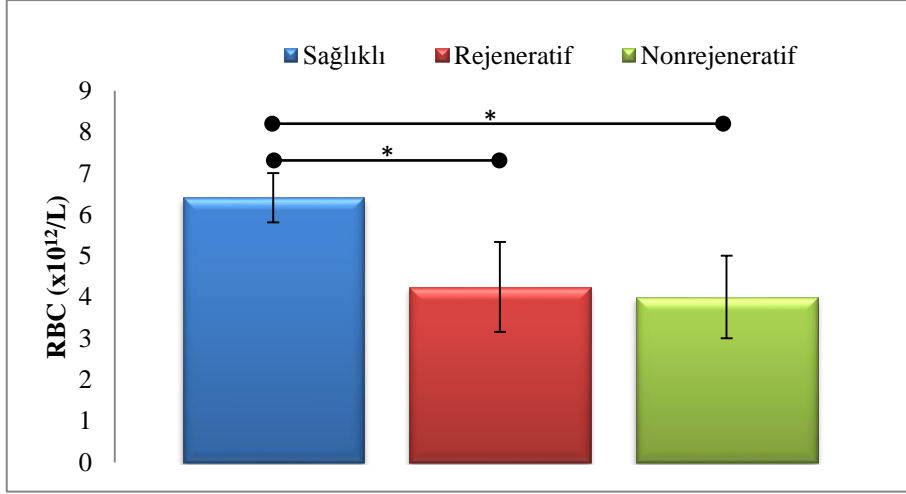


Şekil 3.6. Sağlıkli ile hafif, orta ve şiddetli anemili köpeklerde eritrosit GSH-Px aktiviteleri

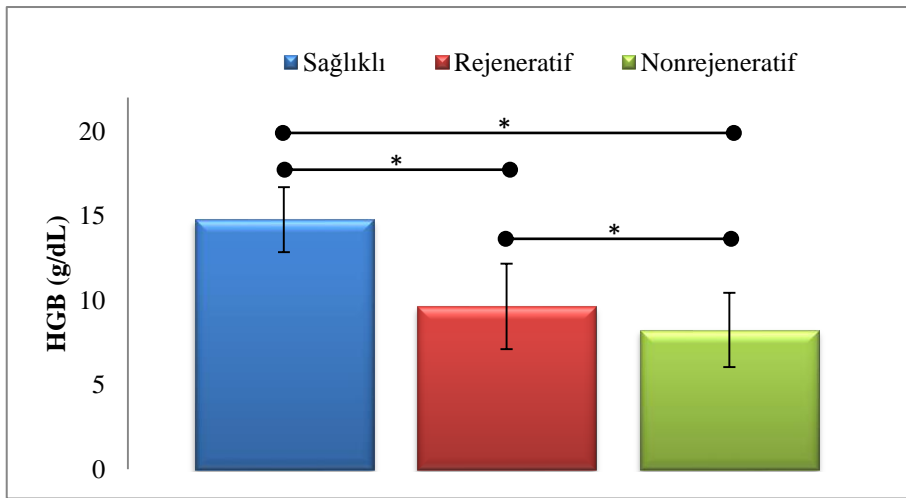
*Şekil 3.4-3.6'da gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılıklar bağlantı çizgisi ve yıldız ile gösterildi.



Şekil 3.7. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde WBC sayıları

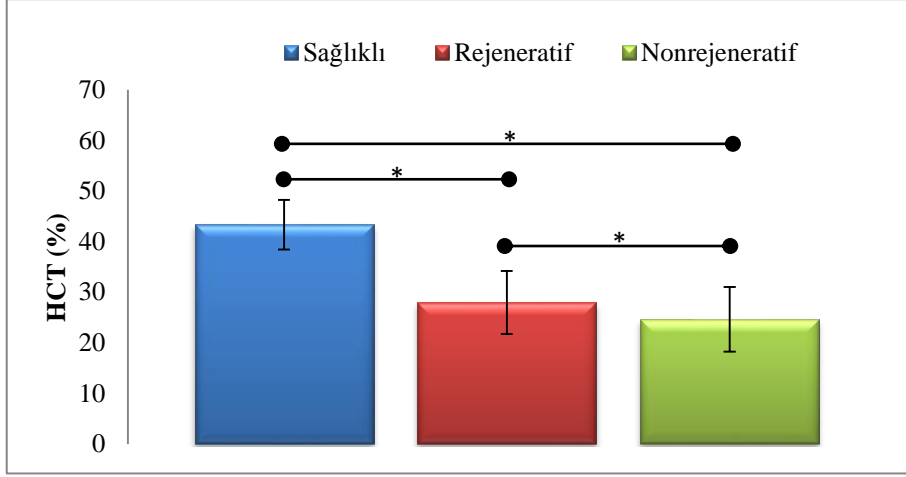


Şekil 3.8. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde RBC sayıları

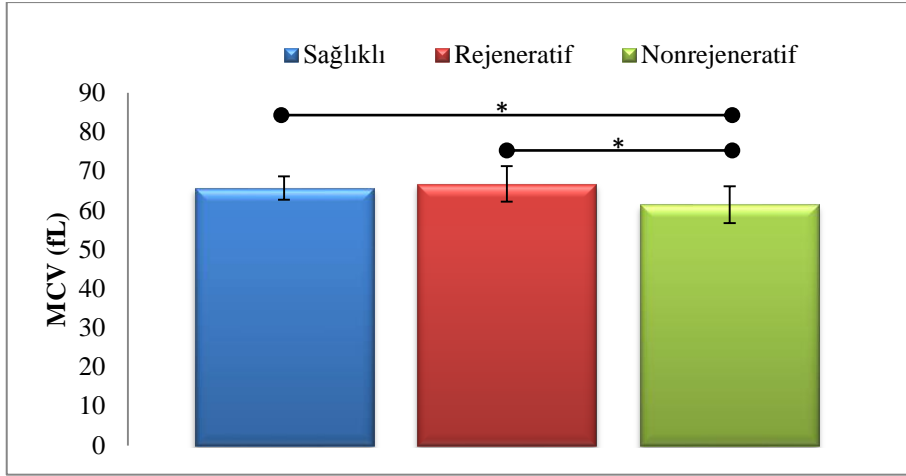


Şekil 3.9. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde HGB konsantrasyonları

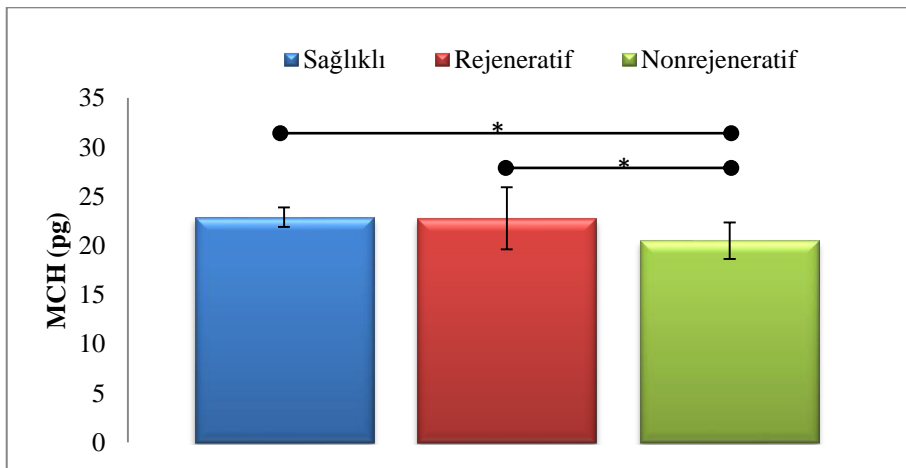
**Şekil 3.7-3.9'da gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılıklar bağlantı çizgisi ve yıldız ile gösterildi.*



Şekil 3.10. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde HCT değerleri

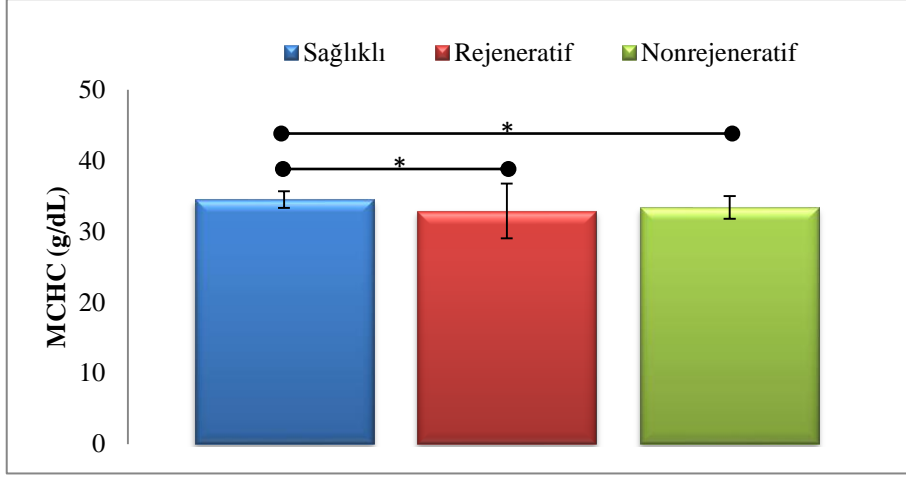


Şekil 3.11. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde MCV değerleri

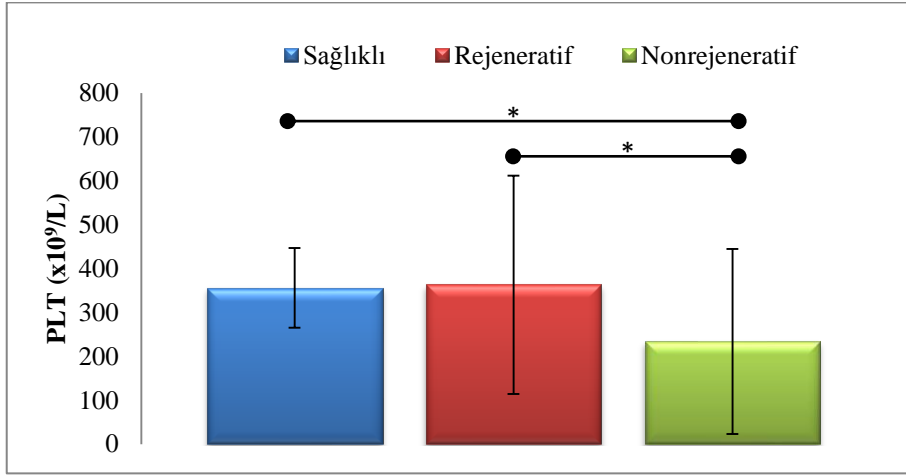


Şekil 3.12. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde MCH değerleri

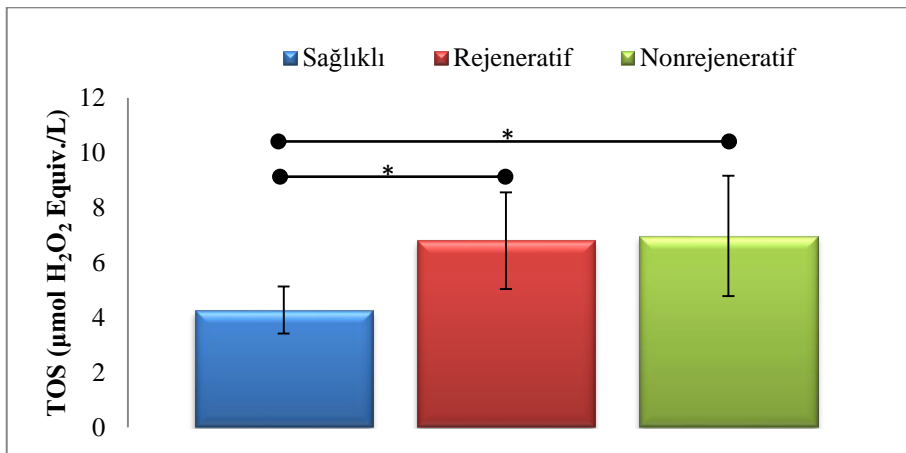
*Şekil 3.10-3.12'de gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılıklar bağlantı çizgisi ve yıldız ile gösterildi.



Şekil 3.13. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde MCHC değerleri

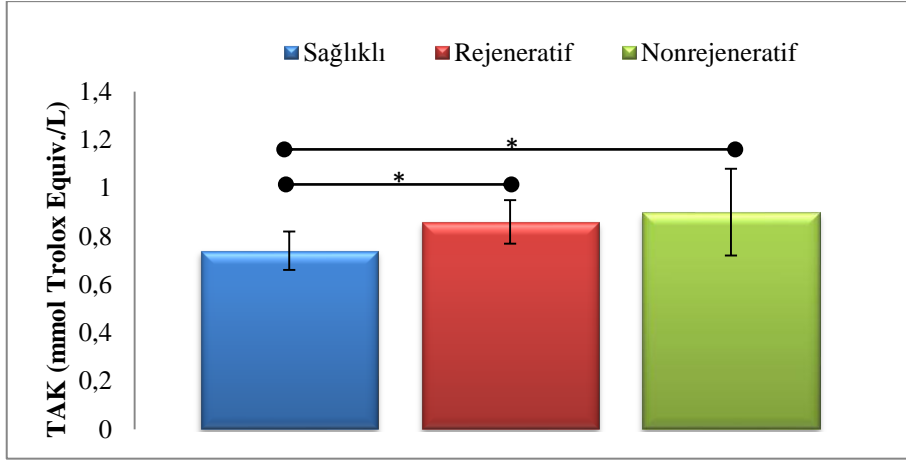


Şekil 3.14. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde PLT sayıları

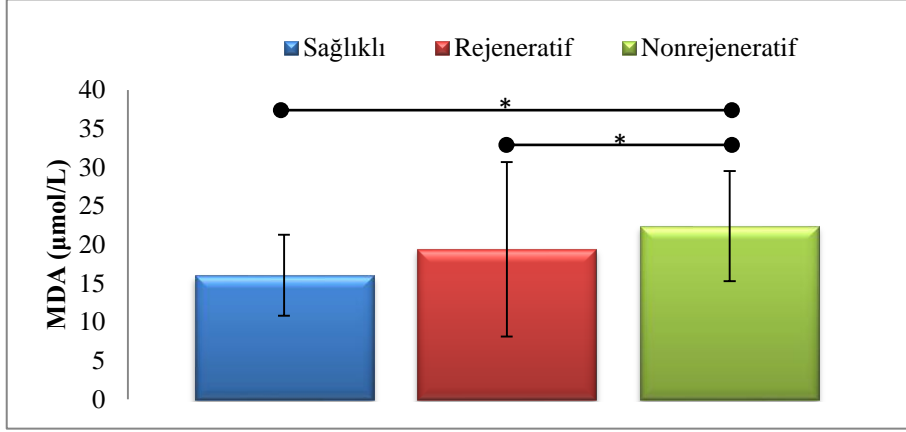


Şekil 3.15. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde plazma TOS değerleri

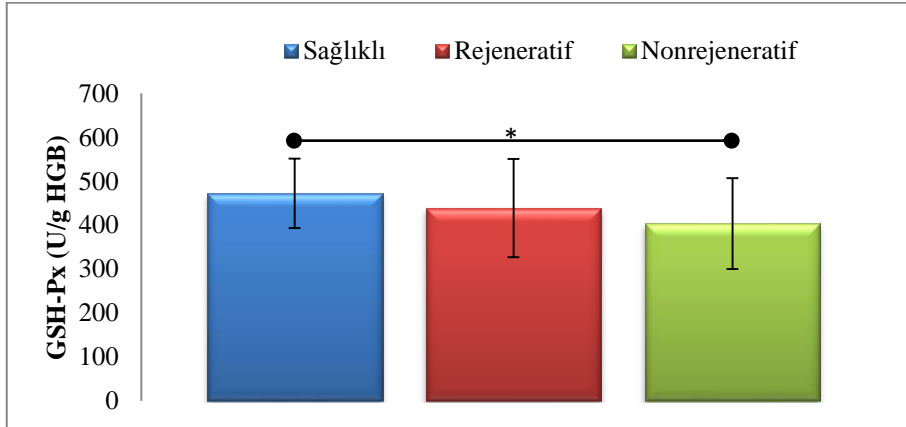
*Şekil 3.13-3.15'de gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılıklar bağlantı çizgisi ve yıldız ile gösterildi.



Şekil 3.16. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde plazma TAK değerleri



Şekil 3.17. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde plazma MDA konsantrasyonları



Şekil 3.18. Sağlıklı ile rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde eritrosit GSH-Px aktiviteleri

*Şekil 3.16-3.18'de gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılıklar bağlantı çizgisi ve yıldız ile gösterildi.

3.1.2. Antioksidan Uygulamasının Tam Kanın Kalitesi Üzerine Etkileri

Araştırmanın ikinci bölümünde antioksidan uygulanmasının saklanan tam kanın kalitesi üzerine etkileri değerlendirildi. Bu kapsamda donör köpeklere iki hafta arayla 2 kez (-15. gün “pre”; -1. gün “post”) sc. 150 mg vitamin E + 0,5 mg selenyum/20 kg VA (antioksidan grup) veya eş değer hacimde %0,9 NaCl solüsyonu uygulamasının (kontrol grubu) hematolojik parametrelere etkileri alt bölüm 3.1.2.1’de, hemolizle ilgili parametrelere etkileri alt bölüm 3.1.2.2’de, oksidan/antioksidan duruma etkileri ise alt bölüm 3.1.2.3’de sunuldu.

Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden CPDA-1 içerikli kan torbalarına kan alımını takiben 2-4 saatlik ilk saklama süresinde kandaki olası değişimleri belirlemek amacı ile köpeklerden heparinli tüpler (post) ile CPDA-1 içerikli kan torbalarına alınarak +4 °C’de saklanan kan örneklerinde (0. gün) ölçülen değerler karşılaştırıldı. Söz konusu değerlendirme sonuçları Çizelge 3.7-3.10’da gösterilmektedir.

Antioksidan veya %0,9 NaCl solüsyonu uygulanan donör köpeklerden CPDA-1 içerikli kan torbalarına alınarak saklanan tam kanda incelenen hematolojik ve biyokimyasal parametrelere uygulama (grup), zaman ve grup x zaman ilişkisinin değerlendirme sonuçları (tekrarlı ölçümlü varyans analizi) Çizelge 3.7-3.10’da özetlendi. Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden CPDA-1 içerikli kan torbalara alınan kanda 0. güne göre saklama süresince her bir örnekleme zamanındaki değişiklikler ile 8 örneklemede (0., 1., 3., 7., 14., 21., 28. ve 35. gün) aynı örnekleme zamanında iki grup arasındaki farklar da Şekil 3.19-3.33’te sunuldu.

3.1.2.1. Antioksidan uygulamasının donörlerde ve saklanan tam kanda hemograma etkileri

Araştırmanın ikinci bölümü, antioksidan uygulanmasının saklanan tam kanın kalitesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesine yönelik gerçekleştirildi. Bu kapsamda donör köpeklere iki hafta arayla 2 kez (-15. gün “pre”; -1. gün “post”) 150 mg vitamin E + 0,5 mg selenyum/20 kg VA (antioksidan grup) veya eş değer hacimde %0,9 NaCl solüsyonu uygulamasının (kontrol grubu) hemograma etkileri Çizelge 3.7 (I ve II)’de sunuldu.

Çizelge 3.7. Antioksidan uygulamasının donör ve saklanan tam kan hemogramına etkileri (I)

Parametre	Grup	Zaman (gün)									
		Donör		CPDA-1 içerikli kan torbasında saklama süresi							
		Pre (-15.)	Post (-1.)	0.	1.	3.	7.	14.	21.	28.	35.
WBC (x10 ⁹ /L)	Antioksidan	10,30±2,38 (6,90-12,76)	9,37±2,25* (6,08-12,57)	7,79±2,27 [†] (5,18-10,45)	7,70±2,18 (5,45-10,78)	7,91±1,94 (6,20-10,34)	8,03±3,01 (5,17-12,91)	8,31±2,07 (6,02-11,23)	8,04±2,07 (6,03-11,21)	7,63±2,31 (4,03-10,34)	6,42±2,96 (1,55-9,96)
	Kontrol	10,99±3,11 (6,63-15,67)	10,70±1,96 (7,63-13,67)	9,10±3,22 (5,53-12,53)	9,61±3,10 (5,88-13,68)	10,20±2,89 (6,05-13,87)	9,73±2,60 (5,55-12,67)	8,85±2,17 (5,63-11,7)	7,97±2,21 (4,58-10,92)	7,52±2,47 (3,47-11,50)	7,48±2,55 (3,90-12,27)
RBC (x10 ¹² /L)	Antioksidan	6,73±0,57 (5,80-7,43)	6,28±0,70* (5,49-7,23)	5,44±0,38 [‡] (4,92-5,92)	5,55±0,49 (4,94-6,24)	5,55±0,40 (4,98-6,06)	5,67±0,69 (4,68-6,45)	5,67±0,59 (4,69-6,49)	5,55±0,49 (4,79-6,20)	5,52±0,44 (4,83-6,05)	5,53±0,53 (4,67-6,12)
	Kontrol	6,22±0,40 (5,57-6,68)	6,19±0,31 (5,66-6,56)	5,44±0,32 [†] (5,14-5,96)	5,47±0,32 (5,01-5,88)	5,45±0,24 (5,14-5,82)	5,33±0,31 (5-5,82)	5,45±0,26 (5,05-5,75)	5,45±0,37 (5,01-5,89)	5,45±0,28 (5,20-5,92)	5,53±0,30 (5,24-5,98)
HGB (g/dL)	Antioksidan	15,67±1,71 (12,70-17,90)	14,70±1,85* (12,20-16,70)	12,54±1,17 [‡] (10,90-14,00)	12,61±1,40 (10,60-14,30)	12,87±1,42 (10,80-14,40)	12,74±1,76 (9,90-14,90)	12,78±1,58 (10,10-14,60)	12,54±1,37 (10,20-13,90)	12,44±1,34 (10,20-14)	12,34±1,37 (10,10-13,80)
	Kontrol	14,24±2,01 (12,10-17,60)	14,18±1,70 (12,10-16,60)	12,35±1,90 ^Ω (10,80-15,50)	12,67±1,59 (11,20-15,30)	12,65±1,67 (11,20-15,40)	12,40±1,60 (11,10-15,10)	12,27±1,48 (10,90-14,80)	12,22±1,57 (10,90-14,90)	12,37±1,53 (11,20-15,10)	12,34±1,57 (11,10-15)
HCT (%)	Antioksidan	45,64±3,65 (39,20-50,57)	42,44±4,49 (37,18-48,20)	36,27±3,51 [‡] (30,70-41,07)	37,06±3,60 (30,90-40,40)	38,08±4,11 (31,10-42,30)	38,96±5,28 (30,40-44,25)	39,30±4,86 (30,10-43,50)	38,60±4,35 (30,70-43,27)	38,64±3,76 (32,30-43,28)	38,83±4,28 (31,30-44,17)
	Kontrol	41,99±5,91 (37,70-53,80)	41,84±4,10 (37,60-49,80)	37,07±5,48 [†] (32,48-46,90)	37,93±5,07 (33,39-47,13)	37,74±5,08 (33,15-46,45)	36,89±5,10 (31,40-44,60)	38,04±4,17 (32,77-45,60)	38,04±5,06 (32,50-46,70)	38,57±4,47 (34,56-46,80)	38,92±4,69 (34,85-47,20)
İstatistiksel Değerlendirme											
		Zaman			Grup			Zaman/Grup			
WBC		0,003			0,400			0,099			
RBC		0,590			0,597			0,193			
HGB		0,101			0,809			0,391			
HCT		0,008			0,896			0,106			

*: Aynı satırda pre değerlerine göre post hematolojik değerler p<0,05 düzeyinde farklıdır.

Ω, †, ‡ : Aynı satırda gösterilen 0.gün değerleri post değerlere göre sırasıyla p<0,05, p<0,01 ve p<0,001 düzeyinde farklıdır.

