



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**OKSİDATİF OLARAK MODİFİYE EDİLMİŞ
KARBONİK ANHİDRAZA KARŞI
OTOANTİKOR OLUŞUMUNUN VE BU
ANTİKORLARIN BAZI ROMATOİD
HASTALIKLARLA İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Ayşe ŞENTÜRK

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2015



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**OKSİDATİF OLARAK MODİFİYE EDİLMİŞ
KARBONİK ANHİDRAZA KARŞI
OTOANTİKOR OLUŞUMUNUN VE BU
ANTİKORLARIN BAZI ROMATOİD
HASTALIKLARLA İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Ayşe ŞENTÜRK

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2015

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ayşe ŞENTÜRK'ün hazırladığı **“Oksidatif Olarak Modifiye Edilmiş Karbonik Anhidraza Karşı Otoantikör Oluşumunun Ve Bu Antikörlerin Bazı Romatoid Hastalıklarla İlişkisinin İncelenmesi”** başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Ahmet ALVER



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri:

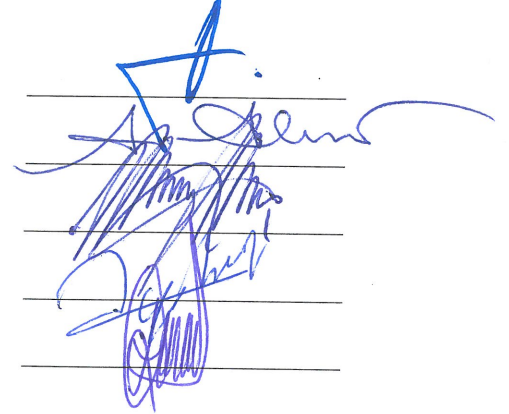
Prof. Dr. Orhan DEĞER

Prof. Dr. Ahmet ALVER

Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Doç. Dr. Adnan YILMAZ

Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU



Tarih: 10 / 11 / 2015

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun / ... / tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

20.10.2015

Ayşe ŞENTÜRK

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresinde bilimsel, akademik ve insani yönden daima örnek aldığım, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle bana her zaman yardımcı olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER'e,

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca her anlamda yetişmemde çok büyük katkı ve emekleri olan değerli hocalarım; Prof. Dr. E. Edip KEDA başta olmak üzere Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN, Prof. Dr. Birgül VANİZOR KURAL, Yrd. Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN ve aramızdan ayrılan, saygıyla andığımız değerli hocamız Prof. Dr. Ekin ÖNDER'e,

Çalışmamda bana yardımcı olan Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Murat KARKUCAK'a, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ersan KALAY'a, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Murat KÜÇÜK'e benden yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Gülden YORGANCIOĞLU BUDAK'a, Dr. İpek CAN, Dr. Ömer Faruk SERDAR ve Semra ALKAN'a,

Bilimsel ve akademik her anlamda imkanlarını, bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE ve Yrd. Doç. Dr. Ayşegül UZUN SÜMER'e,

Çalışmamın her aşamasında yanımda olan sevgi ve desteklerini her zaman hissettiren canım arkadaşlarım Dr. Öğr. İmran İNCE, Dr. Öğr. Akın BODUR, Taghi AHMADI RENDİ başta olmak üzere Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm değerli arkadaşlarıma ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Bu tez çalışmasını gerçekleştirmemde; her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve tüm sevdiklerime, eşim ve tatlı oğlum Kayra'ya teşekkür ederim.

Ayşe ŞENTÜRK

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin 8682 nolu projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Karbonik Anhidraz	5
4.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	5
4.2.1. Karbonik Anhidraz I	6
4.2.2. Karbonik Anhidraz II	7
4.3. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem	7
4.4. Antioksidan Enzimler	9
4.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	9
4.4.2. Katalaz (CAT)	10
4.4.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)	10
4.5. Oksidatif Stres	11
4.5.1. 4-Hidroksi-2-nonenal (HNE)	13
4.5.2. Malondialdehit (MDA)	14
4.6. Nitrozatif Stres	15
4.6.1. Peroksinitrit (PN)	16
4.7. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu	16
4.8. Otoimmünite	17
4.8.1. Otoimmün Hastalıklar	18
4.8.2. Otoimmün Hastalıkların Patolojik Mekanizmaları	18