Çizelge 3.7. Antioksidan uygulamasının donör ve saklanan tam kan hemogramına etkileri (II)

Parametre	Grup	Zaman (gün)											
		Donör		CPDA-1 içerikli kan torbasında saklama süresi									
		Pre (-15.)	Post (-1.)	0.	1.	3.	7.	14.	21.	28.	35.		
MCV (fL)	Antioksidan	66,71±2,21 (62-68)	66,28±2,05 (62-68)	66,14 ± 2,11 (62-69)	66,85±2,11 (63-69)	68,57±2,93 (63-71)	68,57±1,90 (65-71)	69±2,76 (64-72)	69,28±2,81 (64,73)	69,71±2,21 (67-74)	70,14±1,95 (67-72)		
	Kontrol	67,28±7,11 (61-81)	67,14±6,69 (61-80)	67,85±6,76 [†] (62-81)	68,14±6,33 (62-80)	69,14±6,98 (63-82)	68,42±6,24 (62-79)	69,42±5,71 (63-80)	69,42±5,56 (63-79)	70,42±4,85 (66-79)	70,42±4,54 (67-79)		
MCH (pg)	Antioksidan	23,24±0,85 (22-24,30)	23,37±0,95 (22,20-24,60)	23,01±0,84 (22-24,10)	22,94±1,05 (21,50-24,20)	23,11±0,97 (21,70-24,40)	22,43±0,93 (21,10-23,60)	22,49±0,56 (21,60-23,20)	22,56±0,62 (21,50-23,20)	22,51±0,97 (21,20-23,80)	22,29±0,54 (21,60-23,10)		
	Kontrol	22,91±1,93 (20,70-26,40)	22,84±0,90 (21,70-24,40)	22,53±2,27 (20,50-26,70)	23,01±1,80 (20,90-26,10)	23,14±2,25 (21,30-27,10)	23,06±2,11 (20,60-26,80)	22,40±2,22 (19,60-25,80)	22,37±1,84 (20,30-25,40)	22,50±1,85 (20,70-25,60)	22,23±1,62 (20,40-25)		
MCHC (g/dL)	Antioksidan	34,71±0,92 (33-35,50)	35,17±1,27 (33-36,50)	34,73±1,26 (33,10-36,30)	34,34±1,02 (32,70-35,70)	33,79±1,00 (31,70-34,60)	32,67±1,11 (30,50-33,80)	32,51±0,81 (31,60-33,60)	32,50±0,61 (31,80-33,40)	32,31±0,78 (31,20-33,30)	31,74±0,61 (30,90-32,70)		
	Kontrol	34,19±1,27 (32,20-35,50)	34,27±0,90 (33,20-35,90)	33,33±1,45 ^Ω (31,10-34,90)	33,89±1,35 (32,40-36,20)	33,46±0,66 (32,40-34,10)	33,54±1,36 (31,60-36)	32,36±1,93 (30-34,80)	32,19±0,96 (30,80-33,10)	31,87±0,74 (31-33)	31,71±0,77 (30,50-32,80)		
PLT (x10 ⁹ /L)	Antioksidan	328,86±60,43 (209-386)	304,86±63,40 (211-393)	248,71±54,7 [†] (181-325)	241,14±69,57 (115-303)	214,71±70,88 (119-292)	270,43±77,84 (157-378)	220,57±89,66 (83-318)	246,86±40,45 (201-306)	251,43±40,90 (175-300)	195,86±76,77 (59-260)		
	Kontrol	397,86±134,43 (201-495)	386,42±108,76 (223-490)	259,4±101,9 [‡] (104-362)	282,43±145,7 (79-449)	217,14±123,6 (68-368)	202,57±94,92 (84-339)	205,57±94,07 (90-325)	204,00±139,7 (52-416)	190,71±123,3 (54-356)	222,43±138,7 (53-433)		
İstatistiksel Değerlendirme													
		Zaman				Grup				Zaman/Grup			
MCV		0,000				0,793				0,550			
MCH		0,006				0,987				0,335			
MCHC		0,000				0,422				0,196			
PLT		0,100				0,782				0,081			

^{Ω, †, ‡} : Aynı satırda gösterilen 0. gün değerleri post değerlere göre sırasıyla p<0,05, p<0,01 ve p<0,001 düzeyinde farklıdır.

Antioksidan ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı köpeklerin grup içi pre ile post, iki grup arasında ise pre ve post hematolojik parametreleri karşılaştırıldı. Antioksidan grupta vitamin E + selenyum uygulaması ile WBC, RBC sayıları, HCT değeri ve HGB konsantrasyonunda $p < 0,05$ düzeyinde azalmalar belirlenirken, kontrol grubu donörlerin pre-post hematolojik parametreleri arasındaki farkların istatistiksel anlamlı olmadığı belirlendi [(Çizelge 3.7, I)]. Grup içi pre ile post, iki grup arasında ise pre ve post eritrosit indeksi (MCV, MCH, MCHC) ile PLT sayılarının grup içi ve gruplar arası karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlı farklılıklar belirlenmedi [(Çizelge 3.7, II)].

Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden heparinli tüplere kan örneklerinin alımını (post) takiben CPDA-1 içerikli kan torbalarına alınarak $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan (0. gün) kan örneklerinde ölçülen parametrelerin kıyaslanmasında; post değerlere göre antioksidan grupta 0. gün WBC sayısının $p < 0,01$, RBC, HGB ve HCT değerlerinin $p < 0,001$, kontrol grubunda ise RBC ve HCT değerlerinin $p < 0,01$, HGB konsantrasyonunun $p < 0,05$ düzeyinde düşük olduğu belirlendi [(Çizelge 3.7, I)]. Post değerlere göre 0. gün PLT değerlerin antioksidan ve kontrol grubunda sırasıyla $p < 0,01$ ve $p < 0,001$ düzeyinde düşük, kontrol grubunda ise MCHC değerindeki azalma ($p < 0,05$), MCV değerindeki artış ($p < 0,01$) olması önemli bulundu [(Çizelge 3.7, II)].

Tekrarlı ölçümler için varyans analizinde, CPDA-1 içerikli kan torbasına alınan ve $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 35 gün süreyle saklanarak 8 örnekleme yapılan tam kanda, WBC sayısı ve HCT değerinin saklama süresince gösterdiği (zamanla) değişimin önemli olduğu, uygulama etkisinin (gruplar arası fark) istatistiksel anlamlı olmadığı ve değişimin gruplarda aynı yönde (grup x zaman) olduğu belirlendi [(Çizelge 3.7, I)]. RBC sayısı ve HGB konsantrasyonunda ise zamanla ilişkili değişimler, bu parametrelerin iki grup (antioksidan ve kontrol) arasındaki farkları ve zaman/grup ilişkilerinin istatistiksel anlamlı olmadığı saptandı [(Çizelge 3.7, I)]. MCV, MCH ve MCHC değerinin saklama süresince gösterdiği (zamanla) değişimin önemli, gruplar arası farkların istatistiksel anlamlı olmadığı ve değişimin gruplarda aynı yönde (grup x zaman) olduğu belirlendi [(Çizelge 3.7, II)].

Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden CPDA-1 içerikli kan torbalara alınan kanda 8 örneklemede (0.-35. gün) her bir örnekleme zamanında iki grup arasında incelenen hematolojik parametrelerde anlamlı farklılıklar saptanmadı [(Çizelge 3.7, I ve II)].

3.1.2.2. Antioksidan uygulamasının donörlerde ve saklanan tam kanda hemolizle ilgili parametrelere etkileri

Antioksidan uygulanmasının saklanan tam kanın kalitesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesine yönelik iki hafta arayla 2 kez (-15. gün “**pre**”; -1. gün “**post**”) sc. 150 mg vitamin E + 0,5 mg selenyum/20 kg VA (antioksidan grup) veya eş değer hacimde %0,9 NaCl solüsyonu uygulamasının (kontrol grubu) hemolizle ilgili parametrelere etkileri Çizelge 3.8’de sunuldu.

Çizelge 3.8. Antioksidan uygulamasının hemolize ilgili parametrelere (plazma K⁺ ve HGB konsantrasyonları ile LDH aktivitesi) etkileri

Parametre	Grup	Zaman (gün)									
		Donör		CPDA-1 içerikli kan torbasında saklama süresi							
		Pre (-15.)	Post (-1.)	0.	1.	3.	7.	14.	21.	28.	35.
K ⁺ (mmol/L)	Antioksidan	3,96±0,12 (3,82-4,21)	3,92±0,12 (3,80-4,18)	2,37±0,37 ^e (1,83-2,83)	2,94±0,44 (2,46-3,77)	3,55±0,45 (3,14-4,49)	4,11±0,46 (3,67-5,01)	4,43±0,37 (4,05-5,20)	4,49±0,52 (4,03-5,57)	4,64±0,45 (4,23-5,63)	4,72±0,45 (4,33-5,71)
	Kontrol	4,00±0,16 (3,81-4,26)	3,99±0,24 (3,72-4,46)	2,60±0,38 ^e (2,06-3,09)	3,48±0,40 (3,11-4,23)	3,88±0,36 (3,17-4,37)	4,31±0,41 (3,57-4,81)	4,49±0,34 (3,81-4,94)	4,75±0,40 (4-5,25)	4,89±0,44 (4,17-5,52)	5,02±0,44 (4,20-5,65)
LDH (U/L)	Antioksidan	62,14±11,06 (44-78)	91,00±35,75 (54-163)	114,00±38,07 (35-159)	139,57±50,67 (51-212)	184,14±110,4 (40-390)	164,14±90,73 (39-344)	185,57±110,8 (67-420)	174,86±75,11 (69-308)	244,29±119,5 (76-466)	296,29±156,7 (109-597)
	Kontrol	68,29±33,19 (28-130)	74±29,01 (38-129)	77,14±22,27 (39-115)	96,43±24,87 (67-127)	135,29±48,33 (67-209)	142,86±42,34 (96-198)	169,43±50,50 (110-265)	208,57±90,61 (102-355)	295,86±120,8 (168-482)	330,00±149,7 (158-603)
HGB (g/dL)	Antioksidan	0,03±0,13 [¥] (0,01-0,05)	0,04±0,02* (0,01-0,09)	0,06±0,46 (0,01-0,13)	0,07±0,05 (0,01-0,12)	0,07±0,04 (0,01-0,13)	0,07±0,05 (0,02-0,17)	0,07±0,03 (0,02-0,11)	0,08±0,03 (0,02-0,13)	0,09±0,03 (0,04-0,12)	0,10±0,03 (0,05-0,17)
	Kontrol	0,05±0,02 (0,02-0,10)	0,05±0,02 (0,02-0,09)	0,10±0,06 (0,03-0,25)	0,10±0,027 (0,01-0,27)	0,11±0,09 (0,05-0,31)	0,11±0,10 (0,03-0,34)	0,14±0,15 (0,04-0,47)	0,17±0,18 (0,04-0,58)	0,20±0,27 (0,07-0,82)	0,24±0,28 (0,08-0,87)
İstatistiksel Değerlendirme											
		Zaman			Grup			Zaman/Grup			
K ⁺		0,000			0,217			0,174			
LDH		0,000			0,862			0,044			
HGB		0,000			0,156			0,894			

[¥]: Aynı grupta pre enjeksiyon değerlerine göre post HGB değeri () ve iki grubun pre HGB değerleri arasında (¥) farklar p<0,05 düzeyinde anlamlıdır.

^e: Aynı satırda gösterilen 0. gün değerleri post değerlere göre p<0,001 düzeyinde farklıdır.

Antioksidan ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı köpeklerin grup içi pre ile post, iki grup arasında ise pre ve post biyokimyasal parametreleri karşılaştırıldı. Vitamin E + selenyum uygulanan antioksidan grupta plazma HGB konsantrasyonunda p<0,05 düzeyinde artış belirlenirken, kontrol grubunun plazma pre HGB konsantrasyonun antioksidan grup pre değerine göre p<0,05 düzeyinde yüksek olduğu saptandı (Çizelge 3.8).

Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden heparinli tüplere kan örneklerinin alımını (post) takiben CPDA-1 içerikli kan torbalarında saklanan (0. gün) kan örneklerinde; her iki grubun 0. gün K^+ konsantrasyonlarının post değerlere göre düşük ($p<0,001$) olduğu saptandı (Çizelge 3.8).

Tekrarlı ölçümler için varyans analizinde, CPDA-1 içerikli kan torbasına alınan ve $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 35 gün saklanarak yapılan 8 örneklemede kan plazmasında ölçülen K^+ ve HGB konsantrasyonları ile LDH aktivitesinin saklama süresince gösterdiği (zamanla) değişimler ile LDH aktivitesinde zaman/grup ilişkisinin istatistiksel anlamlı olduğu, buna karşın gruplar arası farkların istatistiksel anlamlı olmadığı dikkati çekti (Çizelge 3.8, Şekil 3.25-3.27).

Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden CPDA-1 içerikli kan torbalara alınan kanda iki grup arasında 1. gün K^+ konsantrasyonlarında farklılıklar ($p<0,05$) belirlendi (Şekil 3.25). Antioksidan grup 0. gün LDH aktivitesi aynı örnekleme zamanında kontrol grubu değerlerinden yüksek ($p<0,05$) bulundu (Şekil 3.27). Her bir örnekleme zamanında iki grup arasında plazma HGB konsantrasyonlarının anlamlı farklılıklar göstermediği görüldü.

3.1.2.3 Antioksidan uygulamasının donörlerde ve saklanan tam kanda oksidan/antioksidan duruma etkileri

Antioksidan uygulanmasının saklanan tam kanın kalitesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesine yönelik iki hafta arayla 2 kez (-15. gün “**pre**”; -1. gün “**post**”) sc. 150 mg vitamin E + 0,5 mg selenyum/20 kg VA (antioksidan grup) veya eş değer hacimde %0,9 NaCl solüsyonu uygulamasının (kontrol grubu) oksidan/antioksidan duruma etkileri Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10'da sunuldu.

Çizelge 3.9. Antioksidan uygulamasının donörlerde ve saklanan tam kanda total oksidan/antioksidan duruma etkileri

Parametre	Grup	Zaman (gün)									
		Donör		CPDA-1 içerikli kan torbasında saklama süresi							
		Pre (-15.)	Post (-1.)	0.	1.	3.	7.	14.	21.	28.	35.
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L)	Antioksidan	3,52±0,29 ^Y (3,17-4,03)	3,41±0,32 ^Y (3,12-3,91)	3,42±0,83 (2,33-4,81)	4,25±1,04 (2,99-5,57)	5,11±1,59 (2,89-7,64)	4,91±1,83 (2,46-7,73)	7,33±2,60 (4,12-11,30)	8,12±2,87 (5,31-13,52)	10,90±3,00 (8,11-15,98)	13,25±4,46 (9,00-20,62)
	Kontrol	4,33±0,52 (3,82-5,17)	4,34±0,48 (3,90-5,11)	5,54±3,93 (2,48-13,40)	7,01±5,53 (2,41-15,60)	8,96±7,44 (3,52-23,02)	10,55±7,61 (4,02-22,74)	15,22±8,09 (6,61-26,20)	17,51±6,46 (8,80-26,33)	21,66±5,93 (11,17-28,77)	25,05±7,97 (14,07-37,98)
TAK (mmol Trolox Equiv./L)	Antioksidan	0,73±0,03 (0,68-0,78)	0,76±0,05 (0,70-0,85)	0,96±0,04 ^g (0,89-1,03)	0,97±0,03 (0,92-1,01)	0,96±0,03 (0,90-1,01)	0,95±0,05 (0,88-1,03)	0,94±0,03 (0,87-0,97)	0,95±0,02 (0,90-0,98)	0,93±0,04 (0,85-0,98)	0,92±0,05 (0,81-0,98)
	Kontrol	0,73±0,11 (0,60-0,96)	0,72±0,11 (0,62-0,96)	0,95±0,05 ^g (0,86-0,99)	0,94±0,06 (0,86-1,05)	0,94±0,05 (0,87-1,01)	0,95±0,06 (0,83-1,03)	0,92±0,07 (0,77-1,00)	0,89±0,06 (0,76-0,96)	0,87±0,11 (0,61-0,95)	0,86±0,10 (0,65-0,97)
İstatistiksel Değerlendirme											
		Zaman			Grup			Zaman/Grup			
TOS		0,000			0,010			0,010			
TAK		0,001			0,277			0,196			

^Y: Antioksidan grubunun pre ve post değerleri kontrol grubuna göre p<0,05 düzeyinde farklıdır.

^g: Aynı satırda gösterilen 0. gün değerleri post değerlere göre p<0,001 düzeyinde farklıdır.

Antioksidan ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı köpeklerin grup içi pre ile post plazma TOS ve TAK değerleri arasındaki farkların istatistiksel anlamlı olmadığı belirlendi. Gruplar arasında ise antioksidan grubunun pre ve post plazma TOS değerlerinin kontrol grubuna göre p<0,05 düzeyinde düşük olduğu belirlendi (Çizelge 3.9).

Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden heparinli tüplere kan örneklerinin alımını (post) takiben CPDA-1 içerikli kan torbalarında saklanan (0. gün) kan örneklerinde; her iki grubun 0. gün TAK değerlerinin post değerlere göre p<0,001 yüksek olduğu görüldü (Çizelge 3.9).

Tekrarlı ölçümler için varyans analizinde, CPDA-1 içerikli kan torbasına alınan ve +4 °C'de, 1-35 gün saklanarak 8 örnekleme yapılan kanın plazmasından ölçülen TOS ve TAK değerlerinin her ikisinin de saklama süresince gösterdiği (zamanla) değişimler ile plazma TOS değerinde uygulamanın (grup) ve zaman x grup ilişkisinin istatistiksel anlamlı olduğu belirlendi (Çizelge 3.9; Şekil 3.28, 3.29).

Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden CPDA-1 içerikli kan torbalara alınan kanda iki grup arasında 14., 21., 28. ve 35. gün TOS değerleri arasında sırasıyla $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ ve $p<0,01$ (Şekil 3.28) düzeylerinde farklılıklar belirlendi. TAK değerinde her bir örnekleme zamanında iki grup arasında anlamlı farklılıklar belirlenmedi.

Çizelge 3.10. Antioksidan uygulamasının donörlerde ve saklanan tam kanda oksidan (MDA) ve enzimatik antioksidan (SOD, GSH-Px, CAT) biyobelirteçlere etkileri

Parametre	Grup	Zaman (gün)											
		Donör		CPDA-1 içerikli kan torbasında saklama süresi									
		Pre (-15.)	Post (-1.)	0.	1.	3.	7.	14.	21.	28.	35.		
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	Antioksidan	16,61±1,92 (14,26-19,59)	13,21±1,79* (9,80-15,71)	12,41±2,26 (8,86-15,24)	13,42±2,97 (9,80-17,11)	14,41±1,75 (12,44-16,64)	14,04±2,24 (10,73-16,64)	14,37±2,08 (10,11-15,90)	15,21±2,53 (11,20-18,97)	14,79±2,51 (12,13-18,53)	16,93±2,04 (13,95-(19,13)		
	Kontrol	17,04±8,70 (4,20-25,35)	16,30±6,89 (6,20-22,35)	14,53±4,99 (7-20,53)	14,54±5,19 (6,53-19,75)	14,49±5,95 (6,38-21,61)	15,52±4,75 (8,86-20,99)	13,72±4,07 (7,78-18,28)	14,86±4,84 (7,31-20,26)	16,46±3,39 (10,11-21,56)	19,61±3,37 (14,42-25,60)		
SOD (U/g HGB)	Antioksidan	803±61 (741-889)	889±49* ^v (839-967)	904±46 (860-988)	903±51 (833-962)	894±45 (830-945)	873±42 (811-927)	847±45 (810-932)	835±37 (785-900)	842±41 (767-882)	839±53 (739-894)		
	Kontrol	794±95 (613-894)	797±95 (623-896)	795±128 (548-891)	782±118 (547-876)	775±79 (628-846)	758±69 (646-844)	737±85 (650-881)	740±66 (659-838)	729±68 (627-831)	725±77 (612-827)		
GSH-Px (U/g HGB)	Antioksidan	458±70 (335-546)	479±86 (340-617)	519±111 ^o (361-710)	500±130 (323-730)	509±140 (332-781)	500±118 (344-706)	470±93 (334-611)	459±120 (326-647)	465±127 (323-661)	459±126 (313-668)		
	Kontrol	478±78 (389-603)	477±91 (329-613)	492±78 (363-579)	467±64 (376-569)	438±58 (351-518)	401±60 (327-503)	391±64 (287-474)	372±46 (317-457)	376±44 (310-452)	347±43 (290-404)		
CAT (U/g HGB)	Antioksidan	5,39±1,63 (2,57-7,00)	5,55±2,17 (2,97-8,98)	5,56±1,86 (3,37-8,20)	5,14±2,00 (2,61-8,12)	4,86±1,84 (2,36-7,25)	4,48±1,75 (2,27-6,70)	4,50±1,23 (2,78-5,93)	4,53±1,74 (2,15-6,38)	4,36±1,77 (2,43-6,53)	4,28±1,53 (2,39-6,28)		
	Kontrol	7,00±2,78 (2,23-10,47)	7,40±1,99 (4,23-9,98)	6,36±2,93 (1,29-10,31)	5,61±2,82 (1,29-9,08)	6,24±2,82 (1,87-9,99)	6,14±2,33 (1,91-9,55)	5,42±2,52 (1,99-9,09)	5,68±2,69 (1,20-9,57)	6,03±2,68 (1,32-9,75)	6,36±2,83 (1,12-8,92)		
İstatistiksel Değerlendirme													
		Zaman				Grup				Zaman/Grup			
MDA		0,003				0,533				0,427			
SOD		0,002				0,004				0,939			
GSH-Px		0,000				0,153				0,021			
CAT		0,093				0,292				0,233			

*: Aynı grupta pre enjeksiyon değerlerine göre post değerler p<0,05 düzeyinde anlamlıdır. ^v: Gruplar arası pre ya da post değerler arasındaki farklılık p<0,05 düzeyinde anlamlıdır.

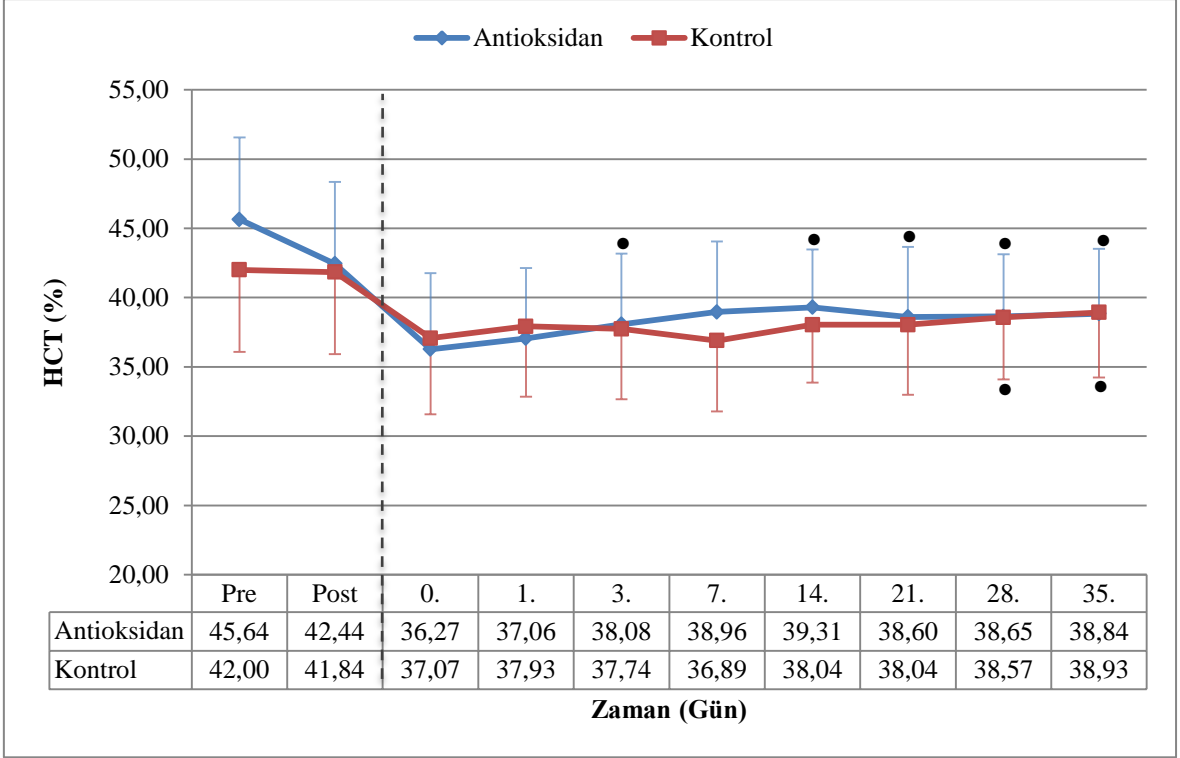
^o: Aynı satırda gösterilen 0. gün değeri post değere göre p<0,001 düzeyinde farklıdır.

Antioksidan ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı köpeklerin grup içi pre ile post, iki grup arasında ise pre ve post antioksidan/oksidan denge ile ilgili biyobelirteçleri karşılaştırıldığında; Vitamin E + selenyum uygulanan grupta pre değere göre post plazma MDA konsantrasyonunun p<0,05 düşük, post eritrosit SOD aktivitesinin ise p<0,01 düzeyinde yüksek olduğu saptandı. Ayrıca post SOD aktivitesinin antioksidan grupta kontrol grubuna göre p<0,05 düzeyinde yüksek olduğu belirlendi (Çizelge 3.10).

Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden heparinli tüplere kan örneklerinin alımını (post) takiben CPDA-1 içerikli kan torbalarında saklanan (0. gün) kan örneklerinde; antioksidan grubun 0. gün GSH-Px aktivitesinin post değere göre $p<0,05$ düzeyinde yüksek olduğu belirlendi (Çizelge 3.10).

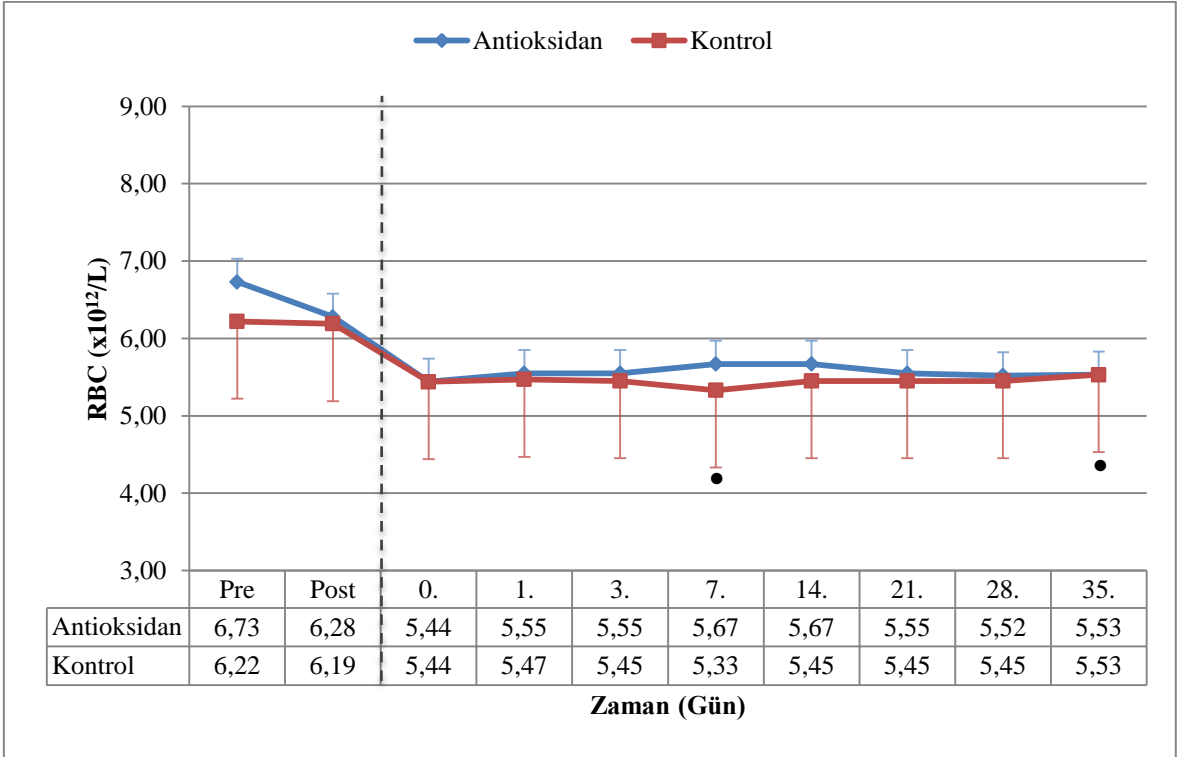
Tekrarlı ölçümler için varyans analizinde, CPDA-1 içerikli kan torbasına alınan ve $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1-35 gün saklanarak yapılan 8 örneklemede plazma MDA konsantrasyonu ile eritrosit SOD ve GSH-Px aktivitelerinin saklama süresince gösterdiği (zamanla) değişimin önemli olduğu, SOD aktivitesinde gruplar arası farkın, GSH-Px aktivitesinde ise grup x zaman ilişkisinin istatistiksel anlamlı farklılıklar gösterdiği belirlendi (Çizelge 3.10, Şekil 3.30, 3.31, 3.32)

Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden CPDA-1 içerikli kan torbalara alınan kanda iki grup SOD aktiviteleri arasında 1. günde $p<0,05$, 3.-35. günlerde ise $p<0,01$ (Şekil 3.31) düzeylerinde farklılıklar belirlendi. Antioksidan grup 35. gün GSH-Px aktiviteleri aynı örnekleme zamanında kontrol grubu değerlerinden yüksek ($p<0,05$) bulundu (Şekil 3.32). MDA konsantrasyonları ve CAT aktivitelerinde her bir örnekleme zamanında iki grup arasında anlamlı farklılıklar belirlenmedi.



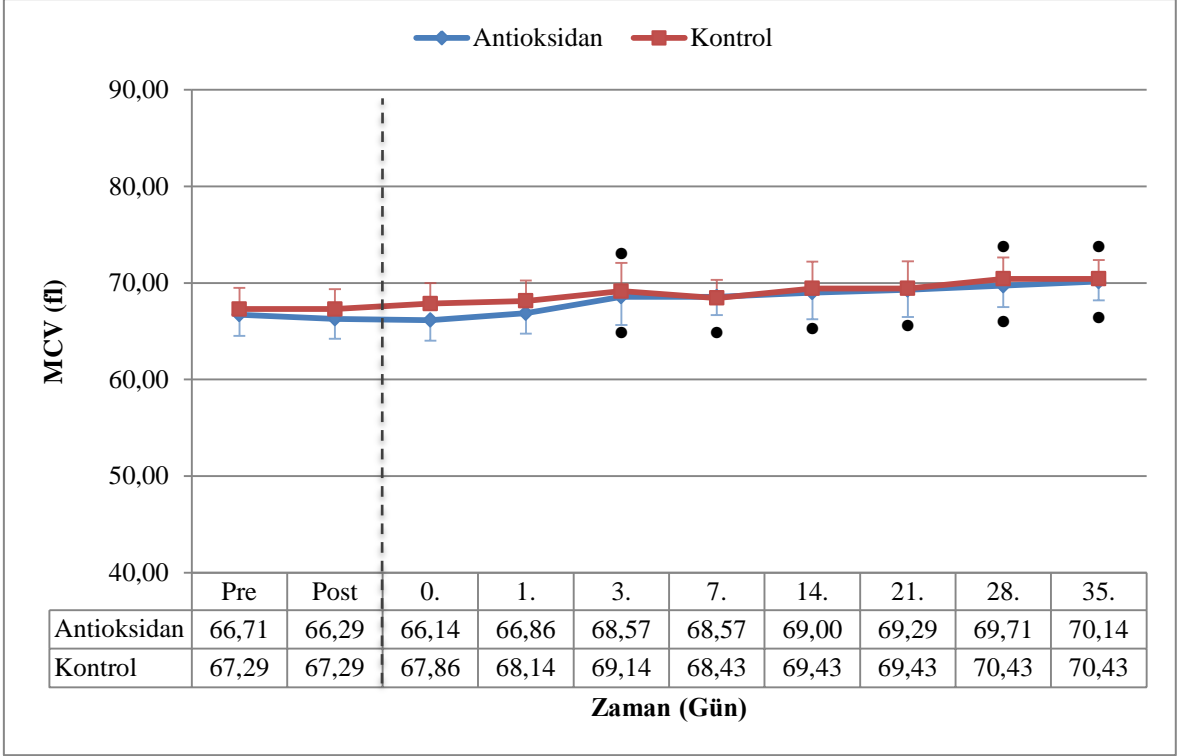
*: Aynı grupta 0. gün HCT değerine göre farklar önemlidir.

Şekil 3. 19. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince HCT değerindeki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



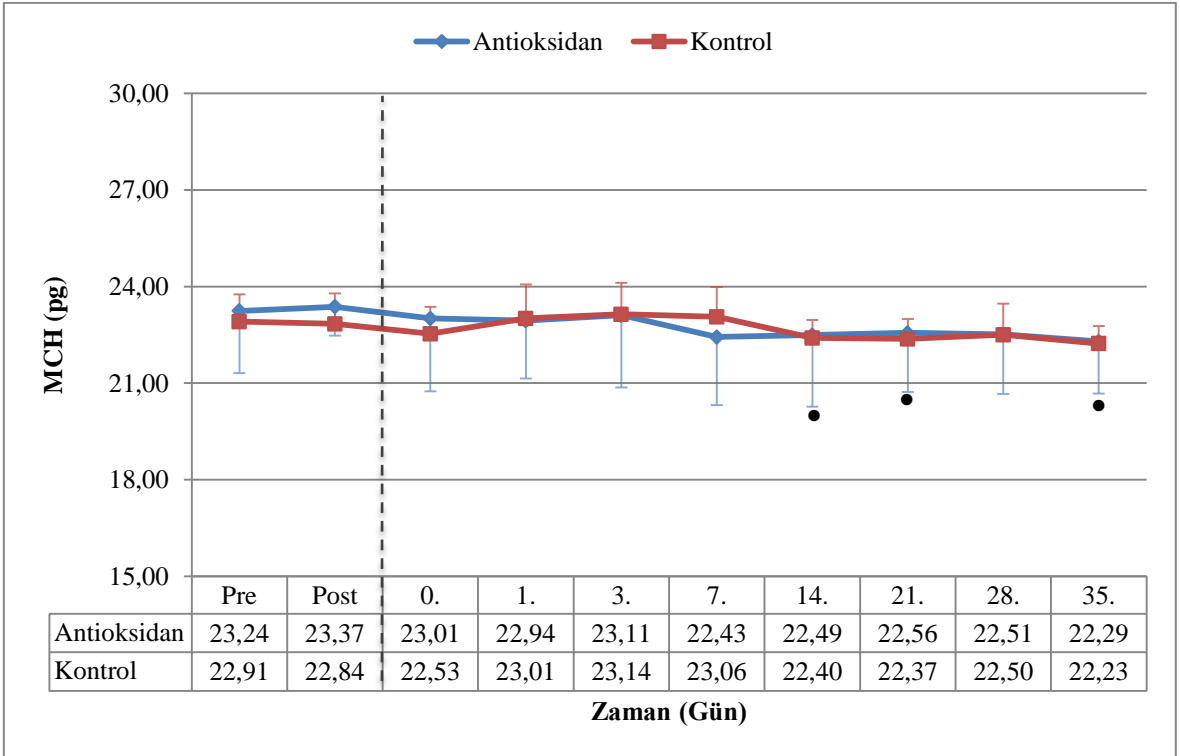
*: Aynı grupta 0. gün RBC sayısına göre farklar önemlidir.

Şekil 3. 20. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince RBC sayısındaki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



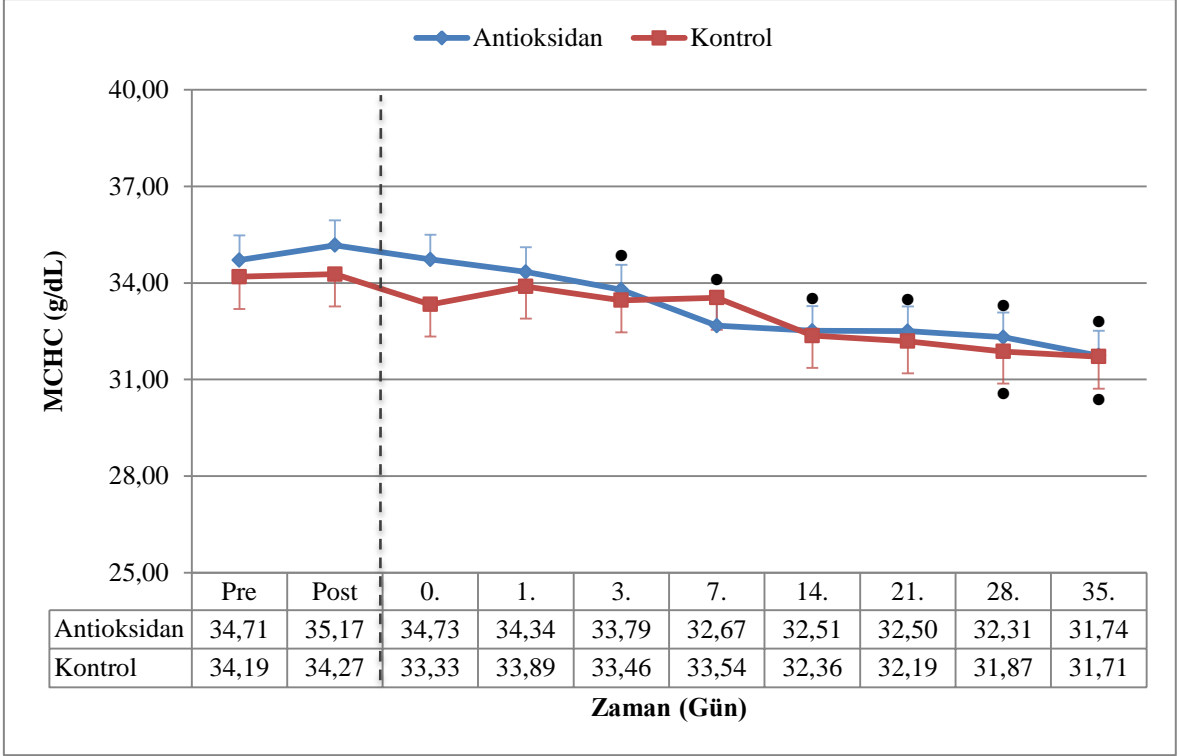
•: Aynı grupta 0. gün MCV değerine göre farklar önemlidir.

Şekil 3. 21. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince MCV değerindeki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



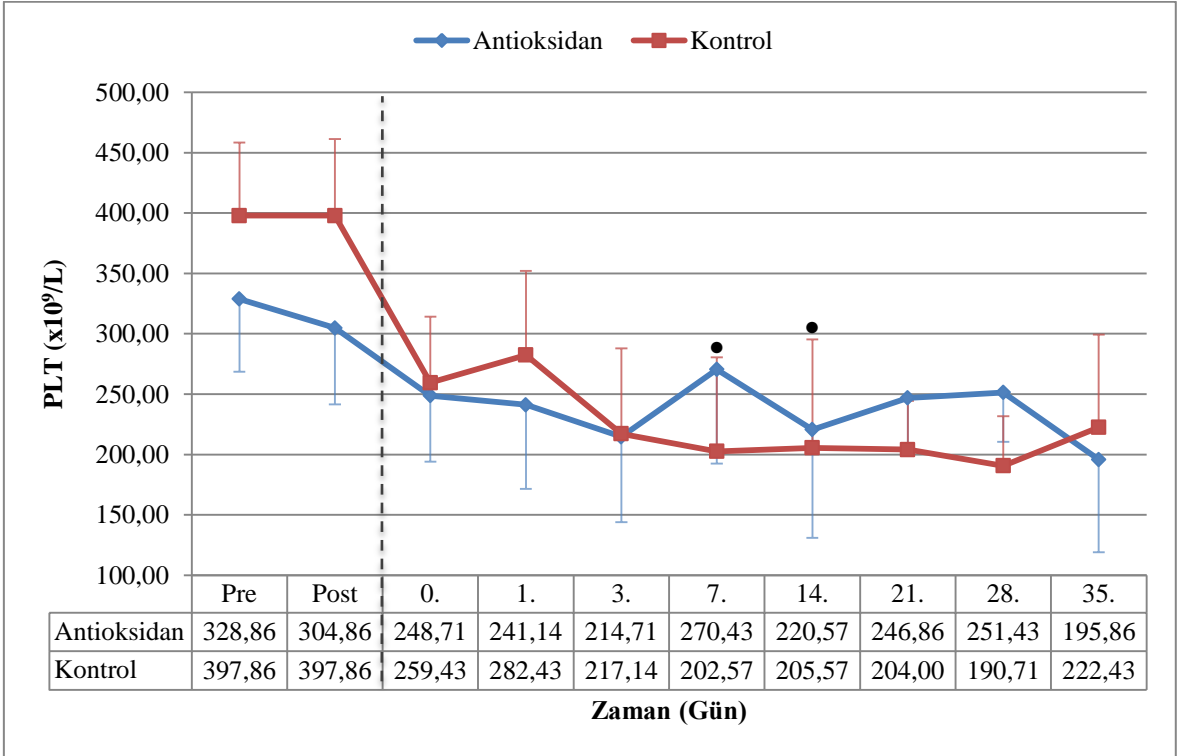
•: Aynı grupta 0. gün MCH değerine göre farklar önemlidir.

Şekil 3. 22. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince MCH değerindeki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



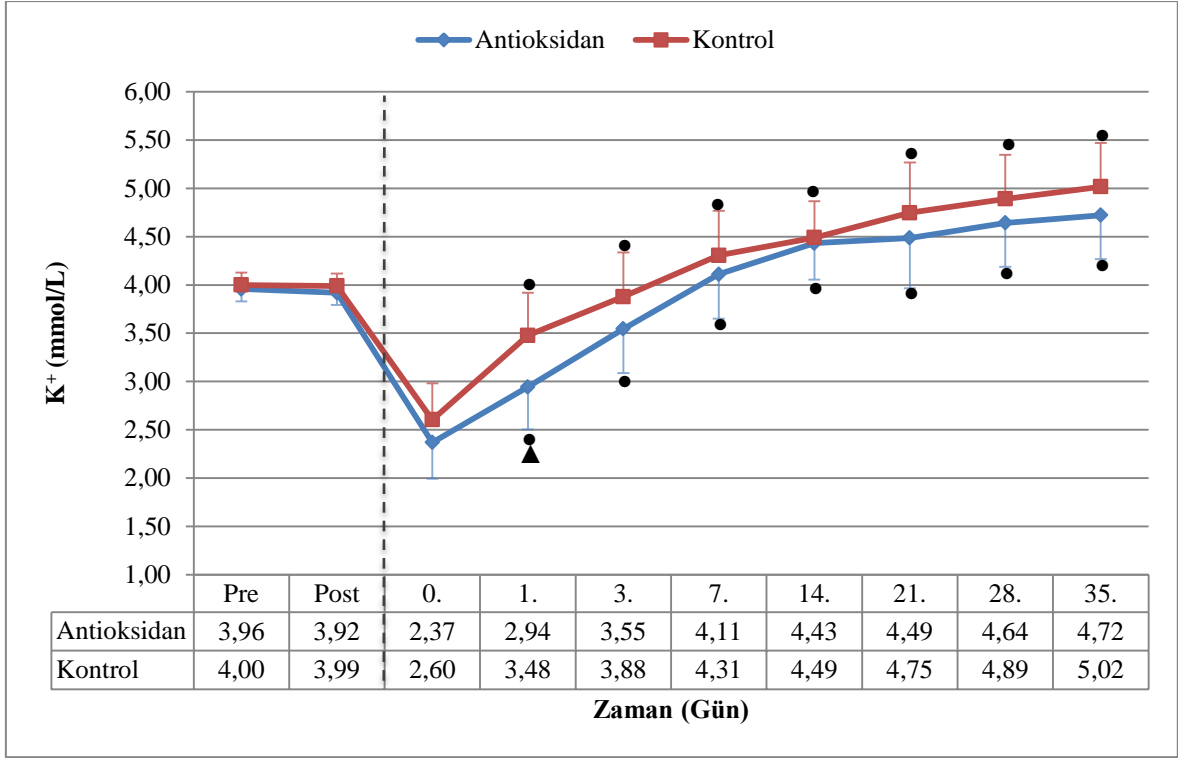
•: Aynı grupta 0. gün MCHC değerine göre farklar önemlidir.

Şekil 3. 23. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince MCHC değerindeki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



•: Aynı grupta 0. gün PLT sayısına göre farklar önemlidir.

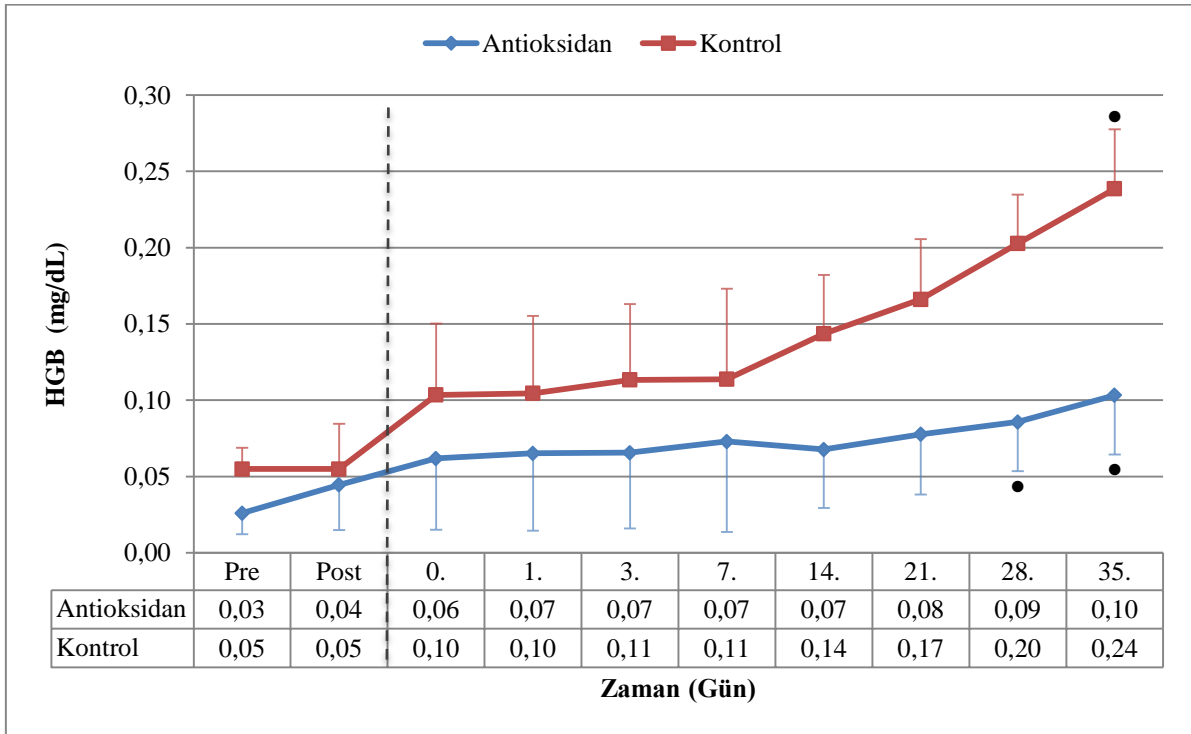
Şekil 3. 24. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince PLT sayısındaki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



*: Aynı grupta 0. gün K^+ konsantrasyonuna göre farklar önemlidir.

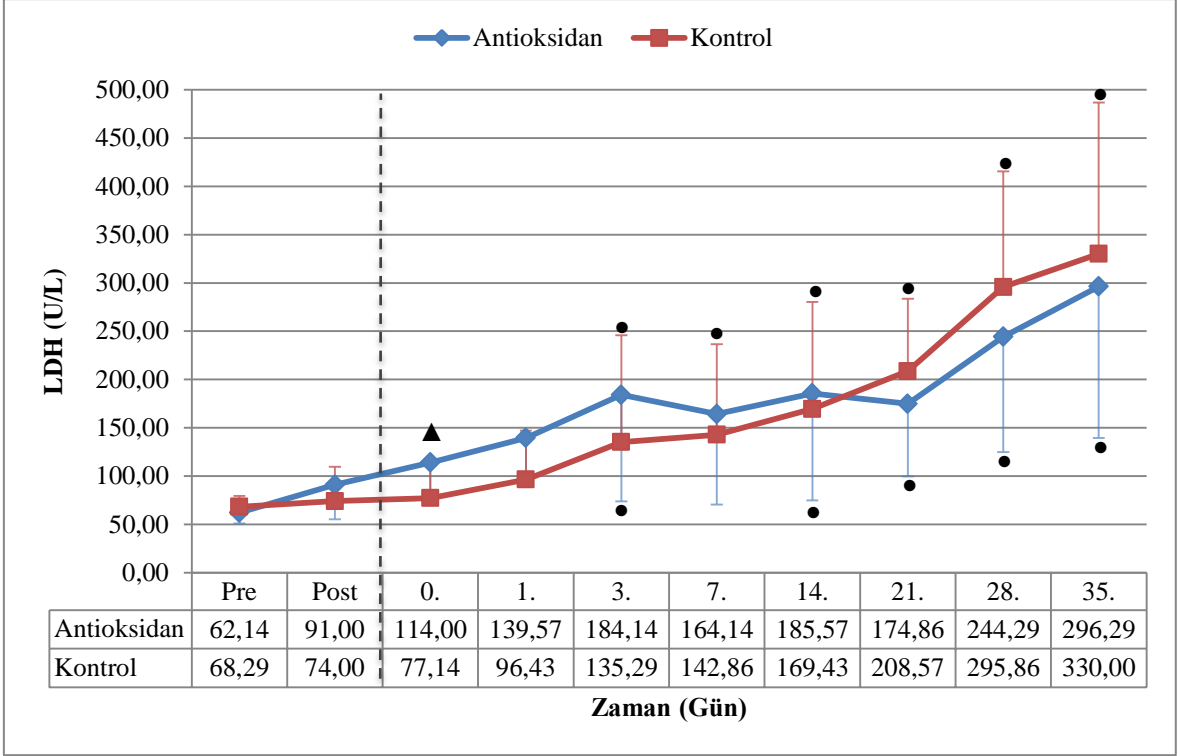
▲: Aynı örnekleme zamanında iki grup K^+ konsantrasyonları arasındaki fark önemlidir.

Şekil 3. 25. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince K^+ konsantrasyonundaki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



*: Aynı grupta 0. gün HGB konsantrasyonuna göre farklar önemlidir.

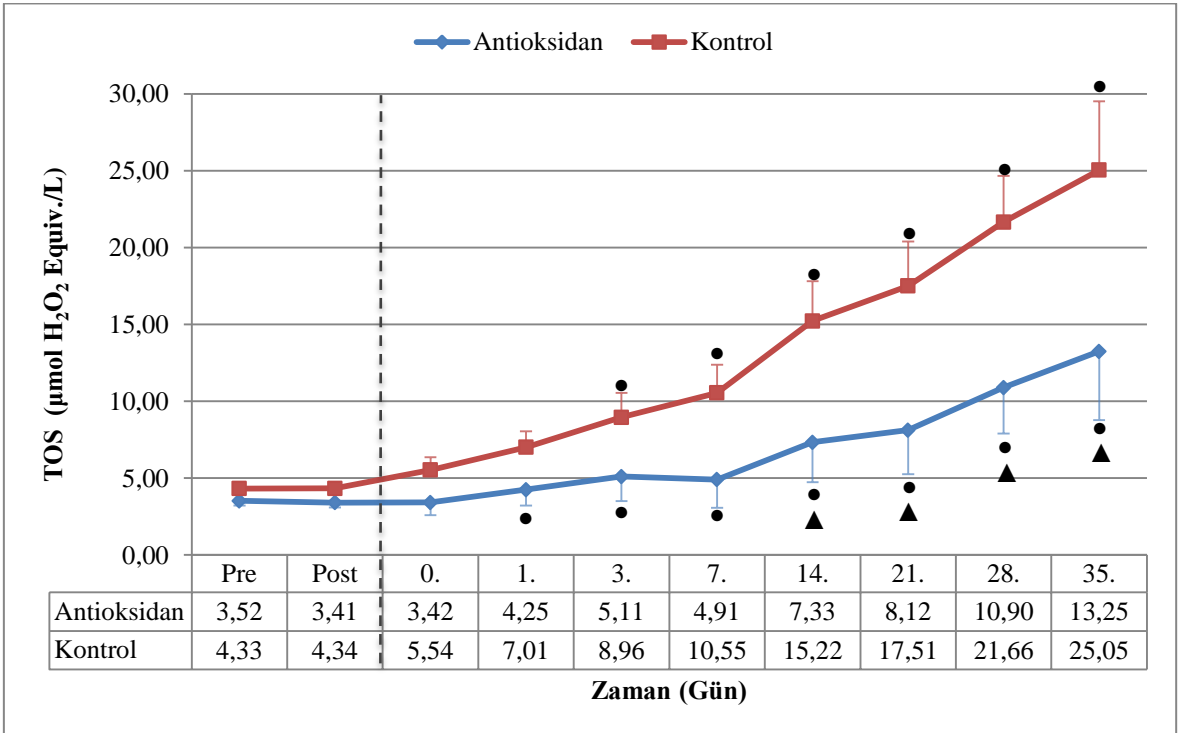
Şekil 3. 26. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince plazma HGB konsantrasyonundaki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



◦: Aynı grupta 0. gün LDH aktivitesine göre farklar önemlidir.

▲: Aynı örnekleme zamanında iki grup LDH aktivitesi arasındaki fark önemlidir.

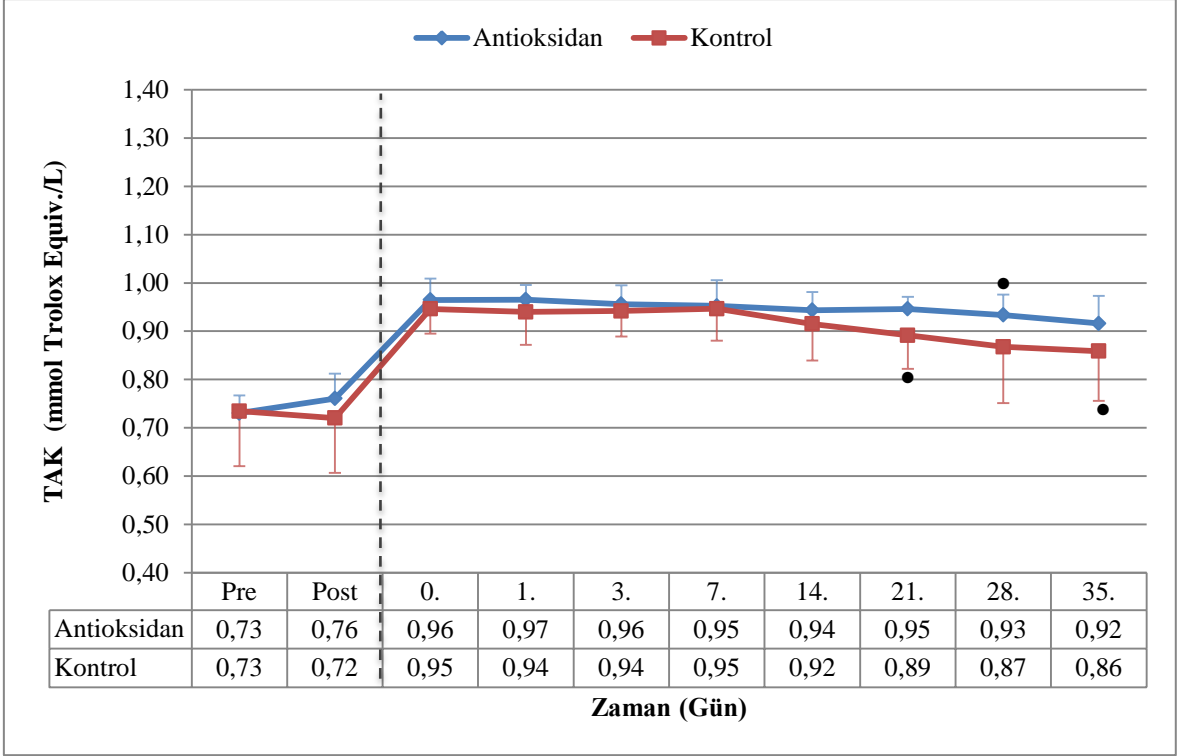
Şekil 3. 27. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince plazma LDH aktivitesindeki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



◦: Aynı grupta 0. gün TOS değerine göre farklar önemlidir.

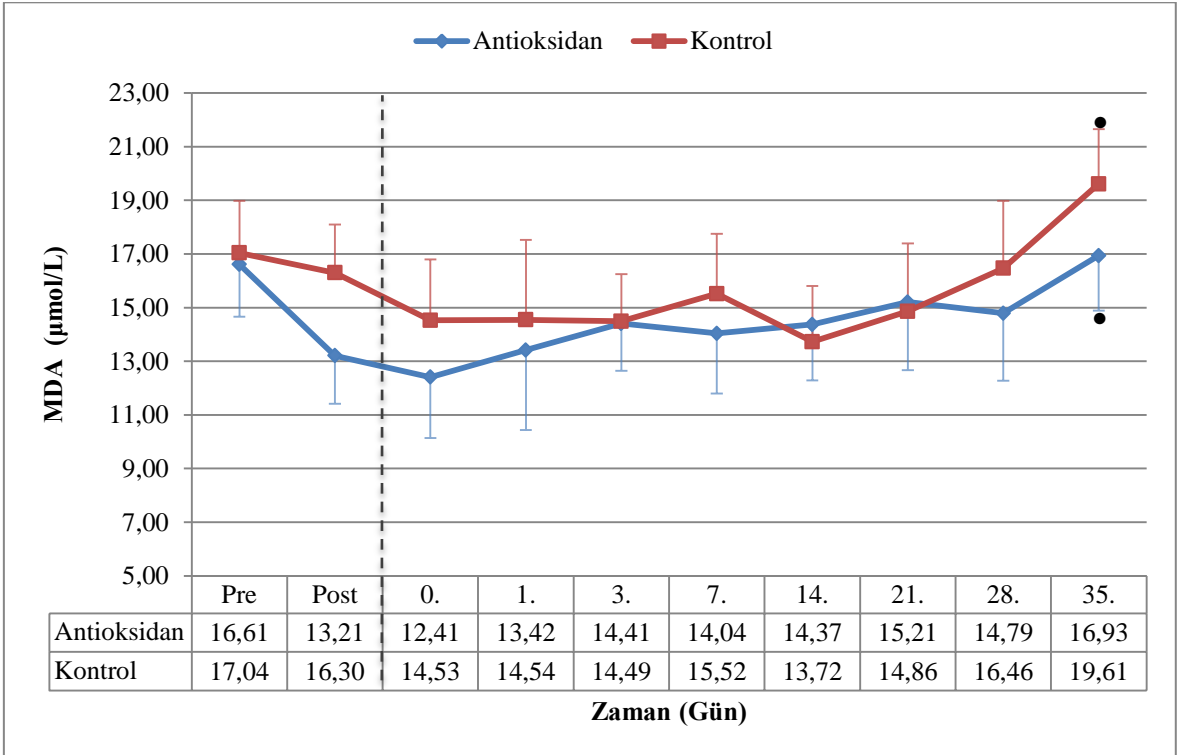
▲: Aynı örnekleme zamanında iki grup TOS değeri arasındaki fark önemlidir.

Şekil 3. 28. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince plazma TOS değerindeki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



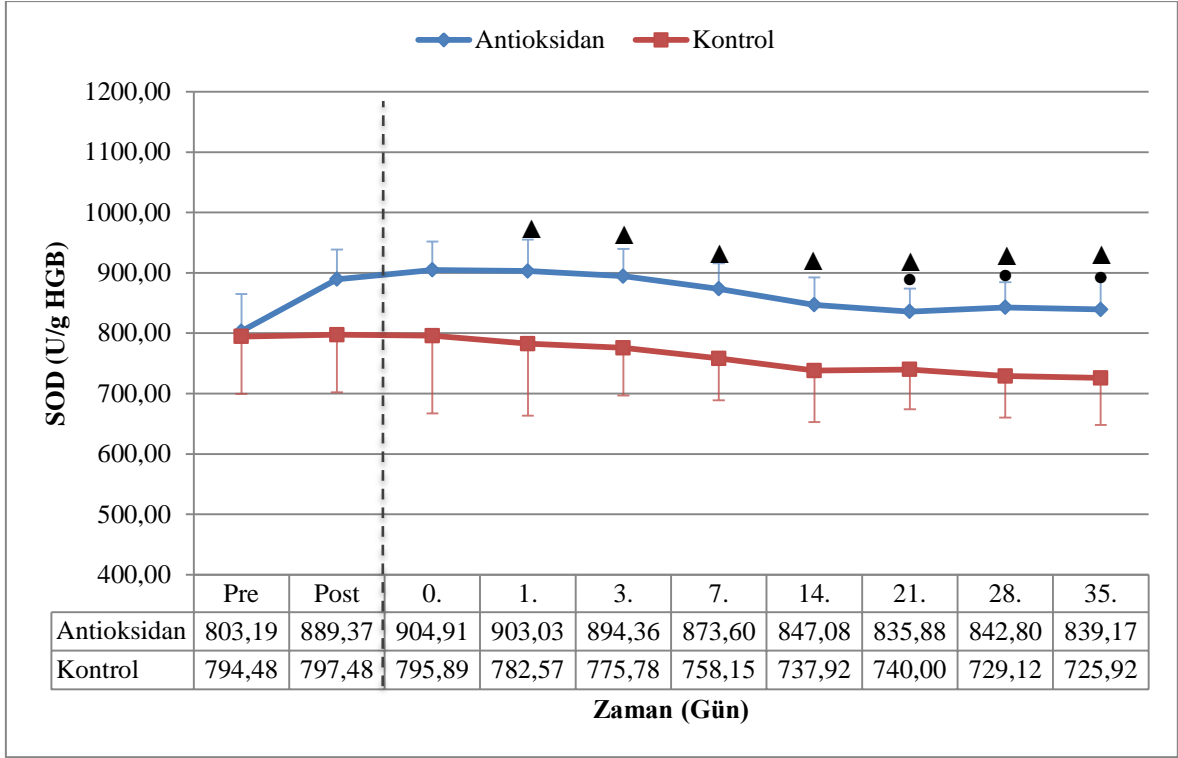
*: Aynı grupta 0. gün TAK değerine göre farklar önemlidir.

Şekil 3. 29. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince plazma TAK değerindeki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



*: Aynı grupta 0. gün MDA konsantrasyonuna göre farklar önemlidir.

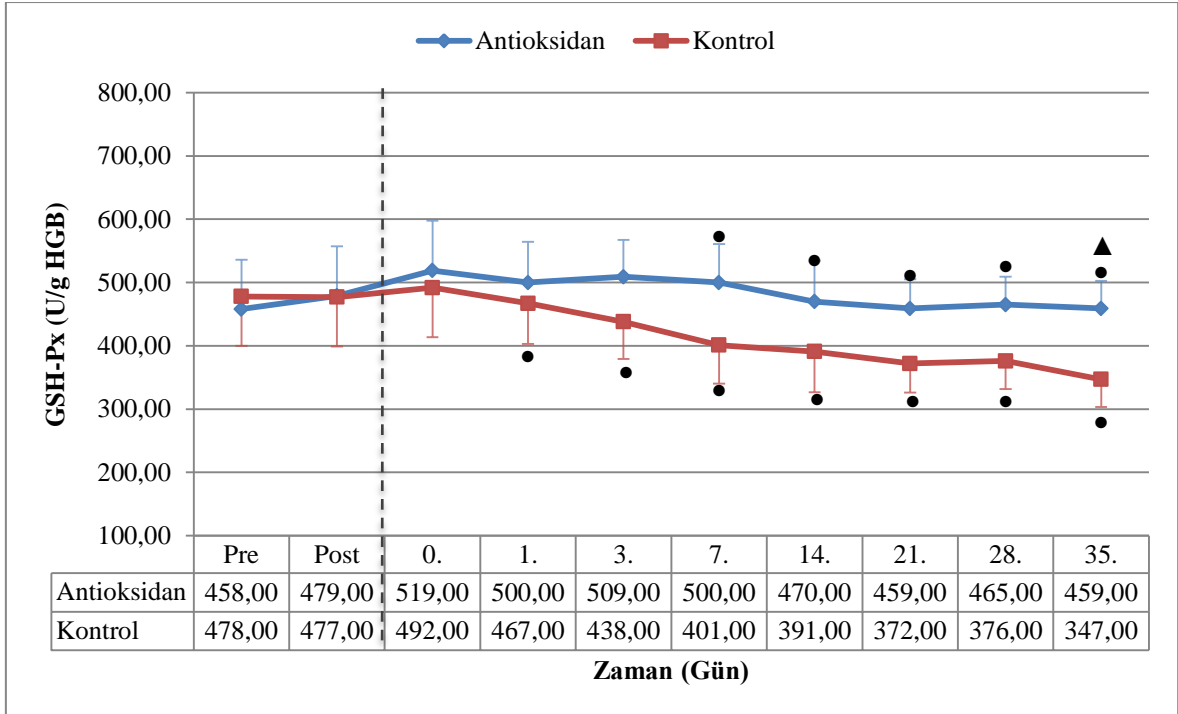
Şekil 3. 30. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince plazma MDA konsantrasyonundaki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



•: Aynı grupta 0. gün SOD aktivitesine göre farklar önemlidir.

▲: Aynı örnekleme zamanında iki grup SOD aktivitesi arasındaki fark önemlidir.

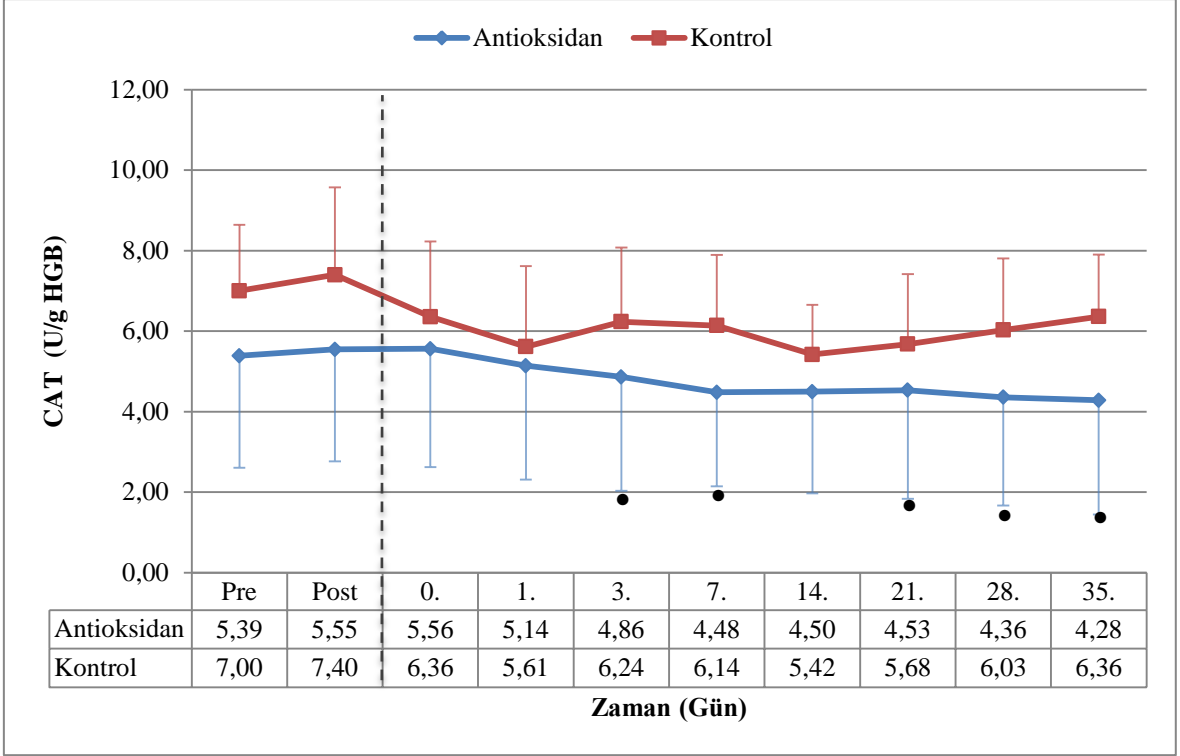
Şekil 3. 31. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince eritrosit SOD aktivitesindeki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



•: Aynı grupta 0. gün GSH-Px aktivitesine göre farklar önemlidir.

▲: Aynı örnekleme zamanında iki grup GSH-Px aktivitesi arasındaki fark önemlidir.

Şekil 3. 32. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1'li torbada saklama süresince eritrosit GSH-Px aktivitesindeki değişimler ($\bar{X} \pm s$)



*: Aynı grupta 0. gün CAT aktivitesine göre farklar önemlidir.

Şekil 3. 33. Donörlere antioksidan uygulamasında ve CPDA-1’li torbada saklama süresince eritrosit CAT aktivitesindeki değişimler ($\bar{X} \pm s$)

4. TARTIŞMA

Oksidan/antioksidan durum, insan hekimliğine göre veteriner hekimlikte göreceli olarak yeni bir araştırma alanıdır. Son yıllarda belirgin artış olmakla birlikte, köpeklerde de oksidan/antioksidan durum sınırlı sayıda hastalık ve durumda değerlendirilmiş (Çizelge 1.8), donör köpeklere antioksidan uygulamasının saklanan tam kanın kalitesi üzerine etkilerine ilgili bir araştırmaya da rastlanılmamıştır. Bu nedenle sunulan çalışmada anemili köpeklerde oksidan/antioksidan durumun ve donör köpeklere vitamin E + selenyum uygulamasının saklanan tam kanın kalitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Vücutta oksidan/antioksidan durum ile ilişkili olarak TOS genel MDA özel oksidan, TAK genel SOD, GSH-Px ve CAT da özel antioksidan biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir (Dotan ve ark 2004, Erel 2004, Erel 2005, Valko ve ark 2007, Celi 2010). Kan ve doku örneklerinde bu biyobelirteçlerin ölçümü ile oksidatif stres belirlenebilmektedir (Blumberg 2004, Dotan ve ark 2004). Serum ve dokulardaki antioksidan bileşiminin oldukça farklı olması, henüz tanımlanmayan antioksidanlar ve her bir antioksidanın ayrı ayrı ölçüm gücü, özel antioksidanların klinik ve laboratuvar önemini sınırlandırmaktadır (Lamonta ve ark 1997). Ayrıca, bazı antioksidanlar arasında sinerji nedeniyle yalnızca birinin değerlendirilmesinin, antioksidanların birlikte etkinliklerini yansıtmayabileceği de bildirilmektedir (Nemec ve ark 2000). Bu nedenlerle oksidanların tamamını değerlendiren TOS (Erel 2005) ve serum ya da plazma örneğindeki enzimatik olan ve olmayan antioksidanların ABTS radikalini redükte etmesi prensibine dayalı, genel antioksidan durum hakkında bilgi veren TAK (Erel 2004) ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Bu genel oksidan ve antioksidan biyobelirteçler, köpeklerde de farklı hastalık ve durumlarda oksidan/antioksidan dengenin değerlendirilmesinde kullanılmıştır (Tanja ve ark 2008, Camkerten ve ark 2009, Choi ve ark 2011, Lee 2012, Akça ve ark 2013, Almeida ve ark 2013, Lee ve Kim 2014). Diğer yandan insan hekimliğinde plazma TAK ile özel antioksidanlar arasındaki korelasyonun oldukça zayıf olduğu vurgulanırken (Lamonta ve ark 1997), köpeklerde TAK ile bazı özel antioksidanlar (vitamin A ve E, β -karoten, total bilirubin ve albumin) arasında anlamlı bir ilişkinin bulunmadığı rapor edilmektedir (Nemec ve ark 2000). Bu çalışmada; plazma MDA konsantrasyonu lipid peroksidasyonun belirlenmesinde en sık kullanılan özel biyobelirteç olması (Grotto ve ark 2009, Bast ve Haenen 2013), SOD, GSH-Px ve CAT'ın antioksidan savunma sisteminin enzimatik düzeyde önemli ilk unsurlarını oluşturması (Young ve Woodside 2001,

Durackova 2010) ve oksidan/antioksidan durumun değerlendirilmesinde bu özel oksidan ve antioksidan dezavantajlarının TOS ve TAK ölçümü ile giderilebilmesi nedeniyle, bu çalışmada yukarıda belirtilen genel ve özel biyobelirteçler seçildi.

4.1. Anemili Köpeklerde Oksidan/Antioksidan Durum

Birçok hastalığın seyri veya sonucunda ortaya çıkan anemi, köpeklerde de sık karşılaşılan bir semptomdur (Fry 2010, Thrall 2012). Tüm anemiler için etkili bir antianemik ilaç bulunmamaktadır. Bu nedenle yaşamı tehdit de edebilen bu semptomun etkin ve rasyonel sağaltımı, etyolojinin ortadan kaldırılması yanında semptomatik/destekleyici uygulamaları kapsar (Lanevski ve Wardrop 2001). Etiyolojiye yaklaşım, prognoz tahminlenmesi ve sağaltımda öncelikli girişimin belirlenmesi açısından aneminin tip ve şiddetinin de bilinmesi gerekmektedir (Mills 2010). İnsanlarda farklı etyolojilerdeki anemilerde oksidan/antioksidan durum değişik açılardan değerlendirilmiş (Nagababu ve ark 2008, Aslan ve ark 2011, Khanna ve ark 2010, Akça ve ark 2013) ve antioksidan uygulamalarından olumlu sonuçlar alınmıştır (Iuchi 2012, Madhikarni ve Murthy 2014). Köpeklerde ise oksidan/antioksidan durum özellikle anemi ile de seyreden enfeksiyonlarda incelenmiş (Çizelge 1.13), bu durum ile aneminin şiddet ve tipi arasındaki ilişki sadece renal anemide kısa süre önce rapor edilmiştir (Kogika ve ark 2014). Bu nedenle sunulan çalışmanın birinci bölümünde anemili köpeklerde oksidan/antioksidan durumun, bunun aneminin tip ve şiddeti ile ilişkisinin ve antioksidan endikasyonunun belirlenmesi amaçlandı.

Sağlıklı köpeklerde oksidan/antioksidan durum ile ilgili genel ve özel biyobelirteçlerin normal değerlerine ilgili literatür verileri Çizelge 1.19'da özetlendi. Çizelge 1.19 incelendiğinde; analiz yöntemlerindeki farklılık dışında, hayvan sayısının kısıtlılığı ve incelenen biyolojik örneğin farklı (eritrosit, plazma, idrar) olması dikkati çekmektedir. Bazı biyobelirteçlerdeki aralığın oldukça geniş (**MDA**; 0,73-17,80 $\mu\text{mol/L}$, **CAT**; 0,074-2,10 U/mg HGB, **SOD**; 82,6-4035 U/g HGB, **GSH-Px**; 5,52-494 U/g HGB) olması, söz konusu faktörlere dayandırılabilir. Nitekim oksidatif stresin değerlendirildiği benzer çalışmalarda da analiz sonuçlarının birebir karşılaştırılmasının mümkün olamayabileceği belirtilmektedir (Celi 2010, Niedzwiedz ve Jaworski 2014). Bu çalışmada sağlıklı 20 köpekte belirlenen plazma TOS, TAK ve MDA değerleri ile eritrosit SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinin (Çizelge 3.1, 3.3) bazı çalışmalarda (Çizelge 1.19) bildirilen sınırlar içerisinde yer aldığı görüldü.

Sirkülasyonda eritrositlerin oksidanların çok yönlü etkilerine maruz kalmaları (Nagababu ve ark 2008, Hess 2010, Pandey ve Rizvi 2011) yanında, çoklu doymamış yağ asitleri ve kolestrol bakımından oldukça zengin olmaları ve bu yapıların da kolaylıkla lipid hidroperoksitlere çevrilebilmesi nedeniyle lipoperoksidasyon, MDA ve lipofusin benzeri pigmentler oluşmaktadır (Grotto ve ark 2009). Eritrositlerin oksidanların hasarlarına karşın SOD, GSH-Px ve CAT gibi önemli hücre içi enzimatik antioksidanlar ile glutatyon, vitamin E, askorbat ve peroksiredoksin gibi nonenzimatik antioksidanları içeren güçlü koruyucu sistemleri bulunmaktadır (Chapple 1997, Young ve Woodside 2001, Tanja ve ark 2008, Mohanty 2013, Lang ve ark 2014). Anemi durumlarında da oksidan/antioksidan dengenin oksidan lehine bozulması sonucu oksidatif stresin geliştiği veya şiddetlendiği bildirilmektedir (Nagababu ve ark 2008, Harvey 2010, Khanna ve ark 2010, Iuchi 2012). Anemi olgularında azalan eritrosit sayısı ve hemoglobinin miktarı dokulardaki parsiyel oksijen basıncını azaltmakta ve eritrositler dokulara daha fazla miktarda oksijen vermek zorunda kalmaktadır. Hemoglobin oksidasyonuna neden olan bu durum methemoglobin ve süperoksit oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Balagopalakrishna ve ark 1996). Oluşan methemoglobinin büyük miktarı sitokrom b5 redüktaz ile tekrar fonksiyonel forma dönüştürülmekle birlikte, anemi durumlarında bu süreç yetersiz kalmakta ve methemoglobin konsantrasyonu artmaktadır (Hebert ve ark 2004, Kanas ve Acker 2010). Membranda üretilen hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksitleri ile GSH-Px ve peroksiredoksin-2 enzimleri reaksiyona girer. Bu nedenle GSH-Px aktivitesindeki azalma sonucu membran yüzeyinde nötralize edilemeyen hidrojen peroksitlerin arttığı düşünülmektedir (Hebert ve ark 2004, Nagababu ve ark 2008, Mohanty 2013).

Oksidan/antioksidan dengenin oksidan lehine bozulması plazma TOS'da artış, TAK'de ise azalma ile karakterizedir (Lee ve ark 2014). Total ölçümün yapılmadığı durumlarda ise çoğunlukla serum MDA konsantrasyonundaki artış ve enzimatik antioksidanların (SOD, GSH-Px ve CAT) aktivitelerindeki azalmalar oksidatif stres göstergesi olarak kabul edilmektedir (Valko ve ark 2007). Ancak, oksidatif stresin ortaya konulmasında genel ve özel oksidan ve antioksidan biyobelirteçler her zaman bir örnek değişiklik göstermeyebilir (Celi 2010). Bu durumu TOS artışında normal veya artan TAK değeri, serum MDA konsantrasyonundaki artışa enzimatik önemli antioksidanların azalan, değişmeyen veya artan aktivitelerinin eşlik etmesi ve enzimatik ve nonenzimatik antioksidanların tamamının aynı yönde değişiklik göstermemesini önceki çalışmalar ortaya koymaktadır (Çizelge 1.13). Oksidan/antioksidan durumunun değerlendirilmesindeki bu

zorluk yanında, araştırmaların sınırlı sayıda olması ve kullanılan yöntem ve biyobelirteç farklılıkları çalışma sonuçlarının karşılaştırılmasını güçleştirmektedir (Celi 2010, Niedzwiedz ve Jaworski 2014). Örneğın, bir çalışmada solunum yolu obstruksiyonlu atlarda plazma lipid hidroperoksitleri ve eritrosit redükte GSH, total GSH ve okside GSH düzeylerinde farklılık belirlenmezken (Art ve ark 1999), benzer başka bir çalışmada eritrosit SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri değerlendirilmiş ve SOD aktivitesinde azalma saptanmıştır (Niedzwiedz ve Jaworski 2014). Farklı türlerdeki benzer hastalıklarda oksidan/antioksidan durum sonuçlarının değişken olması, adaptasyon gibi türe özgü faktörlerle ilişkilendirilmektedir (Hermes-Lima ve Zenteno-Savin 2004). Bu çalışmada sağlıklı gruba göre, şiddet ve tipi dikkate alınmaksızın anemili 50 köpeğın plazma ortalama veya ortanca TOS ve TAK değerleri ile MDA konsantrasyonunun önemli düzeylerde yüksek, eritrosit GSH-Px aktivitesinin ise düşük bulunması (Çizelge 3.1), oksidan/antioksidan dengenin bozulduğunu (Bolfalı ve ark 2012, Doyle ve ark 2015) veya oksidatif stresin (Adly 2010) geliştiğini göstermektedir. Anemili 50 köpekteki oksidatif stres gelişimi de araştırmacıların (Hebert ve ark 2004, Nagababu ve ark 2008, Harvey 2010, Khanna ve ark 2010, Mohanty 2013) bildirimlerine dayandırılabilir. Vücutta farklı nedenlere bağlı oksidasyon durumlarında antioksidan savunma sistemleri kompensatorik yanıt kapsamında aktive edilir. Sürekli ve artan serbest radikal üretiminin ise antioksidan savunma sistemlerini zayıflatabileceği belirtilmektedir (Almeida 2013). Hafif-orta düzeyde oksidatif strese maruz kalan organizmanın ilk süreçte antioksidan sistemleri daha etkin düzeyde aktive ettiği bildirilmektedir (Tanja ve ark 2008, Kogika ve ark 2014). Bunun sonucu da ilk aşamada genelinde TAK, özelinde ise farklı yapıdaki antioksidanların düzeyinde azalmalar değil, değişmemesi ve hatta artışları söz konusu olabilmektedir (Chaudri ve ark 2008). Bu kapsamda *B. gibsoni* ile enfekte köpeklerde eritrosit SOD ve CAT aktivitelerinin önemli düzeyde yüksekliği, oksidatif stresi sınırlama amacıyla organizmanın kendini tamir etme mekanizmasıyla açıklanmaktadır (Chaudri ve ark 2008). Bu çalışmada da 50 anemili köpekte plazma TOS artışına TAK azalmasının eşlik etmemesi ve eritrositlerde önemli enzimatik antioksidanların hepsinin azalmaması (Çizelge 3.1), diğerleri dışında antioksidan sistemin kompensatorik yanıt kapsamında aktivasyonunu ve ölçümün bir kez yapılması nedeniyle kan örneklerinin ağırlıklı olarak antioksidan sistemin yetersizliği öncesi alınmış olma olasılığını düşündürmektedir. Ayrıca anemi başlı başına bir hastalık olmadığı ve bu çalışmada da anemili köpeklerde etiyolojik değerlendirilme yapılmadığı için, anemiye yol açan temel hastalıkların genel (TAK) ve özel (SOD, CAT) antioksidanlarda beklenen azalmaların gerçekteleşmemesinde etkinliği düşünülebilir.

İnsanlarda oksidan/antioksidan durum, başta demir noksanlığı anemisi olmak üzere farklı tip ve şiddetteki anemilerde araştırılmıştır (Nagababu ve ark 2008, Aslan ve ark 2011, Khanna ve ark 2010, Tiwari ve ark 2010, Madhikarmi ve Murthy 2011, Iuchi 2012, Akça ve ark 2013). Aslan ve ark (2011) demir noksanlığı anemili hastalarda yüksek TOS düşük TAK değerinin oksidatif stres göstergesi olduğunu, HGB konsantrasyonu ile TAK arasında pozitif bir korelasyon bulunduğunu rapor etmektedirler. Buna karşın Akça ve ark (2013) demir noksanlığı anemili hastalarda TAK değerinin sağlıklı gruba göre farklı olmadığını ve TOS ve TAK değerleri ile HGB konsantrasyonu arasında korelasyon bulunmadığını belirtmektedir. Köpeklerde ise oksidan/antioksidan durum anemilerden ziyade anemiye de yol açan enfeksiyonlar temelinde incelenmiş (Çizelge 1.13), sadece bir araştırmada kronik böbrek yetmezliğindeki anemide oksidan/antioksidan durum ve bunun aneminin şiddeti ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışmada kronik böbrek yetmezliğine bağlı anemili köpeklerde HCT değer ile TBARS düzeyi arasında aneminin şiddetine göre ($HCT > \%22$, $HCT \leq \%22$) her iki grupta negatif bir korelasyon belirlenmiş, fakat oksidatif stres ile aneminin şiddeti arasında kuvvetli bir ilişki belirlenemediği vurgulanmıştır (Kogika ve ark 2014). Bu çalışmada insanlarda demir noksanlığı anemisindeki HGB konsantrasyonu ile TAK arasında pozitif bir korelasyondan (Aslan ve ark 2011) ve köpeklerdeki renal anemide HCT değer ile TBARS düzeyi arasındaki negatif korelasyondan (Kogika ve ark 2014) farklı olarak 50 anemili köpeğin anemi tanı laboratuvar parametrelerinden HGB ve HTC değer ile oksidan (TOS, MDA) ve antioksidan (TAK, SOD, GSH-Px, CAT) biyobelirteçler arasında istatistiksel anlamlı ilişkiler belirlenmedi. Buna karşın 50 anemili köpeğin RBC sayısı ile eritrosit GSH-Px aktivitesi arasında negatif yönlü zayıf ($\rho = -.280$; $p < 0,05$; Çizelge 3.2), hafif anemili grupta HCT değer ile TOS arasında negatif ($\rho = -.527$; $p < 0,05$; Çizelge 3.4) ve nonrejeneratif anemi grubunda ise anemi laboratuvar tanı parametreleri (HCT, RBC, HGB) ile eritrosit GSH-Px aktivitesi arasında anlamlı negatif yönlü ilişkiler (Çizelge 3.6) belirlendi. Genel (TOS, TAK) ve özel (MDA, SOD, GSH-Px, CAT) oksidan/antioksidan durum biyobelirteçler ile anemilerin genel, şiddet ve tipine ilişkin parametreler arasındaki anlamlı ilişkilerin sınırlı olması, öncelikle genel anemi gruplamasında farklı etyopatogenezisi olan anemilerin bir arada değerlendirilmesi ve aneminin şiddetine göre gruplandırılmasında etiyojinin göz önünde bulundurulmasıyla açıklanabilir. Gruplardaki anemili köpek sayısının sınırlı olması da anlamlı bir korelasyon belirlenmemesinde etkili olabilir. Ayrıca, anemi laboratuvar tanı parametrelerinin (HCT, RBC, HGB) tüm anemilerde bir örnek değişim göstermemesi de olası bir faktördür. Bu kapsamda başta

demir noksanlığı olmak üzere mikrositer-normo veya hipokrom anemiye yol açan durumlarda HCT değeri ve HGB konsantrasyonu belirgin olarak azalırken, RBC sayısı referans değerlerinde olabilmektedir (Tvedten 2010).

Şiddeti ve tipi dikkate alınmaksızın anemilerde oksidan/antioksidan durumunun genel olarak bilinmesi yanında, farklı şiddet ve tipteki anemilerde bu durumun değerlendirilmesi ile destekleyici sağaltım kapsamında etkin ve rasyonel antioksidan kullanımı sağlanabilir. Bu çalışmada sağlıklı gruba göre, hafif, orta ve şiddetli anemili gruplarda plazma TOS değeri yüksek (Şekil 3.4) bulunurken, hafif ve orta şiddetli anemilerde plazma TAK değerinin arttığı (Şekil 3.5) eritrosit GSH-Px aktivitesinin ise azaldığı (Şekil 3.6) belirlendi (Çizelge 3.3). Bu durum köpeklerde farklı şiddetteki anemilerde oksidan/antioksidan dengenin bozulduğunu, hafif ve orta şiddetli anemilerde kompenzatorik yanıt kapsamında plazma TAK değerinin arttığını göstermektedir. Sağlıklı (kontrol) gruba göre her iki tipteki (rejeneratif ve nonrejeneratif) anemili köpeklerde plazma TAK ve TOS değerlerinin yüksek olduğu (Şekil 3.15, 3.16) belirlenirken, nonrejeneratif anemili grupta plazma MDA konsantrasyonundaki artış (Şekil 3.17) GSH-Px aktivitesinde ise azalma (Şekil 3.18) istatistiksel anlamlı bulundu (Çizelge 3.5). Her iki tip anemide genel (TOS, TAK), nonrejeneratif anemi grubunda ayrıca özel (MDA, GSH-Px) biyobelirteçlerde anlamlı değişiklikler oksidatif stres ile ilişkilendirilebilir. Rejeneratif gruba göre nonrejeneratif anemili köpeklerde plazma MDA konsantrasyonunun yüksek, eritrosit GSH-Px aktivitesinin ise düşük bulunması (Çizelge 3.5), gelişen oksidatif stresin nonrejeneratif anemili köpeklerde daha belirgin olmasına ve aneminin tipine göre kompenzasyon yeteneğinin farklılığına dayandırılabilir. Rejeneratif anemilerde hemoraji veya hemoliz sonucu ortaya çıkan açık, eritropoezisin artırılması ile hafifletilebilmekte veya kapatılabilmekte (Harvey 2010, Thrall 2012), buna karşın nonrejeneratif anemilerde sınırlanan veya engellenen eritropoezis nedeniyle açık gittikçe şiddetlenmekte, bu durum da ROT'a daha yoğun maruz kalmayı beraberinde getirmektedir (Nagababu ve ark 2008, Lang ve ark 2014). Ek olarak, rejeneratif tipte anemiye neden olan enfeksiyonlarda retikülosit sayısının arttığı ve SOD ile CAT aktivitelerinin retikülositlerde daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Yamasaki ve ark 2000, Otsuka ve ark 2001). Bu çalışmada sağlıklı köpeklere göre rejeneratif ve nonrejeneratif anemili köpeklerde enzimatik antioksidanlardan SOD ve CAT aktivitelerinin anlamlı farklılık göstermemesi, buna karşın her iki anemi tipinde TAK değerlerinin yüksekliği, çeşitli düzeyde oksidatif strese maruz

kalan organizmanın enzimatik olmayan antioksidan sistemleri de aktive ederek verdiği yanıt olarak değerlendirilebilir.

Enzimatik antioksidanlardan GSH-Px'in temel görevi lipid peroksidlerini toksik olmayan alkollere redükte etmektir (Tanja ve ark 2008, Peet 2012). Membranda üretilen hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksidleri ile GSH-Px ve Peroksiredoksin-2 enzimleri reaksiyona girer (Mohanty 2013, Lang ve ark 2014). Bu nedenle GSH-Px aktivitesindeki azalma sonucu membran yüzeyinde nötralize edilemeyen hidrojen peroksidlerin arttığı düşünülmektedir (Nagababu ve ark 2008, Niedzwiedz ve Jaworski 2014). Nitekim bu çalışmada da nonrejeneratif anemili köpeklerde lipid peroksidasyonu belirteci olan serum MDA konsantrasyonunun önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi (Çizelge 3.5). Hafif ve orta şiddetli anemili köpekler ile nonrejeneratif anemili köpeklerde GSH-Px'in aktivitesinin önemli düzeylerde düşüklüğü de (Çizelge 3.3, 3.5), lipid peroksidasyon ürünlerinin nötralize edilmesi amacıyla bu antioksidanın kullanılmasına dayandırılabilir.

4.2. Antioksidan Uygulamasının Saklanan Tam Kanın Kalitesi Üzerine Etkileri

Transfüzyon amacıyla tam kanın saklanması, ulaşılabilirliği arttırmakta ve maliyetini de oldukça düşürmektedir (Lanevski ve Wardrop 2001, Hess 2010). Veteriner hekimlikte kan bankalarının ve kanın bileşenlerine ayrıştırılmasının yaygın olmaması ve ihtiyaç halinde istenilen özelliklere sahip donörün kolayca bulunamaması, alınan tam kanın saklanılarak ihtiyaç halinde kullanılabilmesinin önemini daha da artırmaktadır (Battaglia 2001, Kisielewicz ve Self 2014). Ancak, saklama süresince tam kanda gelişen ve "saklama lezyonları" olarak tanımlanan çok yönlü biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler, istenmeyen sonuçlar doğurabildiği için saklama süresini ve saklanan kanın kullanımını kısıtlamaktadır (Hess 2010, Nneli ve ark 2013). İnsan kanının oksidatif hasar şekillenmeden, güvenli saklama süresinin yaklaşık 10 (Webster ve ark 1986, Ogunro ve ark 2010), 12 (Jozwik ve ark 1997) veya 14 gün (Fagiolo ve ark 1986) olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle günümüzde araştırmalar donörlere verilen veya saklama torbasındaki kana ilave edilen antioksidanlar ile saklama süresindeki olumsuzlukları sınırlandırarak, saklama süresini ve saklanan kanın kalitesini artırmaya yoğunlaşmaktadır (Racek ve ark 1997, Gültekin ve ark 2000a-b, Şekeroğlu ve ark 2012, Hsieh ve ark 2014, Özçelik 2014, Pallotta ve ark 2014). Bu çalışmanın ikinci bölümünde donör köpeklere vitamin E + selenyum uygulamasının CPDA-1 içeren torbalara alınarak +4 °C'de 35 gün saklanan kanın kalitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Selenyum, eritrositlerdeki GSH-Px ve tiyoredoksin redüktaz gibi antioksidan enzimlerin yapısında bulunur (Noaman ve ark 2002). Vitamin E, hücre membranının en önemli antioksidanı olup, lipid peroksit radikallerini redükte ederek daha az toksik formları olan lipid peroksil radikallerine dönüştürür (Ben Amara ve ark 2011). Selenyum ve E vitamini yapı olarak birbirinden farklı antioksidanlar olmakla birlikte, sinerjik etki göstermekte ve hücre membranlarını oksidatif hasardan korumaktadır (Harvey 2010, Behera ve ark 2011). Vitamin E + selenyum çiftlik hayvanlarında ROT etkilerinin azaltılması ve verimin artırılmasına yönelik olarak yaygın kullanım bulmakta (Chauhan ve ark 2014), laboratuvar hayvanlarında ise çeşitli toksik ve/veya radyoaktif ajanlar kullanılarak oluşturulan oksidatif strese koruyucu ve sağaltıcı etkinliği değerlendirilmektedir (Naziroglu ve Cay 2001, Noaman ve ark 2002, Cay ve ark 2009, Ben Amara ve ark 2011, Cemek ve ark 2011, Lan ve ark 2012). Bu kapsamda Yin ve ark (2014) vitamin E + selenyum uygulamasının farelerde deneysel psoriasisde oksidatif stres düzeyini azalttığını, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde artış sağladığını bildirmektedirler. Sarkoptik uyuzlu köpeklerde etyolojik sağaltım yanında 50 mg vitamin E + 1,5 mg selenyum/40 kg VA uygulamasının serum MDA konsantrasyonunun azalmasına, GSH-Px aktivitesinin ise artmasına katkı sağlayarak oksidatif stresi sınırlandırdığı rapor edilmektedir (Behera ve ark 2011). Kapun ve ark (2014), atopik dermatitisli köpeklere günde bir kez 8 hafta süreyle 8,1 IU/kg vitamin E oral uygulamasının plazma vitamin E ve Total Antioksidan Kapasite-Lipofilik (TAK-L) düzeylerini arttığını, incelenen diğer oksidatif stress biyobelirteçlerde (plazma TAK, MDA, kan GSH-Px ve eritrosit SOD) ise anlamlı değişikliklerin saptanmadığını rapor etmektedirler. Birçok hayvan türünde oksidan/antioksidan dengesi antioksidanlar lehinde etkilemesi, oksidatif stresi azaltması ve parenteral uygulanabilmesi nedeniyle, bu çalışmada donör köpeklere vitamin E + selenyum kullanımı tercih edildi. Çalışmada antioksidan grubundaki 7 köpeğe, 14 gün arayla (-15 ve -1. gün) 2 kez, deri altı yolla 150 mg vitamin E + 0,5 mg selenyum/20 kg VA uygulamasında oksidan (TOS, MDA) ve antioksidan (TAK, SOD, GSH-Px, CAT) biyobelirteçlerden plazma MDA konsantrasyonunda $p < 0,05$ düzeyinde azalma ve eritrosit SOD aktivitesinde ise $p < 0,01$ düzeyinde artış saptanırken, diğer biyobelirteçlerde anlamlı değişiklikler belirlenmedi (Çizelge 3.9, 3.10). Bu bulgu, vitamin E + selenyum uygulamasının farelerde (Yin ve ark 2014) ve köpeklere (Behera ve ark 2011) neden olduğu değişikliklere benzerlik göstermektedir. Plazma TAK analizinde plazmadaki hidrofilik ve lipofilik antioksidanların ABTS radikalini redükte etme yeteneği spektrofotometrik yöntemle belirlenmektedir (Dotan ve ark 2004, Erel 2005). Plazma

TAK-L ise yağda çözünen bileşiklerin antioksidan kapasitesi olarak bilinmekte, sadece yağda çözünen antioksidanları kapsamakta ve ölçümünde fotokemiluminescence yöntemi kullanılmaktadır. Kapun ve ark (2014) vitamin E uygulanan atopik dermatitisli köpeklerde plazma TAK değerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını, buna karşın TAK-L değerinin önemli düzeyde arttığını belirlemişlerdir. Söz konusu araştırmacılar analiz yöntemi ile ilişkili TAK değerindeki bu farklılığı, spektrofotometrik yöntem ile TAK ölçümünde α -tokoferol'un plazma TAK'ye katkısının sadece %1,74 olduğu (Cao and Prior 1998) ve hatta plazma α -tokoferol'un 2 kat konsantrasyonunun TAK değerini ölçülebilir ölçüde etkilenmediği (Severin ve ark 1999) şeklindeki bildirimlere dayandırmaktadırlar. Bu çalışmada da vitamin E + selenyum uygulanan donör köpeklerde plazma TAK değerinde beklenen artışın olmaması, antioksidanın uygulama yolu, dozu ve sıklığı dışında, özellikle kullanılan TAK analiz yöntemi ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca, çalışmada vitamin E + selenyum uygulaması öncesi ve uygulamayı takip eden süreçte donör köpeklerin kan/serum vitamin E ve selenyum konsantrasyonlarının ölçülmemesi, uygulanan antioksidanların oksidan/antioksidan duruma etkilerini veya katkılarını detaylandırmayı kısıtlamaktadır.

Transfüzyon amacıyla içerisinde saklama solüsyonu (ACD, CPD, CPDA-1) bulunan torbalara alınarak saklanan tam kanda şekillenen hematolojik, biyokimyasal ve metabolik değişiklikler, bazı parametrelerde bir örnek iken bazılarında türe göre farklılık göstermektedir (Çizelge 1.17, Çizelge 1.18). Saklama sürecinde eritrositlerin ATP düzeyinin azalması ve bazı hücrelerin hemolize uğraması, bir örnek değişiklik olarak görülmektedir. Hemoliz sonucu hücre içindeki K^+ saklama ortamına geçmekte, bu durum da büyük volümde saklanmış kan nakli yapılan hastalarda hiperkalemi gelişiminde katkı sağlayan bir faktör olarak görülmektedir (Hohenhaus 2012). Nolte ve ark (1986), CPDA-1 içeren torbalara alınan köpek tam kanında 21 günlük saklama süresince RBC sayısı ve HGB konsantrasyonunda önemli bir değişiklik olmadığını, HCT değerinin ise azaldığını belirlemişlerdir. Atlarda CPDA-1 solüsyonu içeren torbalara alınan tam kanın 35 günlük saklanmasında ise RBC sayısı ve HGB konsantrasyonunda azalma, HCT değerinde artış saptanmıştır (Barthell 1999). Koyunlarda belirtilen saklama solüsyonu içeren torbalara alınan tam kanda saklama süresince HCT değer değişmezken, RBC sayısında azalma belirlenmiştir (Sousa ve ark 2013). İnsan (Seidl 1991, Adias ve ark 2012) ve kedilerde (Sommer ve ark 1994) tam kanın saklanmasında ise her üç parametrede anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Tam kanın +1-6 °C'de saklanma sürecinde Na^+/K^+ pompasının

bozulması ile ozmotik olarak aktif bileşenlerin hücre içi birikimi ve yüzey alanının azalması sonucu eritrositler şişmektedir (Wolfe 1985). MCV değerindeki artış ile belirlenebilen durumun saklama süresince HCT değerinin artmasına ya da RBC sayısının azaldığı durumlarda da HCT değerinin normal kalmasına neden olduğu belirtilmektedir (Sousa ve ark 2012). MCV değerinin saklama süresince insan (Turner 1987), at (Barthell 1999) ve koyunlarda (Sousa ve ark 2013) arttığı, köpeklerde ise azaldığı (Nolte ve ark 1986) belirtilmektedir. Köpeklerde CPD-SAGM solüsyonu içeren torbalarda saklanan konsantre eritrosit süspansiyonunda 35. gün sonunda MCV ve HCT değerinin arttığı, RBC sayısı ve HGB konsantrasyonunun ise değişmediği bildirilmektedir (Ekiz ve ark 2012). Bu çalışmada CPDA-1 içerikli torbalara kan alımını takiben ilk 2-4 saatlik (0. gün) ve belirli periyotlarla örnekleme yapıldığı 35 günlük saklama süresinde WBC, RBC, HGB, HCT ve PLT değerlerindeki değişimler (Çizelge 3.7) farklı mekanizmalara dayandırılabilir. İlk 2-4 saatlik saklama süresinde (0. gün) her iki grupta RBC, HGB, HCT ve PLT değerlerinde, antioksidan grupta WBC sayısındaki azalmalar, öncelikle içerisinde 42 ml CPDA-1 solüsyonu bulunan torbalara alınan kanda oluşan hemodilüsyonla açıklanabilir. Her iki grupta 35 günlük saklama süresince RBC sayısı ve HGB konsantrasyonu değişmezken, HCT değerinde anlamlı artış belirlendi (Çizelge 3.7). Eritrosit indeks parametrelerinden de MCV değerinde artış, MCH ve MCHC değerlerinde ise azalma saptandı (Çizelge 3.7). HCT değerinin artması, saklama süresince ozmotik dengesi bozulan eritrositlerin şişmesi sonucu MCV değerindeki artışla (Ekiz ve ark 2012, Sousa ve ark 2012), MCH ve MCHC değerlerindeki azalma ise saklama sonucu şişen eritrosit içerisindeki hemoglobin miktarı değişmemesine rağmen ortalama hemoglobin miktar ve konsantrasyonlarının azalmasıyla (Turhan ve ark 2011) ilişkilendirilebilir. WBC sayısının zamanla gösterdiği azalma ile istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte PLT sayısındaki azalma eğilimi (Çizelge 3.7), diğerleri dışında bu hücrelerin kısa yaşam süreleri (Nolte ve ark 1986, Sommer ve ark 1994, Harvey 2010) ile açıklanabilir. Çalışmada hematolojik parametrelerde belirlenen değişiklikler önceki araştırmalarla (Price ve ark 1988, Barthell 1999, Ekiz ve ark 2012) büyük ölçüde uyumlu olup, önceki bazı çalışmalara (Çizelge 1.17) paralellik göstermemesi türe özgü farklılığa dayandırılabilir.

Saklama süresinde eritrositlerin oksidatif hasarı membran bütünlüğünün bozulmasına ve lizise neden olur (Kaniyas ve Acker 2010). Oksidanların membran lipidleri ve proteinleri üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle, oksidatif stres hemoliz düzeyini artırır (Dumaswala ve ark 1999, Marjani ve ark 2007), saklama lezyonlarına katkı sağlar

(D'Alessandro ve ark 2015). Oksidatif hasarın eritrositleri hemolize daha duyarlı kılması, saklama süresinde ozmotik frajilitenin artması ve sonucunda HGB, K^+ ile LDH gibi intraselüler enzimlerin süpernatant plazmaya bırakılması ile gösterilmiştir (Ziouzenkova ve ark 1999, Chaudhary ve Katharia 2012). Bu anlamda hemoliz, saklanan tam kanın kalitesini etkileyen, bu nitelikteki tam kanın transfüzyon amacıyla kullanılması durumunda birçok yan etkiye yol açabilecek ve plazma HGB ve K^+ konsantrasyonları ile LDH aktivitesi ölçülerek takip edilebilen bir durumdur (Marjani 2006, Sousa ve ark 2012). Potasyum dengesi ATP'ye bağımlı olarak çalışan sodyum-potasyum pompası ile sağlanmaktadır. Tam kanın saklanma sürecinde serum/plazma K^+ konsantrasyonundaki artış, temel olarak ATP yıkımına bağlı gelişmektedir (Wolfe 1985, Hess 2010). İnsanlarda saklanan tam kanda plazma HGB konsantrasyonunun 0,8 mg/dL, K^+ konsantrasyonunun ise 60 mmol/L üzerine çıkması durumunda kanın kullanılmaması gerektiği belirtilmektedir (Sousa ve ark 2012). Plazma HGB konsantrasyonu (Sousa ve ark 2012, Collard ve ark 2014) ve LDH aktivitesi (Mudge ve ark 2004, Marjani 2006) 42 güne kadar saklama süresince farklı türlerde benzer düzeyde artışlar göstermiştir. Buna karşın plazma K^+ konsantrasyonunun türlere göre farklı düzeyde arttığı, bunun da eritrosit içi K^+ konsantrasyonunun türler arasında belirgin farklılık göstermesinden (Çizelge 1.16) ileri geldiği rapor edilmektedir (Sousa ve ark 2012). Bu bağlamda CPDA-1 solüsyonu içeren torbalarda saklama süresi sonunda plazma K^+ konsantrasyonunun insanlarda 20,78 mmol/L (Marjani 2006), atlarda 17,3 mmol/L (Mudge ve ark 2004), koyunlarda 22,85 mmol/L (Sousa ve ark 2013) ve sığırlarda 9,96 mmol/L (Filho ve ark 1993) düzeyine kadar yükselebildiği, kedilerde 4,8 mmol/L (Bertoletti 2011) ve köpeklerde ise 5,1 mmol/L'ye (Costa Junior 2006) kadar çıktığı saptanmıştır. Türler arasındaki bu farklılığın özellikle köpek ve kedilerde eritrosit içi K^+ konsantrasyonunun daha düşük olmasıyla ilişkili olduğu vurgulanmaktadır (Sousa ve ark 2012). Bu çalışmada 35 günlük saklama süresince plazma K^+ konsantrasyonunun her iki grupta da anlamlı olarak arttığı ve antioksidan grupta 4,72 mmol/L, kontrol grubunda ise 5,02 mmol/L'ye ulaştığı saptandı (Çizelge 3.8). Saklama süresince her bir örnekleme zamanında iki grubun plazma K^+ konsantrasyonları arasındaki farklar istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte, antioksidan grupta artışların daha sınırlı kaldığı görüldü (Şekil 3.25). Saklama süresince plazma HGB konsantrasyonu (Şekil 3.26) ve LDH aktiviteleri (Şekil 3.27) de beklendiği gibi her iki grupta da artış göstermiş, fakat gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık belirlenmemiştir. Bu bulgular, saklama süresince lipid peroksidasyonu ve çeşitli etkiler sonucu membran yapısı bozulan eritrositlerde permeabilitenin artarak içeriğin plazmaya verilmesi yanında hemolizin de

geliştiğini (Ziouzenkova ve ark 1999, Marjani 2006, Chaudhary ve Katharia 2012, Sousa ve ark 2012), donör köpeklere vitamin E + selenyum uygulamasının hemoliz göstergesi bu parametrelere etkisinin sınırlı kaldığını göstermektedir.

Kanda *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda Şekillenen oksidatif stresin varlık ve derecesi, hemolize ilgili bulgular yanında plazma/serum ve tam kanda bazı biyobelirteçlerin ölümü ile ortaya konulabilmektedir (Dotan ve ark 2004, Bast ve Haenen 2013). Ağırlıklı olarak insanlarda, birer çalışmada da köpek ve ratlarda saklanan tam kan ve/veya eritrositlerde oksidan/antioksidan duruma ilgili biyobelirteçlerin davranışları değerlendirilmiş ve genel (**TOS**) ve  zel (MDA) oksidanlarda genellikle artışlar, genel (**TAK**) ve özel antioksidanlarda (SOD, GSH-Px ve CAT) ise çoğunlukla azalmalar saptanmıştır ( izelge 1.18). Bu çalışmada vitamin E + selenyum (antioksidan) ve %0,9 NaCl solüsyonu (kontrol) uygulanan gruptaki donör köpeklerden CPDA-1 içeren torbalara alınarak +4  C'de 35 gün saklanan tam kanda plazma TOS değerinin arttığı, TAK değerinin ise azaldığı ve TAK değerindeki değişim açısından 2 grup arasında farklılığın istatistiksel olarak  nemsizliğine karşın, plazma TOS değerindeki artışın gruplar arasında ve zaman-grup ilişkisinde anlamlı olduğu saptandı ( izelge 3.9; Şekil 3.28, 3.29). Saklanan köpek tam kanında oksidan/antioksidan duruma ilgili genel biyobelirteçlerdeki (TOS, TAK) bu değerlikler saklama süresince serbest radikal üretiminin artarak (Erel 2004, Erel 2005, Lee ve Kim 2012) oksidatif stresin geliştiğini göstermekte ve önceki çalışmalarda insan kanında belirlenen değerimlere ( izelge 1.18; Marjani 2006, Ogunro ve ark 2010, Sekeroglu ve ark 2012) genelde paralellik göstermektedir. Plazma TOS değerindeki artış saklama süresinde oksidanların düzeyindeki artışla, artışın vitamin E + selenyum uygulanan grupta daha sınırlı kalması da ( izelge 3.9; Şekil 3.28) antioksidan uygulamasının saklama süresinde gelişen oksidatif hasarı azaltması ile açıklanabilir. Plazma TAK değerindeki azalma da gelişen oksidatif hasarı hafifletmek veya ortadan kaldırmak amacıyla antioksidanların kullanılması, azalmanın antioksidan grupta daha sınırlı kalması da ( izelge 3.9; Şekil 3.29) vitamin E + selenyum uygulamasına dayandırılabilir. Plazma TAK değerine  -tokoferol'un katkısı %1,74 gibi oldukça düşüktür (Cao and Prior 1998). Bu  alışmada TAK değeri özel bir formda (TAK-L)  l lmediği (Kapun ve ark 2012) için vitamin E + selenyum uygulamasını takiben bu biyobelirte te beklenen artışın gerçekleşmediği, saklanan tam kanda ise antioksidan kullanımının/tüketiminin artması sonucu TAK değerinin azaldığı d ş n ld .

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan **MDA**, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açmakta ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olmaktadır (Pfafferott ve ark 1982, Dumaswala ve ark 1999). MDA oksidatif hasarın varlık ve şiddetinin belirlenmesinde en sık kullanılan ve ölçümü önerilen biyobelirteç olmakla birlikte, lipid peroksidasyonu her zaman oksidatif stresin global kriteri olmayabilir (Dotan ve ark 2004). MDA ölçümü, tiyobarbitirik asit ile MDA reaksiyonunun ölçülebilen renkli bir bileşik vermesi esasına dayanır (Yoshoiko ve ark 1979). Bu yöntemde TBA ile reaksiyon veren maddeler ölçülmekte ve literatürlerde TBARS olarak da yer almaktadır (Grotto ve ark 2009, Valko ve ark 2007). Plazma MDA konsantrasyonu, farklı hastalıklarda (Çizelge 1.8, Çizelge 1.13) ve transfüzyon amacıyla saklanan tam kan veya eritrositlerde (Çizelge 1.18) oksidan/antioksidan durumun belirlenmesi amacı ile ölçülmüş ve bir örnek değişiklik olarak artış saptanmıştır. Bu çalışmada transfüzyon amacıyla CPDA-1 içeren kan torbalarına alınarak saklanan kanda oksidan durum değerlendirilirken plazma TOS değeri yanında, plazma MDA konsantrasyonu da ölçüldü. Vitamin E + selenyum (antioksidan) ve %0,9 NaCl solüsyonu (kontrol) uygulanan gruplardaki donör köpeklerden alınarak +4 °C'de 35 gün saklanan tam kanda plazma MDA konsantrasyonu zamanla önemli artış gösterirken gruplar arasında ve zaman-grup ilişkisi açısından istatistiksel anlamlı farklılıklar olmadığı görüldü (Çizelge 3.10; Şekil 3.30). Araştırmanın bu sonuçları, önceki çalışmalarda (Çizelge 1.18) bildirildiği gibi tam kanın 35 gün boyunca saklanması eritrositlerde lipid peroksidasyonu oluşturduğunu ve eritrositlerdeki endojen antioksidan sistemin oksidatif hasarı engelleyemediğini göstermektedir.

Serbest radikallerin aktif oksijen türevleri olan oksidanların hücre zarını, DNA, RNA gibi genetik materyali ve değişik enzimatik olayları etkileyerek yol açtığı hücre hasarları (Valko ve ark 2007, Durackova 2010), organizmanın antioksidan savunma sistemi kapsamında **SOD**, **GSH-Px** ve **CAT** enzimleri tarafından nötralize edilirler ve sonuç olarak bu enzimlerin eritrositlerdeki aktiviteleri azalır (Young ve Woodside 2001, Nagababu ve ark 2008). Transfüzyon amacıyla alınan kanın saklanması süresince eritrositlerin sahip olduğu SOD, GSH-Px ve CAT enzimleri ile sağlanan antioksidan kapasitedeki azalma da oksidatif stresin bir başka göstergesidir (Jozwik ve ark 1997, Şekeroğlu ve ark 2012, Niedzwiedz ve Jaworski 2014). Saklanan tam kanda eritrosit SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinde azalmalar her 3 enzimi kapsamayabilmekte, aktivite(ler)de anlamlı değişiklik görülmeyebilmekte ve hatta aktiviteler artabilmektedir

(Çizelge 1.18). Eritrosit antioksidan enzimlerinin arttığı ya da değişmediği bu dönem, oksidatif strese karşı antioksidan sistemin aktive olduğu ilk birkaç haftalık süreci kapsar (Sekeroglu ve ark 2012, Hsieh ve ark 2014). Bu antioksidan biyobelirteçlerdeki azalma ise saklama süresince kan torbasındaki eritrosit antioksidan savunma sisteminin tükenmesi (Jozwik ve ark 1997, Korgun ve ark 2001) ve enzimlerin kararsız ve aktivitelerini hızla kaybeden yapılar olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Ozcelik 2014). Saklanan tam kanda eritrosit SOD aktivitesinin azaldığını bildiren çalışmalar (Jozwik ve ark 1997, Ozcelik 2014) çoğunlukta olmakla birlikte, saklama süresinin 3 haftanın altında olduğu ve antioksidan ilavesinin değerlendirildiği çalışmalarda (Racek ve ark 1997) bu enzimin aktivitesinin değişmediği ya da arttığı (Hsieh ve ark 2014) rapor edilmektedir. Hsieh ve ark (2014) saklanan fare kanında 20 gün sonunda SOD aktivitesinin arttığını, bu durumun oluşan süperoksit radikalleri ve oksidatif strese karşı geliştiğini belirtmektedir. İnsan kanının saklandığı torbaya melatonin ilavesinin etkilerini değerlendirildiği bir çalışmada (Özçelik 2014), kontrol grubunda 3. hafta sonunda SOD aktivitelerinin ilk güne göre azaldığı, melatonin ilave edilen grupta ise enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu rapor edilmektedir. Söz konusu çalışmada bu durum enzimlerin kararsız yapısı nedeniyle aktifliğini kaybetmesi ve serbest radikaller ile lipid peroksidasyon ürünlerine maruz kalmasıyla açıklanmakta, melatonin ilave edilen grupta ise melatoninin eritrosit SOD enzim aktivitesini inhibe eden toksik ürünleri engelleyerek enzim yapısını koruması ve oksidatif stres düzeyini azaltarak lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumunu azaltmasıyla ilişkilendirilmektedir. GSH-Px, eritrositlerdeki primer antioksidan enzim olarak tanımlanmakta ve genel olarak saklama süresi sonunda azaldığı bildirilmektedir (Jozwik ve ark 1997, Marjani ve ark 2007, Ogunro ve ark 2010). İnsan kanının CPD içerikli torbalarda 28 günlük saklama süresince eritrosit SOD ve GSH-Px aktivitelerinin azaldığı, CAT aktivitesinin ise değişmediği belirlenmiştir (Sekeroglu ve ark 2012). CAT eritrositleri akut ve yüksek konsantrasyondaki ekzojen hidroksil radikalinin oluşturacağı hasara karşı korumakta, GSH-Px ise sürekli ve düşük düzeydeki endojen hidroksil radikale karşı etki etmektedir (Eaton 1991). Bu kapsamda tam kanın saklama süresince oluşan endojen hidroksil radikalinin yüksek konsantrasyonlara çıkmadığı durumlarda eritrosit CAT aktivitesinin değişmeyebileceği vurgulanmaktadır (Sekeroglu ve ark 2012). Bu çalışmada +4 °C'de 35 gün saklanan tam kanda saklama süresince eritrosit SOD ve GSH-Px aktiviteleri önemli düzeylerde azalırken (Çizelge 3.10; Şekil 3.31, 3.32), eritrosit CAT aktivitesinin zamanla gösterdiği değişimin anlamlı olmadığı (Çizelge 3.10; Şekil 3.33) belirlendi. Çalışmada eritrosit antioksidan enzimlerin tam kanın saklanmasında

gösterdikleri değişimler önceki çalışmalarla (Dumaswala ve ark 1999, Marjani ve ark 2007, Ogunro ve ark 2010, Sekeroglu ve ark 2012) uyumlu olup, saklama süresinde eritrosit SOD ve GSH-Px aktivitelerinde önemli azalmalar bu enzimlerin oksidanların etkilerini gidermede kullanımı yanında kararsız ve aktivitelerini hızla kaydeden yapılar olmasına, eritrosit CAT aktivitesinin değişiklik göstermemesi de ekzojen hidroksil radikalinin konsantrasyonuna dayandırılabilir.

Donör insanlara farklı antioksidanları (36 mg β -karoten, 200 mg vitamin C, 300 mg vitamin E, 40 mg selenyum) içeren bir preparat oral olarak 10 gün verildikten sonra CPD içeren torbalara alınarak saklanan kanda SOD aktivitesi kontrol grubunda azalma gösterirken antioksidan uygulanan grupta değişmemiştir (Racek ve ark (1997). Donör insanlardan CPDA-1 içeren torbalara alınıp melatonin ilave edilerek saklanan kanda da eritrosit antioksidan enzimlerden SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu rapor edilmektedir (Özçelik 2014). Bu çalışmada da vitamin E + selenyum uygulanan gruptaki donör köpeklerden CPDA-1 içeren kan torbalarına alınarak +4 °C'de 35 gün saklanan tam kanda eritrosit SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre önemli düzeylerde yüksek olduğu (Çizelge 3.10; Şekil 31), saklama süresinde antioksidan uygulanan grubunun eritrosit GSH-Px aktivitesi büyük ölçüde düzeyini korurken kontrol grubunda belirtilen enzimin aktivitesindeki azalmanın devam ettiği (Çizelge 3.10; Şekil 32) görüldü. Bu bulgular araştırmalarla (Racek ve ark 1997, Özçelik 2014) benzerlik göstermekte ve transfüzyon amacıyla kan alımından önce donör köpeklere sc vitamin E + selenyum uygulamasının CPDA-1 içeren torbalara alınarak saklanan kanda gelişen oksidatif stresi azaltabileceğine işaret etmektedir.

4. SONUÇ

Köpeklerde anemi birçok hastalığın seyri veya sonucunda ortaya çıkan, şiddetli olduğunda yaşamı tehdit eden bir semptomdur (Fry 2010). Bu semptomun etkin ve rasyonel sağaltımı, anemiye neden olan hastalık veya durumun belirlenip ortadan kaldırılması ile mümkündür (Chervier ve ark 2012). Ayrıca aneminin tip ve şiddetine göre farklı destekleyici ve semptomatik sağaltım uygulamaları yapılabilir. Bu kapsamda insanlarda demir noksanlığı anemisi başta olmak üzere bazı anemilerde oksidatif stresin geliştiği, böyle hastalara antioksidan verilmesinin aneminin düzeltilmesi üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (Aslan ve ark 2011, Madhikarmi ve ark 2014). Bu çalışmada da anemili köpeklerde büyük ölçüde aneminin tip ve şiddetinden bağımsız oksidatif stres belirlendi. Çalışma anemili köpeklerde oksidan/antioksidan durumun belirlenmesine yönelik olduğu için, antioksidan uygulamasının anemili köpeklerde etkileri değerlendirilmedi. İleride anemili köpeklerde antioksidan uygulamasının etkilerine yönelik bir çalışma, anemi sağaltımı açısından anlamlı olabilir.

Saklama sürecinde tam kanda her bir komponentin saklamaya bağlı gelişebilecek biyokimyasal ve fiziksel değişikliklerden en az düzeyde etkilenerek canlılıklarını ve fonksiyonlarını sürdürebilmeleri istenmelidir (D'Alessandro ve ark 2015). Oksidatif hasar, tam kanın saklanmasıyla ortaya çıkan hasar mekanizmaları arasında önemli bir yer tutmakta ve CPDA-1 içeren torbalarda saklanan insan tam kanına farklı antioksidanların eklenmesi bu hasarlar üzerine faydalı etkiler yapmaktadır (Gültekin ve ark 2000a,b, Sekeroglu 2012, Özçelik 2014, Pallota ve ark 2014). Bu çalışmada donör köpeklere vitamin E + selenyum uygulamasının bu hayvanlardan CPDA-1 içeren torbalara alınarak +4° C'de saklanan kanda genel ve özel oksidan/antioksidan durum biyobelirteçlere etkileri birlikte değerlendirildiğinde, bu antioksidan uygulamasının serbest radikallerce oluşturulan bazı hücre hasarlarını azaltarak, saklanan kanın kalitesini artırdı.

Sonuç olarak, anemili köpeklerde oksidatif stresin aneminin tip ve şiddetinden büyük ölçüde bağımsız geliştiği, donör köpeklere kan alımı öncesi 14 gün arayla 2 kez, deri altı yolla, 150 mg vitamin E + 0,5 mg selenyum/20 kg VA uygulamasının serbest radikallerin bazı zararlı etkilerini azaltarak saklanan kanın kalitesini artırdığı belirlendi. Bu sonuçlara dayanarak, anemili köpeklerde destekleyici sağaltım kapsamında, donör köpeklere de kan alımı öncesi farklı doz ve kombinasyonlarda antioksidan uygulamasının etkilerinin değerlendirilmesine yönelik araştırmaların yürütülmesinin yararlı olabileceği kanısına varıldı.

ÖZET

Anemili Köpeklerde Oksidatif Stres ve Donörlere Vitamin E + Selenyum Uygulamasının Saklanan Tam Kanın Kalitesi Üzerine Etkileri

Bu çalışmada anemili köpeklerde aneminin şiddeti ve tipi dikkate alınarak oksidatif stresin değerlendirilmesi ve donör köpeklere vitamin E + selenyum uygulamasının CPDA-1 içeren torbalara alınarak saklanan tam kanın kalitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmada farklı ırk, yaş ve her iki cinsiyetten 50 anemik, 14'ü donör özelliğinde olmak üzere 20 sağlıklı toplam 70 köpek kullanıldı. Anemili 50 köpek HCT değeri kullanılarak hafif (n=18), orta (n=18) ve şiddetli (n=14) anemik, absolut retikosit sayısına göre de rejeneratif (n=26) ve nonrejeneratif (n=24) olarak gruplandırıldı. Sağlıklı 20 köpek de kontrol olarak tutuldu. Donör özelliği taşıyan 14 köpek antioksidan ve kontrol olmak üzere iki eşit gruba (n=7) ayrıldı. Antioksidan grubundaki köpeklere 14 gün arayla (-15 ve -1. gün) 2 kez, deri altı yolla, 150 mg vitamin E + 0,5 mg selenyum/20 kg VA, kontrol grubundaki donörlere ise aynı günlerde eşit hacimde %0,9 NaCl uygulamaları yapıldı. İkinci uygulamalardan bir gün sonra CPDA-1'li torbalara alınarak +4 °C'de saklanan tam kanda 0., 1., 3., 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde alınan örneklerde ölçümler gerçekleştirildi. Hematolojik değerlendirmeler WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC ve PLT ölçümlerini kapsadı. Oksidan-antioksidan durumun değerlendirilmesi kapsamında plazma TOS ve TAK değerleri, MDA konsantrasyonu ile eritrosit SOD, GSH-Px ve CAT aktiviteleri ölçüldü.

Ölçümler anemili ve sağlıklı köpeklerde bir kez yapılırken, antioksidan ve kontrol grubundaki köpeklerde vitamin E + selenyum veya %0,9 NaCl solüsyonu uygulama öncesi ve sonu olmak üzere iki kez gerçekleştirildi. Saklanan tam kanda yukarıda belirtilen 8 örnekleme zamanında hematolojik parametreler ve oksidan-antioksidan durum biyobelirteçleri ölçüldü.

Elli anemili köpekte aneminin şiddet (HCT) ve tipine (retikulosit sayısı) göre gruplandırmalarda kullanılan parametreler ile oksidan (TOS, MDA) ve antioksidan (TAK, SOD, GSH-Px, CAT) biyobelirteçler arasında istatistiksel anlamlı ilişkiler belirlenmedi. Sağlıklı gruba göre 50 anemili köpeğin plazma ortalama veya ortanca TOS ve TAK değerleri ile MDA konsantrasyonu önemli düzeylerde yüksek, eritrosit GSH-Px aktivitesi ise düşük bulundu. Şiddetine göre tüm anemi gruplarında plazma TOS değeri yüksek

bulunurken, hafif ve orta şiddetli anemilerde plazma TAK değerinin arttığı, eritrosit GSH-Px aktivitesinin ise azaldığı belirlendi. Sağlıklı (kontrol) gruba göre, her iki tipteki (rejeneratif ve nonrejeneratif) anemili köpeklerde plazma TAK ile TOS değerlerinin yüksek olduğu belirlenirken, nonrejeneratif anemili grupta plazma MDA konsantrasyonundaki artış GSH-Px aktivitesinde ise azalma istatistiksel anlamlı bulundu.

On dört gün arayla 2 kez vitamin E + selenyum uygulanan donör köpeklerde WBC, RBC, HCT, HGB ve MDA değerleri önemli ($p<0,05$) düzeyde azalma, plazma HGB konsantrasyonu ($p<0,05$) ve eritrosit SOD aktivitesi ($p<0,01$) ise artış gösterdi.

Antioksidan ve kontrol grubu donörlerden CPDA-1 içerikli torbalara kan alımını takiben ilk 2-4 saatlik saklama süresinde (0. gün) her iki grupta RBC, HGB, HCT, PLT ve K^+ değerlerinde azalmaların, plazma TAK değerinde ise artışların anlamlı olduğu saptandı. Antioksidan grupta WBC sayısındaki azalma eritrosit GSH-Px aktivitesindeki artış, kontrol grubunda ise MCV değerindeki artış MCHC değerinde azalma önemli bulundu.

Tekrarlı ölçümler varyans analizi; $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 35 günlük saklama süresince tam kanda WBC, HCT, MCV, MCH ve MCHC değerlerinin zamanla önemli değişimler gösterdiği, bu değişimlerin farklı uygulamaların (vitamin E + selenyum veya %0,9 NaCl) yapıldığı iki grup arasında farklı olmadığını ve anlamlı zaman-grup etkileşiminin bulunmadığını gösterdi. Saklama süresince plazma K^+ ve HGB konsantrasyonları ile LDH aktivitesinin önemli düzeylerde arttığı, bu değişimin gruplar arasında ve LDH dışında zaman-grup etkileşimlerinin anlamlı olmadığı saptandı. Saklanan tam kanda plazma TAK konsantrasyonu ile eritrosit SOD ve GSH-Px aktiviteleri önemli düzeylerde azalırken, plazma TOS ve MDA değerlerinin zamanla gösterdiği değişim (artış) anlamlı bulundu. TOS değerindeki artışın, SOD aktivitesinde ise azalmanın gruplar arası ve zaman-grup etkileşiminin önemliliği saptandı.

Sonuç olarak, anemili köpeklerde oksidatif stresin geliştiği, gelişen oksidatif stresin aneminin tip ve şiddetinden büyük ölçüde bağımsız olduğu, donör köpeklere kan alımı öncesi 14 gün arayla 2 kez deri altı yolla vitamin E + selenyum uygulamasının, serbest radikallerin bazı zararlı etkilerini azaltarak saklanan kanın kalitesini arttırdığı belirlendi. Bu sonuçlara dayanarak, anemili köpeklerde sağaltım kapsamında, donör köpeklere de kan alımı öncesi farklı doz ve kombinasyonlarda antioksidan uygulamasının etkilerinin değerlendirilebilmesine yönelik araştırmaların yürütülmesinin yararlı olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: anemi, antioksidan, köpek, oksidatif stres, tam kan saklama

SUMMARY

Oxidative Stress in Dogs with Anemia and Effects of Vitamin E + Selenium

Application to Donors on Quality of Stored Whole Blood

The aims of the present study were to evaluate the oxidative stress in dogs with anemia by taking into account the severity and type of anemia and to determine the effects of vitamin E + selenium application to donor dogs on the quality of stored whole blood in bags containing CPDA-1.

Fifty dogs with anemia and 14 out of 20 healthy dogs presenting donor features with a total of 70 dogs of various breeds, ages and of both sexes were enrolled into the study. Fifty dogs with anemia were classified as mildly (n=18), moderately (n=18) and severely (n=14) anemic by HCT value, regenerative (n=26) and nonregenerative (n=24) also by absolute reticulocyte count. Twenty dogs were kept as control. Fourteen dogs with donor property were divided into two equal groups (n=7) as antioxidant and control. Dogs in the antioxidant group received 150 mg of vitamin E + 0.5 mg selenium/20 kg BW subcutaneously for two portions with fourteen days interval (-15th and -1st days) while the donors in control group were administered an equal volume of 0.9% NaCl on the same days. Measurements were performed on samples collected at days 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28 and 35 from whole blood collected into CPDA-1 bags and stored at +4 °C one day after the second application. Hematological evaluations included WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC and PLT measurements. TOS, TAC and MDA values in plasma and erythrocyte SOD, GSH-Px, CAT activities were measured in respect to evaluate the oxidant-antioxidant status.

Analysis were carried out once in anemic dogs and healthy group while from the dogs in the antioxidant and control groups were carried out twice, before and after the second vitamin E + selenium or 0.9% NaCl application. Hematological parameters and oxidant-antioxidant status biomarkers were measured on stored whole blood at the above-mentioned 8 sampling times.

There were no statistically significant relations between severity (HCT) and type (number of reticulocytes) of anemia and oxidant (TOS, MDA) and antioxidant (TAC, SOD, GSH-Px, CAT) biomarkers in 50 dogs with anemia. Plasma mean or median TOS and TAC values and MDA concentration were significantly higher, and erythrocyte GSH-Px activity was significantly lower in 50 anemic dogs when compared with healthy group. Plasma TOS value was increased in all groups according to the severity of anemia, while a

significant increase in TAC value and a significant decrease in erythrocyte GSH-Px activity in mild and moderate anemia. Plasma TOS and TAC values were higher in both types of anemic (regenerative and nonregenerative) dogs when compared with healthy group, a significant increase in plasma MDA concentration and a significant decrease in GSH-Px activity were observed in nonregenerative group.

WBC, RBC, HCT, HGB and MDA levels decreased ($p < 0.05$) significantly while level of plasma HGB concentration ($p < 0.05$) and erythrocyte SOD activity ($p < 0.01$) increased in the donor dogs administered vitamin E + selenium applied two times with fourteen days interval.

The decreases in RBC, HGB, HCT, PLT and K^+ values and increase in plasma TAC value of both group were determined significant in the first 2-4 hours of storage time after collecting blood to bags containing CPDA-1. Decrease in WBC count and increase in GSH-Px activity of antioxidant group and increase in MCV value and decrease in MCHC value of control group were statistically significant.

Repeated measures analysis of variance showed significant alterations in WBC, HCT, MCV, MCH and MCHC values over time but differences between groups and time by group interaction were not significant in storage of whole blood at $+4^\circ\text{C}$ for 35 days. Plasma K^+ and HGB concentrations and LDH activity increased significantly over time but differences between groups and time by group interaction were not significant except LDH. Plasma TAC concentration and erythrocyte SOD, GSH-Px activities decreased while plasma TOS and MDA levels increased significantly over time. There was a significant effect of group and time by group interaction as increase in TOS value and decrease in SOD activities.

In conclusion, oxidative stress develops in dogs with anemia and it is largely independent from the severity and type of anemia. Secondly subcutaneous vitamin E + selenium administration to the donor dogs prior to blood collection two times with fourteen days interval improves the quality of stored blood by reducing some harmful effects of free radicals. Based on these results, it was suggested that further studies may be useful for evaluating the efficacy of antioxidant application with different doses and combinations as part of treatment in anemic dogs and prior to blood collection to donor dogs.

Keywords: anemia, antioxidant, dog, oxidative stress, whole blood storage

KAYNAKLAR

Adly AM. Oxidative stress and disease: an updated review. *Research Journal of Immunology* 2010; 3 (2): 129-145.

Alkan UF, Bakirel T, Üstüner O, Yardibi H. In vitro effects of doxorubicin and deracoxib on oxidative-stress-related parameters in canine mammary carcinoma cells. *Acta Veterinaria Hungarica* 2014; 62 (3): 372-385.

Almeida BFM, Narciso LG, Melo LM, Preve PP, Bosco AM, Lima VMF, Ciarlini PC. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. *Veterinary Journal* 2013; 198(3): 599-605.

Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *British Journal of Haematology* 2006; 132: 108-113.

Anonim. Randox Lab., Manual/Sinnowa D280. Ransod superoxide dismutase enzim kiti, Ransel glutathione peroxidase enzim kiti. 2004.

Art T, Kirschvink N, Smith N, Lekeux P. Indices of oxidative stress in blood and pulmonary epithelium lining fluid in horses suffering from recurrent airway obstruction. *Equine Veterinary Journal* 1999; 31:397-401.

Askar TK, Salmanoglu B, Salmanoglu R, Erkal N, Beskaya A. Changes in the oxidative status and serum trace element levels in dogs with mammary tumours. *Acta Veterinaria* 2009; 59(4):405-411.

Aslan M, Horoz M, Celik H. Evaluation of oxidative status in iron deficiency anemia through total antioxidant capacity measured using an automated method. *Turkish Journal of Hematology* 2011; 28: 42-6

Aydin I, Bulbul A, Avci GE, Celik HA. Serum oxidative status and adenosine deaminase activity in dogs with transmissible venereal tumour. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2009; 53(4):771-774.

- Balagopalakrishna C, Manoharan PT, Abugo OO, Rifkind JM. Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions. *Biochemistry* 1996; 35: 6393–6398.
- Barthel B. Functionell changes in red blood cells during storage in units of full blood or erythrocyte concentrates of the horse. *Doktora Tezi, Freie Universitesi, Berlin, Almanya*, 1999.
- Bast A, Haenen GRMM. Ten misconceptions about antioxidants. *Trends in Pharmacological Sciences* 2013; 34(8):430-436.
- Behera SK, Dimri U, Singh SK, Mohanta RK. The curative and antioxidative efficiency of ivermectin and ivermectin + vitamin E-selenium treatment on canine *Sarcoptes scabiei* infestation. *Veterinary Research Communications* 2011; 35(4): 237-244.
- Beigh SA, Soodan JS, Singh R, Khan AM, Dar MA. Evaluation of trace elements, oxidant/antioxidant status, vitamin C and β -carotene in dogs with dermatophytosis. *Mycoses* 2014; 57(6): 358-365.
- Ben Amara I, Soudani N, Hakim A, Troudi A, Zeghal KM, Boudawara T, Zeghal N. Selenium and vitamin E, natural antioxidants, protect rat cerebral cortex against dimethoate-induced neurotoxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2011; 101(3):165-174.
- Beutler E, Kuhl W, West C. The osmotic fragility of erythrocytes after prolonged liquid storage and after reinfusion. *Blood* 1982; 59(6):1141-1147.
- Bildik A, Kargin F, Seryek K, Pasa S, Özensoy S. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* 2004; 77(1): 63-66.
- Blumberg J. Use of Biomarkers of Oxidative Stress in Research Studies. *Journal of Nutrition* 2004; 134:3188–3189.
- Bolfá PF, Leroux C, Pintea A, Andrei S, Cătoi C, Taulescu M, Tăbăran F, Spînu M. Oxidant-antioxidant imbalance in horses infected with equine infectious anaemia virus. *Veterinary Journal* 2012; 192(3):449-454.

Britti D, Sconza S, Morittu VM, Santori D, Boari A. Superoxide dismutase and Glutathione peroxidase in the blood of dogs with Leishmaniasis. *Veterinary Research Communications* 2008; 32(1): 251-254.

Buranakarl C, Trisiriroj M, Pondeenana S, Tungjitpeanpong T, Jarutakanon P, Penchome R. Relationships between oxidative stress markers and red blood cell characteristics in renal azotemic dogs. *Research in Veterinary Science* 2009; 86(2): 309-313.

Camkerten I, Sahin T, Borazan G, Gokcen A, Erel O, Das A. Evaluation of blood oxidant/antioxidant balance in dogs with sarcoptic mange. *Veterinary Parasitology* 2009; 161(1-2): 106-109.

Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 1998;44(6): 1309-1315.

Cay M, Naziroğlu M, Köylü H. Selenium and vitamin E modulates cigarette smoke exposure-induced oxidative stress in blood of rats. *Biological Trace Element Research* 2009; 131(1): 62-70.

Celi P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2011; 33(2):233-240.

Cemek M, Büyükokuroğlu ME, Hazman Ö, Konuk M, Bulut S, Birdane YO. The roles of melatonin and vitamin E plus selenium in prevention of oxidative stress induced by naloxone-precipitated withdrawal in heroin-addicted rats. *Biological Trace Element Research* 2011; 142(1): 55-66.

Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, Beltrami AP, Hintze TH, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circulation Research* 2001; 89(3): 279-286.

Chansaisakorn W, Sriphavatsarakorn P, Sopakdittapong P, Trisiriroj M, Pondeenana S, Buranakarl C. Oxidative stress and intraerythrocytic concentrations of sodium and potassium in diabetic dogs. *Veterinary Research Communications* 2009; 33(1): 67-75.

Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 1997; 24(5): 287-296.

Chaudhary R, Katharia R. Oxidative injury as contributory factor for red cells storage lesion during twenty eight days of storage. *Blood Transfusion* 2012; 10(1): 59-62.

Chaudhuri S, Varshney JP, Patra RC. Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *Research in Veterinary Science* 2008; 85(1): 120-124.

Chauhan SS, Celi P, Ponnampalam EN, Leury BJ, Liu F, Dunshea FR. Antioxidant dynamics in the live animal and implications for ruminant health and product (meat/milk) quality: Role of vitamin E and selenium. *Animal Production Science* 2014; 54(10): 1525-1536.

Choi KH, Lee JY, Jeong SM, Joo GK, Kim MC. Effects of vitamin C on oxidative stress due to anesthesia and surgical trauma in dogs. *Journal of Veterinary Clinics* 2011; 28(5): 473-478.

Choi KH, Lee JY, Jeong SM, Kim MC. Oxidative effects of isoflurane and medetomidine - Tiletamine / Zolazepam combination in beagle dogs. *Journal of Veterinary Clinics* 2012; 29(2): 119-123.

Ciftci G, Ural K, Aysul N, Cenesiz S, Guzel M, Pekmezci D, Sogut MU. Investigation of the 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, total antioxidant and nitric oxide levels of serum in dogs infected with *Babesia vogeli*. *Veterinary Parasitology* 2014; 204(3-4): 388-391.

Cowgill ES, Neel JA, Grindem CB. Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice* 2003; 33: 1223-1244.

Crnogaj M, Petlevski R, Mrljak V, Kis I, Torti M, Kucer N, Matijatko V, Sacer I, Stokovic I. Malondialdehyde levels in serum of dogs infected with *Babesia canis*. *Veterinarni Medicina* 2010; 55(4): 163-171.

Da Silva AS, Munhoz TD, Faria JLM, Vargas-Hernández G, Machado RZ, Almeida TC, Moresco RN, Stefani LM, Tinucci-Costa M. Increase nitric oxide and oxidative stress in

dogs experimentally infected by *Ehrlichia canis*: Effect on the pathogenesis of the disease. *Veterinary Microbiology* 2013; 164(3-4): 366-369.

D'Alessandro A, Kriebardis AG, Rinalducci S, Antonelou MH, Hansen KC, Papassideri IS, Zolla L. An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion* 2015; 55(1): 205-219.

Damonte G, Guida L, Sdraffa A, Benatti U, Melloni E, Forteleoni G, Meloni T, Carafoli E, De Flora A. Mechanisms of perturbation of erythrocyte calcium homeostasis in favism. *Cell Calcium* 1992; 13: 649–658.

Davidow B. Transfusion medicine in small animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* 2013; 43 (4): 735-756.

Dimri U, Ranjan R, Kumar N, Sharma MC, Swarup D, Sharma B, Kataria M. Changes in oxidative stress indices, zinc and copper concentrations in blood in canine demodicosis. *Veterinary Parasitology* 2008; 154(1-2): 98-102.

Dimri U, Singh SK, Sharma MC, Behera SK, Kumar D, Tiwari P. Oxidant/antioxidant balance, minerals status and apoptosis in peripheral blood of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. *Research in Veterinary Science* 2012; 93(1): 296-299.

Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation can not be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* 2004; 41: 200–227.

Doyle RL, Da Silva AS, Oliveira CB, França RT, Abdalla FH, Costa P, Carvalho FB, Klafke GM, Martins JR, Lopes STA, Andrade CM. Lipid peroxidation and decrease on the activities of antioxidant enzymes in experimental infection by *Babesia bovis* in cattle. *Comparative Clinical Pathology* 2015; *Baskıda*.

Dumaswala UJ, Zhuo L, Jacobsen DW, Jain SK, Sukalski KA. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: Role of glutathione. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 27 (9-10): 1041-1049.

Dunlap KL, Reynolds AJ, Duffy LK. Total antioxidant power in sled dogs supplemented with blueberries and the comparison of blood parameters associated with exercise.

Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology 2006; 143(4): 429-434.

Durackova Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research* 2010; 59: 459-469.

Eaton JW. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1991; 118(1): 3–4.

Emanuelli MP, Martins DB, Wolkmer P, Antoniazzi AQ, Emanuelli T, de Vargas AC, dos Anjos Lopes ST. Complete blood count, total plasma protein, neutrophil oxidative metabolism, and lipid peroxidation in female dogs with pyometra associated with *Escherichia coli*. *Comparative Clinical Pathology* 2012; 21(3): 309-313.

Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* 2005; 38(12): 1103–1111.

Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry* 2004; 37(2): 112–119.

Ertekin A, Karaca M, Akkan HA, Cemek M, Ormanci N. Investigation of the lipid peroxidation, antioxidant substances, antioxidant vitamins and some hematologic-biochemical parameter levels in gentamycin induced nephrotoxicosis in dogs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2003; 27(3): 535-540.

Esmailnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S, Dalir-Naghadeh B. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in sheep naturally infected with *Babesia ovis*. *Veterinary Parasitology* 2012; 185:124–130.

Fagiolo E, Mores N, Pelliccetti A, Gozzo ML, Zuppi C, Littarru GP. Biochemical parameters to assess viability of blood stored for transfusional use. *Folia Haematologica* 1986; 113:783–789.

Feldman BF, Sink CA. Collection, processing, storage and shipment. In: Feldman BF, Sink CA. (Eds.). *Practical Transfusion Medicine*, Teton NewMedia, Jackson, WY, USA. 2008.

Finotello R, Pasquini A, Meucci V, Lippi I, Rota A, Guidi G, Marchetti V. Redox status evaluation in dogs affected by mast cell tumour. *Veterinary and Comparative Oncology* 2014; 12(2):120-129.

Freeman LM, Brown DJ, Rush JE. Assessment of degree of oxidative stress and antioxidant concentrations in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1999; 215(5):644-646.

Freeman LM, Rush JE, Milbury PE, Blumberg JB. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with congestive heart failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2005; 19(4):537-541.

Furman E, Leidinger E, Hooijberg EH, Bauer N, Beddies G, Moritz A. A retrospective study of 1,098 blood samples with anemia from adult cats: frequency, classification, and association with serum creatinine concentration. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014; 28(5): 1391-1397.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 29(11): 1106-1114.

Gibson G, Abrams-Ogg A. Canine Transfusion Medicine. In: Day M, Kohn B. (Eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Hematology and Transfusion Medicine*. 2. Baski. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2012. p. 289-307.

Goranov NV. Serum markers of lipid peroxidation, antioxidant enzymatic defense, and collagen degradation in an experimental (Pond-Nuki) canine model of osteoarthritis. *Veterinary Clinical Pathology* 2007; 36(2): 192-195.

Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova* 2009; 32: 169–174.

Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 393: 561-564.

Gültekin F, Akdoğan M, Altuntaş İ, Delibaş N, Kaptanağası M. Kanın depo edilmesi süresince eritrosit lipid peroksidasyonu ve antioksidan potansiyelinde oluşan değişiklikler ve melatoninin koruyucu etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi* 2000a; 25(3): 83-91.

Gültekin F, Akdoğan M, Tunc B, Kılınç İ, Sütçü R. Depo kanlarına ilave edilen yüksek doz vitamin C'nin eritrosit parametreleri üzerine etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2000b; 7(2):35-42.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants – quo vadis?. *Trends in Pharmacological Sciences* 2011; 32(3): 125-130.

Harvey WJ. Erythrocyte biochemistry. In: Weiss DJ, Wardrop KJ. (Ed's). *Schalm's Veterinary Hematology*, 6. Baskı. Iowa. Blackwell Publishing; 2010. p. 131-135.

Hebert PC, Van der Linden P, Biro G, Hu LQ. Physiologic aspects of anemia. *Critical Care Clinics* 2004; 20: 187–212.

Heidarpour M, Soltani S, Mohri M, Khoshnegah J. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. *Parasitology Research* 2012; 111(4): 1491-1496.

Hermes-Lima M, Zenteno-Savín T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2002; 133(4):537-556.

Hermes-Lima M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB. (Eds.) *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, John Wiley & Sons; 2004. p. 319-368.

Hess JR. An update on solutions for red cell storage. *Vox Sanguinis* 2006; 91: 13-19.

Hess JR. Red cell storage. *Journal of Proteomics* 2010; 73: 368-373.

Hinchcliff KW, Reinhart GA, DiSilvestro R, Reynolds A, Blostein-Fujii A, Swenson RA. Oxidant stress in sled dogs subjected to repetitive endurance exercise. *American Journal of Veterinary Research* 2000; 61(5): 512-517.

Hodges J, Christopher MM. Diagnostic accuracy of using erythrocyte indices and polychromasia to identify regenerative anemia in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2011; 1; 238(11): 1452-1458.

Hsieh C, Chandni A, Neha K, Trishna S, Vani R. Curcumin as a modulator of oxidative stress during storage: a study on plasma. *Transfusion and Apheresis Science* 2014; 50(2):288-293.

Iuchi Y. Anemia Caused by Oxidative Stress. In: Silverberg D. (Eds)., *Anemia*. InTech; 2012. p. 49-62ç

Jilani T, Iqbal MP. Does vitamin E have a role in treatment and prevention of anemia's? *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011; 24(2): 237-242.

Jóźwik M, Jóźwik M, Jóźwik M, Szczypka M, Gajewska J, Laskowska-Klita T. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clinica Chimica Acta* 1997; 267 (2): 129-142.

Kanias T, Acker JP. Biopreservation of red blood cells--the struggle with hemoglobin oxidation. *FEBS Journal* 2010; 277(2):343-356.

Kapun AP, Salobir J, Levart A, Kotnik T, Svete AN. Oxidative stress markers in canine atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science* 2012; 92(3): 469-470.

Kapun AP, Salobir J, Levart A, Kalcher GT, Svete AN, Kotnik T. Vitamin E supplementation in canine atopic dermatitis: Improvement of clinical signs and effects on oxidative stress markers. *Veterinary Record* 2014; 175(22): 560-566.

Karadeniz A, Hanedan B, Cemek M, Brk MK. Relationship between canine distemper and oxidative stress in dogs. *Revue de Medecine Veterinaire* 2008; 159(8-9): 462-467.

Karayannopoulou M, Fytianou A, Assaloumidis N, Psalla D, Constantinidis TC, Kaldrymidou E, Koutinas AF. Markers of lipid peroxidation and alpha-tocopherol levels in the blood and neoplastic tissue of dogs with malignant mammary gland tumors. *Veterinary Clinical Pathology* 2013; 42(3): 323-328.

Kargin F, Fidanci UR. Kidney diseases and antioxidative metabolism in dogs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2001; 25(4): 607-613.

- Khanna A, Dubey M, Sinha R. Oxidative stress and its correlation with severity of maternal anemia. *Indian Journal of Preventive and Social Medicine* 2010; 41(3): 231-236.
- Kiral F, Karagenc T, Pasa S, Yenisey C, Seyrek K. Dogs with *Hepatozoon canis* respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. *Veterinary Parasitology* 2005; 131(1-2): 15-21.
- Kisielewicz C, Self IA. Canine and feline blood transfusions: Controversies and recent advances in administration practices. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 2014; 41 (3): 233-242.
- Kizil O, Yuce A. Oxidative stress in dogs with coccidiosis. *Revue de Medecine Veterinaire* 2010; 160(11): 495-499.
- Kogika MM, Lustoza MD, Hagiwara MK, Caragelasco DS, Martorelli CR, Mori CS. Evaluation of oxidative stress in the anemia of dogs with chronic kidney disease. *Veterinary Clinical Pathology* 2014; 44(1): 70-78.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 2002; 30(6): 620-650.
- Kozan E, Avci G, Sevimli FK, Birdane FM, Köse M. Determine of the antioxidant levels and some biochemical parameters on infected with ascaridiosis and treated dogs. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 2010; 57(2): 93-97.
- Kumar A, Varshney JP, Patra RC. A comparative study on oxidative stress in dogs infected with *Ehrlichia canis* with or without concurrent infection with *Babesia gibsoni*. *Veterinary Research Communications* 2006; 30(8): 917-920.
- Kumaraguruparan R, Balachandran C, Murali Manohar B, Nagini S. Altered oxidant-antioxidant profile in canine mammary tumours. *Veterinary Research Communications* 2005; 29(4): 287-296.
- Kumerova A, Lece A, Skesters A, Silova A, Petuhovs V. Anaemia and antioxidant defence of the red blood cells. *Materia Medica Polona* 1998; 30: 12–15.

Küçükakin B, Kocak V, Lykkesfeldt J, Nielsen HJ, Magnussen K, Rosenberg J, Gögenur I. Storage-induced increase in biomarkers of oxidative stress and inflammation in red blood cell components. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2011; 71 (4): 299-303.

Lacerda LA, Hlavac NRC, Terra SR, Back FP, Jane Wardrop K, González FHD. Effects of four additive solutions on canine leukoreduced red cell concentrate quality during storage. *Veterinary Clinical Pathology* 2014; 43 (3): 362-370.

Lamonta J, Campbell J, FitzGerald P. Measurement of individual vs total antioxidants. *Clinical Chemistry* 1997; 43(5): 852-854.

Lan T, Yan LJ, Pei JR, Gao L, Li XZ, Liu MF, Li SC, Zhou LW, Liu ZC, Zeng XC, Wang T. Protective effect of selenium and vitamin E on rat myocardial oxidative injury. *Chinese Journal of Endemiology* 2012; 31(4): 381-384.

Lanevski A, Wardrop KJ. Principles of transfusion medicine in small animals. *Canadian Veterinary Journal* 2001; 42(6): 447-454.

Lang F, Abed M, Lang E, Föller M. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxidants & Redox Signaling* 2014; 21(1): 138-153.

Lang F, Lang KS, Lang PA, Huber SM, Wieder T. Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006; 8: 1183–1192.

Lee JM, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101: 9751–9756.

Lee JY, Kim MC. Comparison of oxidative stress status in dogs undergoing laparoscopic and open ovariectomy. *Journal of Veterinary Medical Science* 2014; 76 (2): 273-276.

Lee JY, Kim MC. Effect of propofol on oxidative stress status in erythrocytes from dogs under general anaesthesia. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2012; 54(1): 76-80.

Lee JY, Won HS, Hwang HK, Jeong SM, Kim MC. Evaluation of the systemic oxidative stress status during major orthopedic surgery in dogs: A clinical study. *Journal of Veterinary Clinics* 2013; 30(1): 1-4.

Lee JY. Oxidative stress due to anesthesia and surgical trauma and comparison of the effects of propofol and thiopental in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* 2012; 74(5): 663-665.

Lelubre C, Vincent JL. Relationship between red cell storage duration and outcomes in adults receiving red cell transfusions: A systematic review. *Critical Care* 2013; 17 (2): 66-80.

Leonel C, Gelaleti GB, Jardim BV, Moschetta MG, Regiani VR, Oliveira JG, Zuccari DAPC. Expression of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase pi in canine mammary tumors. *BMC Veterinary Research* 2014; 10: 49-59.

Longoni SS, Sánchez-Moreno M, López JER, Marín C. *Leishmania infantum* secreted iron superoxide dismutase purification and its application to the diagnosis of canine Leishmaniasis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2013; 36(5): 499-506.

Loutit JF, Mollison PL. Advantages of a disodiumcitrate–glucose mixture as a blood preservative. *British Medical Journal* 1943; 2: 744–745.

Luck H. Catalase. In: Bergmeyer HU. (Eds). *Methods of enzymatic assays*. New York: Academic Press; 1965. p. 885-894.

Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biological Chemistry* 2013; 395(2): 119-250.

Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal* 2007; 173: 502-511.

Macotpet A, Suksawat F, Sukon P, Pimpakdee K, Pattarapanwichien E, Tangrassameprasert R, Boonsiri P. Oxidative stress in cancer-bearing dogs assessed by measuring serum malondialdehyde. *BMC Veterinary Research* 2013; 9: 101-107.

Madhikarmi NL, Murthy KRS. Antioxidant enzymes and oxidative stress in the erythrocytes of iron deficiency anemic patients supplemented with vitamins. *Iranian Biomedical Journal* 2014; 18(2): 82-87.

Maeda H, Yoshida H, Nakahari T, Imai Y, Tamai H. Effect of alpha-tocopherol on oxidative hemolysis, as evaluated by impedance measurements. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 1992; 38: 1–14.

Marjani A, Moradi A, Ghourcaie AB. Alterations on plasma lipid peroxidation and erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzyme activities during storage of blood. *Asian Journal of Biochemistry* 2007; 2: 118-123.

Marjani A. Alterations in plasma lipid peroxidation and total antioxidant status during storage of blood. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2006; 9 (13): 2520-2523.

Martínez-Subiela S, Bernal LJ, Tvarijonavičiute A, Garcia-Martinez JD, Tecles F, Cerón JJ. Canine demodicosis: The relationship between response to treatment of generalised disease and markers for inflammation and oxidative status. *Veterinary Dermatology* 2014; 25(2): 72-84.

Melhorn DK, Gross S, Lake GA, Leu JA. The hydrogen peroxide fragility test and serum tocopherol level in anemias of various etiologies. *Blood* 1971; 37: 438–446.

Mills J. Anaemia. In: Day MJ, Kohn B. (Eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*, 2. Baskı. İngiltere, BSAVA; 2012. p. 31-44.

Mohanty JG. Red blood cell (RBC) oxidative stress contributes to reduced RBC deformability and oxygen delivery leading to the occurrence of anemia. *Journal of Blood Disorders Transfusion* 2013; 4(5): 58-66.

Murase T, Ueda T, Yamato O, Tajima M, Maede Y. Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. *Journal of Veterinary Medical Science* 1996; 58(3): 259-261.

Nagababu E, Gulyani S, Earley CJ, Cutler RG, Mattson MP, Rifkind JM. Iron-deficiency anaemia enhances red blood cell oxidative stress. *Free Radical Research* 2008; 42(9): 824-829.

Naziroglu M, Cay M. Protective role of intraperitoneally administered vitamin E and selenium on the antioxidative defense mechanisms in rats with diabetes induced by streptozotocin. *Biological Trace Element Research* February 2001; 79(2): 149-159.

Nemec A, Drobnič-Košorok M, Skitek M, Pavlica Z, Galac S, Butinar J. Total antioxidant capacity (TAC) values and their correlation with individual antioxidants in serum of healthy Beagles. *Acta Veterinaria Brno* 2000; 69(4): 297-303.

Nemec A, Verstraete FJM, Jerin A, Šentjerc M, Kass PH, Petelin M, Pavlica Z. Periodontal disease, periodontal treatment and systemic nitric oxide in dogs. *Research in Veterinary Science* 2013; 94(3): 542-544.

Niedzwiedz A, Jaworski Z. Oxidant-antioxidant status in the blood of horses with symptomatic Recurrent Airway Obstruction (RAO). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014; 28(6): 1845-1852.

Niinistö K, Raekallio M, Sankari S. Storage of equine red blood cells as a concentrate. *The Veterinary Journal* 2008; 176(2): 227-231.

Nneli RO, Chukwu JO, Okhiai MO. Haematological, biochemical and physical changes during blood storage in three different blood bags. 37th Congress of IUPS. Birmingham, İngiltere; 2013. p. 151.

Noaman E, Zahran AM, Kamal AM, Omran MF. Vitamin E and selenium administration as a modulator of antioxidant defense system: biochemical assessment and modification. *Biological Trace Element Research* 2002; 86(1): 55-64.

Nolte I, Niemann C, Käufer-Weiss I, Bowry SK, Müller-Berghaus G. The preservation of the whole blood of dogs for transfusion purposes in CPDA-1 stabilizer-prepared PVC bags--the effect of storage on the count, the volume distribution and the ultrastructure of thrombocytes. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 1988; 101(11):365-373.

Nolte I. Untersuchungen zur Lagerfähigkeit von Blutkonserven des Hundes unter besonderer Berücksichtigung der Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren. *Vet. Med. Habil. Gießen*; 1986.

Ogunro PS, Ogungbamigbe TO, Muhibi MA. The influence of storage period on the antioxidants level of red blood cells and the plasma before transfusion. *African Journal of Medicine and Medical Sciences* 2010; 39 (2): 99-104.

Otsuka Y, Yamasaki M, Yamato O, Maede Y. The effect of macrophages on the erythrocyte oxidative damage and the pathogenesis of anemia in *Babesia gibsoni*-infected dogs with low parasitemia. *Journal of Veterinary Medical Science* 2002; 64(3): 221-226.

Ozcelik IS. Beneficial effects of melatonin on oxidative damage observed during whole blood storage. *UHOD - Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi* 2014; 24 (2): 89-96.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1967; 70(1): 158-69.

Pallotta V, Gevi F, D'Alessandro A, Zolla L. Storing red blood cells with vitamin C and N-acetylcysteine prevents oxidative stress-related lesions: A metabolomics overview. *Blood Transfusion* 2014; 12 (3): 376-387.

Panda D, Patra RC, Nandi S, Swarup D. Oxidative stress indices in gastroenteritis in dogs with canine parvoviral infection. *Research in Veterinary Science* 2009; 86(1): 36-42.

Pandey KB, Rizvi SI. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* 2011; 155(2):31-136.

Pasquini A, Gavazza A, Biagi G, Lubas G. Oxidative stress in lymphoma: similarities and differences between dog and human. *Comparative Clinical Pathology* 2015; 24(1): 69-73.

Pasquini A, Luchetti E, Cardini G. Evaluation of oxidative stress in hunting dogs during exercise. *Research in Veterinary Science* 2010; 89(1): 120-123.

Pasquini A, Luchetti E, Marchetti V, Cardini G, Iorio EL. Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy Labrador dogs. *Veterinary Research Communications* 2008; 32(2): 137-143.

Peet A. Oxygen toxicity and free radical injury. In: Lieberman MA, Marks A. (Eds). *Marks' Basic Medical Biochemistry*. California; Lippincott Williams & Wilkins; 2012. p. 437-456.

Percival M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insight* 1998; 10: 1-4.

- Pesillo AS, Freeman LM, Rush JE. Assessment of lipid peroxidation and serum vitamin E concentration in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *American Journal of Veterinary Research* 2004; 65(12): 1621-1624.
- Pfafferott C, Meiselman HJ, Hochstein P. The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. *Blood* 1982; 59: 12–15.
- Price GS, Armstrong PJ, Mcleod DA, Babineau CA, Metcalf MR, Sellett LC. Evaluation of citrate-phosphate-dextrose-adenine as a storage medium for packed canine erythrocytes. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1988; 2: 126-132.
- Racek J, Herynková R, Holeček V, Jeřábek Z, Sláma V. Influence of antioxidants on the quality of stored blood. *Vox Sanguinis* 1997; 72 (1): 16-19.
- Rezaei AS, Dalir-Naghadeh B. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Veterinary Parasitology* 2006; 142(1-2):179-186.
- Romanucci M, Bongiovanni L, Russo A, Capuccini S, Mechelli L, Ordeix L, Della Salda L. Oxidative stress in the pathogenesis of canine zinc-responsive dermatosis. *Veterinary Dermatology* 2011; 22(1): 31-38.
- Rossi G, Kuleš J, Rafaj RB, Mrljak V, Lauzi S, Giordano A, Paltrinieri S. Relationship between paraoxonase 1 activity and high density lipoprotein concentration during naturally occurring babesiosis in dogs. *Research in Veterinary Science* 2014; 97(2): 318-324.
- Rous P, Turner JR. The preservation of living red cells in vitro. *Journal of Experimental Medicine* 1916; 23: 219–237.
- Ruddell JP, Babcock JG, Lippert LE, Hess JR. Effect of 24 hours of storage at 25 °C on the in vitro storage characteristics of CPDA-1 packed red blood cells. *Transfusion* 1998; 38: 424–428.
- Sarma K, Mondal D, Saravanan M, Mahendran K. Evaluation of haemato-biochemical and oxidative indices in naturally infected concomitant tick borne intracellular diseases in dogs. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2015; 5 (1): 60-66.

Seidl S, Gosda W, Repucci AJ. The in vitro and in vivo evaluation of whole blood and red cell concentrates drawn on CPDA-1 and stored in a NON-DEHP plasticized PVC Container. *Vox Sanguinis* 1991; 61:8-13.

Serin G, Kiral F, Serin I. Acute effect of ovariohysterectomy on lipid peroxidation and some antioxidant levels in dogs. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 2008; 52(2): 251-253.

Severin E, Nave B, Ständer M, Ott R, Traupe H. Total antioxidative capacity is normal in sera from psoriasis patients despite elevated bilirubin, tocopherol and urate levels. *Dermatology* 1999; 198(4): 336-339.

Silva ACRA, Almeida BFM, Soeiro CS, Ferreira WL, Lima VMF, Ciarlini PC. Oxidative stress and increase in apoptosis index of neutrophils from dogs with prerenal azotemia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 2013; 65(1): 163-170.

Silva ACRA, Almeida BFM, Soeiro CS, Ferreira WL, Lima VMF, Ciarlini PC. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2013; 77(2): 136-141.

Simeonova GP, Todorova II, Gadjeva V, Dinev DN. Evaluation of lipid peroxidation association with three anesthetic protocols in dogs. *Revue de Medecine Veterinaire* 2004; 155(12): 602-605.

Singh SK, Dimri U, Sharma MC, Swarup D, Sharma B. Determination of oxidative status and apoptosis in peripheral blood of dogs with sarcoptic mange. *Veterinary Parasitology* 2011; 178(3-4): 330-338.

Singkanya T, Tirawattanawanich C, Chungsamarnyart N, Tongyai S. Oxidative stress in canine stored red blood cells. 48. Kasetsart University Annual Conference, Bangkok (Thailand); 2010. p. 252-258.

Sithanukul S, Shayarattanasin P, Hiranpradith V, Chansaisakorn W, Trisiriroj M, Komolvanich S, Satayatham S, Buranakarl C. Blood pressure, urinary protein creatinine ratio and oxidative stress in dogs with urolithiasis. *Thai Journal of Veterinary Medicine* 2010; 40(3): 323-330.

Sommer B, Mische R, Wirth W. Lagerungsbedingte Veränderungen in der Katzenblutkonserve. *Kleintierpraxis* 1994; 39: 513-580.

Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *Comptes Rendus Biologies* 2004; 327: 649-662.

Sousa RS, Barros IO, Tavares MD, Sousa IKF, Oliveira GB, Minervina AHH, Barreto RA. Storage lesions caused during blood conservation in the different species: Review. *Acta Veterinaria Brasilica* 2012; 6(2): 68-79.

Sousa RS, Barrêto RA, Sousa IK, Chaves DF, Soares HS, Barros IO, Minervino AH, Ortolani EL. Evaluation of hematologic, blood gas, and select biochemical variables in ovine whole blood stored in CPDA-1 bags. *Veterinary Clinical Pathology* 2013; 42(1): 27-30.

Sparrow RL, Veale MF, Healey G, Payne KA. Red blood cell (RBC) age at collection and storage influences RBC membrane-associated carbohydrates and lectin binding. *Transfusion* 2007; 47: 966-968.

Stavinohová R, Lorenzová J, Papežíková I, Borkovcová I, Pfeifr J, Lojek A, Mrázová M, Crha M. Markers of oxidative and antioxidative activity in female dogs with mammary gland tumour with and without additional vitamin E supplementation. *Acta Veterinaria Brno*. 2012; 81(3): 275-280.

Szczubial M, Kankofer M, Lopuszynski W, Da,browski R, Lipko J. Oxidative stress parameters in bitches with mammary gland tumours. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine* 2004; 51(7-8): 336-340.

Şekeroğlu MR, Huyut Z, Him A. The susceptibility of erythrocytes to oxidation during storage of blood: Effects of melatonin and propofol. *Clinical Biochemistry* 2012; 45 (4-5): 315-319.

Tan E, Bienzle D, Shewen P, Kruth S, Wood D. Potentially antigenic RBC membrane proteins in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Veterinary Clinical Pathology* 2012; 41(1): 45-55.

Tanja P, Alenka NS, Butinar J, Nataša T, Marija P, Bettina K, Kessler M. Antioxidant status in canine cancer patients. *Acta Veterinaria* 2008; 58(2-3): 275-286.

Thrall MA. Classification of and diagnostic approach to anemia. In: Thrall MA, Weiser G., Allison R, Campbell TW. (Eds). *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*, 2. Baskı. Wiley-Blackwell, ABD; 2012. p. 75-113.

Todorova I, Dinev D. Comparison of the intensity of oxidative stress during chemotherapy alone and chemotherapy combined with antioxidant therapy in spontaneous mammary tumours in dogs. *Revue de Medecine Veterinaire* 2010; 161(1): 43-48.

Todorova I, Simeonova G, Kyuchukova D, Dinev D, Gadjeva V. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. *Comparative Clinical Pathology* 2005; 13(4): 190-194.

Trumel C, Verwaerde P, Rascol A, Braun JP. Comparison of whole blood and plasma potassium concentrations in dogs using the reflovet system. *Veterinary Clinical Pathology* 2003; 32 (3): 140-142.

Tunc O. Investigation of the role of oxidative stress in male infertility. Doktora Tezi. Faculty of Health Sciences. University of Adelaide. Adelaide, Avustralya. 2010.

Turhan T, Sezer S, Yücel Ç, Koca Y. Effects of Storage Conditions on Complete Blood Cell Count Parameters. *Turkish Journal of Biochemistry* 2011; 36 (2): 165–174.

Turner S, Williams, AR, Rees JMH. The role of mean corpuscular haemoglobinconcentration in limiting the storage life of human blood. *Vox Sanguinis* 1987; 52: 177-181.

Tvedten H, Moritz A. Reticulocyte and heinz body staining and enumeration. In: Weiss DJ, Wardrop KJ. (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology*, 6. Baskı. Iowa, Blackwell Publishing, ABD; 2010. p. 1067-1073.

Tvedten H. Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In: Weiss DJ, Wardrop KJ. (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology*, 6. Baskı. Iowa, Blackwell Publishing, ABD; 2010. p. 152-161.

Ulutas PA, Bayramli G, Ulutas B, Kiral F, Atasoy A. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidant status in dogs with aspirin induced gastric mucosal injury. *Revue de Medecine Veterinaire* 2006; 157(8-9): 401-404.

Vajdovich P, Kriska T, Mézes M, Szabó PR, Balogh N, Bánfi A, Arany-Tóth A, Gaál T, Jakus J. Redox status of dogs with non-hodgkin lymphomas. An ESR study. *Cancer Letters* 2005; 224(2): 339-346.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2007; 39: 44-84.

Vannucchi CI, Jordao AA, Vannucchi H. Antioxidant compounds and oxidative stress in female dogs during pregnancy. *Research in Veterinary Science* 2008; 83(2): 188-193.

Varzi HN, Esmailzadeh S, Morovvati H, Avizeh R, Shahriari A, Givi ME. Effect of silymarin and vitamin E on gentamicin-induced nephrotoxicity in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2007; 30(5):477-481.

Viviano KR, Vanderwielen B. Effect of N-acetylcysteine supplementation on intracellular glutathione, urine isoprostanes, clinical score, and survival in hospitalized ill dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013; 27(2): 250-258.

Walker TG, Chan DL, Freeman LM, Milbury PE, Blumberg JB. Serial determination of biomarkers of oxidative stress and antioxidant status in dogs with naturally occurring gastric dilatation-volvulus. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2007; 17(3): 250-256.

Wardrop KJ, Tucker RL, Mugnai K. Evaluation of Canine Red Blood Cells Stored in a Saline, Adenine and Glucose Solution for 35 Days. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1997; 11(1):5-8.

Webster NR, Toothil C. Effects of blood storage on red cell antioxidative systems. *Acta Haematologica* 1986; 75: 30–33.

Winter JL, Barber LG, Freeman L, Griessmayr PC, Milbury PE, Blumberg JB. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2009; 23(2): 311-316.

Wood KC, Granger DN. Sick cell disease: Role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2007; 34: 926–932.

Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Research in Veterinary Science* 1983; 34(3): 253-6.

Xia Z, Cai L, He Y, Wan J, Yu J. Xylitol poisoning of dogs is associated with increased glycogenolysis, coagulopathy, and oxidative stress. *Toxicological and Environmental Chemistry* 2013; 95(2): 337-343.

Yamasaki M, Otsuka Y, Yamato O, Tajima M, Maede Y. The cause of the predilection of *Babesia gibsoni* for reticulocytes. *Journal of Veterinary Medical Science* 2000; 62: 737–741.

Yin MS, Guo DM, Yin LL, An K, Zhang Y, Cui X. Selenium and vitamin e supplementation reduces oxidative stress and increases antioxidant enzyme activity in a mice model of psoriasis. *Trace Elements and Electrolytes* 2014; 31(1): 21-26.

Yoshoiko T, Kawada K, Shimada T. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active oxygen toxicity in the blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1979; 135: 372–376.

Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* 2001; 54: 176-186.

Ziouzenkova O, Asatryan L, Sevanian A. Oxidative stress resulting from hemolysis and formation of catalytically active hemoglobin: protective strategies. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1999; 37(3): 125–132.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İzmir, Bornova'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini sırasıyla Türkbirliği İlköğretim Okulu, Karşıyaka İlköğretim Okulu ve Karşıyaka Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2002 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazanarak Veteriner Hekimliği eğitimini almaya başladı. 2006 yılında ERASMUS öğrenci değişim programı kapsamında 6 ay süreyle Vilnius Koleji-Litvanya'da bulundu. 2007 yılında ADÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD'da stajını tamamladı. 2008 yılında mezun oldu ve aynı sene ADÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD'da Doktora Programına başladı. 2009 yılında aynı Anabilim Dalına Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2013 yılında YÖK Yurtdışı Doktora Araştırma Programı kapsamında Avustralya Melbourne Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Küçük Hayvan Hekimliği Bölümünde 6 ay süreyle misafir araştırmacı olarak görev yaptı.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın her aşamasında gösterdiği özen, destek ve yardımlarından dolayı danışmanım Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA'ya,

Doktora eğitimim süresince katkı ve yardımlarından dolayı Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Bülent ULUTAŞ, Prof. Dr. Serdar PAŞA ve Doç. Dr. Kerem URAL'a,

Tez çalışması süresince yardımlarını esirgemeyen başta Veteriner Hekim Erhan AY ve Veteriner Hekim Ahmet KÜNYELİ olmak üzere tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri ve Lisansüstü Program Öğrencilerine,

Biyokimyasal analizleri gerçekleştirme sürecindeki yardımlarından dolayı Biyokimya ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ ve Veteriner Hekim Selçuk Ertürk ADIYAMAN'a,

Doktora çalışmamın ikinci bölümünde yararlanılan donör köpekleri sağlayan Kral Köpek Çiftliği'ne,

YÖK Yurtdışı Doktora Araştırma Programı kapsamında Avustralya Melbourne Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Küçük Hayvan Hekimliği Bölümünde misafir araştırmacı olarak görev yapmama olanak sağlayan Prof. Caroline MANSFIELD'a,

Geride kalan bu uzun süreçte sabrı, her konudaki desteği ve fedakârlığıyla her zaman yanımda olan Gamze BALAT'a,

Hayatım boyunca desteklerini hissettiğim başta ablam Doç. Dr. Berna GÜLTEKİN ve kuzenim Dr. Gökçe YILDIRIM olmak üzere emeklerini hiçbir zaman unutmayacağım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.