4.8.3. Otoantikörler	19
4.9. CA Otoantikörleri ve Hastalıklarla İlişkisi	20
4.10. Romatoid Artrit (RA)	22
4.11. Sjögren's Sendromu (SjS)	22
4.12. Ankilozan Spondilit (AS)	23
4.13. İnflamatuvar Sitokinler	24
4.13.1. Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)	24
4.13.2. İnterlökin-6 (IL-6)	25
5. GEREÇ ve YÖNTEM	26
5.1. Gereç	26
5.1.1. Çalışma Grupları	26
5.1.1.1. Kullanılan Fareler	26
5.1.1.2. Bireyler	26
5.1.2. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler	27
5.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	28
5.1.4. Kullanılan Ticari Kitler	30
5.2. Yöntemler	30
5.2.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Eritrositlerinden İzolasyonu	30
5.2.1.1. Afinite Jelinin Hazırlanması	30
5.2.1.2. Hemolizatinin Hazırlanması	33
5.2.1.3. Kolonun Hazırlanması ve Hemolizatinin Kolona Uygulanması	33
5.2.1.4. Karbonik Anhidraz I Elüsyonu	34
5.2.1.5. Karbonik Anhidraz II Elüsyonu	35
5.2.2. Protein Tayini	35
5.2.3. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Tayini	36
5.2.4. Diyaliz	37
5.2.4.1. Diyaliz Torbasının Aktifleştirilmesi	38
5.2.4.2. Diyaliz işlemi	38
5.2.5. CA İzoenzimlerinin MDA, HNE ve PN ile Modifikasyonu	38
5.2.5.1. Karbonik Anhidrazın MDA ile Modifikasyonu	38
5.2.5.2. Karbonik Anhidrazın HNE ile Modifikasyonu	40
5.2.5.3. Karbonik Anhidrazın PN ile Modifikasyonu	40

5.2.6. SDS-PAGE ve Western Blot	41
5.2.6.1. SDS- PAGE Jellerinin Hazırlanması	42
5.2.6.2. SDS-PAGE	43
5.2.6.3. Western Blot	44
5.2.6.3. Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmünokimya ile Görüntülenmesi	45
5.2.7. Deney Gruplar	46
5.2.7.1. Fareler ve İmmünizasyon	46
5.2.8. Farelerde Karbonik Anhidraz Antikor Titrelerinin Belirlenmesi	47
5.2.9. Çalışma Grubu (Bireyler)	49
5.2.9.1. Bireylerde Karbonik Anhidraz Otoantikor Titrelerinin Belirlenmesi	50
5.2.9.2. Plazma MDA Seviyesi Tayini	50
5.2.9.3. Plazma 3-Nitrotirozin Seviyesinin Belirlenmesi	52
5.2.9.4. Plazma HNE Seviyesinin Belirlenmesi	52
5.2.9.5. Plazma IL-6 Seviyesinin Belirlenmesi	53
5.2.9.6. Plazma TNF- α Seviyesinin Belirlenmesi	54
5.2.9.7. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	54
5.2.9.8. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini	57
5.2.9.9. Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini	58
5.2.9.10. Eritrosit MDA Seviyesinin Belirlenmesi	59
5.2.9.11. Hemoglobin Miktarının Belirlenmesi	61
5.3. İstatistiksel Yöntemler	62
6. BULGULAR	63
6.1. Karbonik Anhidrazın Eritrositlerden İzolasyonu	63
6.2. İzole Edilen Karbonik Anhidrazın Saflığının Kontrolü	63
6.3. Karbonik Anhidrazın Oksidatif Modifikasyonu	64
6.3.1. Karbonik Anhidrazın MDA ile Modifikasyonu	64
6.3.2. Karbonik Anhidrazın PN ile Modifikasyonu	65
6.3.3. Karbonik Anhidrazın HNE ile Modifikasyonu	66
6.4. Farelerde CA ve Modifiye CA Formları ile İmmünizasyon Sonuçları	66
6.4.1. Farelerde CA I ve Modifiye CA I Antikor Titreleleri	67
6.4.2. Farelerde CA II ve Modifiye CA II Antikor Titreleleri	68

6.5. Bireylerdeki CA Otoantikör Titreleeri	70
6.5.1. CA I Otoantikör Titreleeri	71
6.5.2. CA II Otoantikör Titreleeri	72
6.6. Eritrosit Antioksidan Enzim Aktiviteleeri	74
6.7. Eritrosit MDA Seviyeleeri	75
6.8. 3-Nitrotirozin, HNE ve Plazma MDA Seviyeleeri	76
6.9. İnflamatuar Sitokinler	79
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	80
8. KAYNAKLAR	88
9. EKLER	103
9.1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	103
10. ETİK KURUL ONAYI	106
10.1. Etik Kurul Onay Belgesi	106
10.2. Hayvan Deneyleeri Etik Kurul Onay Belgesi	107
11. ÖZGEÇMİŞ	108

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. α -CA izoenzimleri, hidrataz aktivitesi, sülfonamid inhibitörleri için afinite ve hücre içi yerleşimleri	6
Tablo 2. Bireylerin biyokimyasal parametreleri ve demografik özellikleri	26
Tablo 3. Kullanılan cihazlar, laboratuvar aletleri, malzemeler ve üretici firmaları	27
Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar	28
Tablo 5. Kullanılan kitler ve üretici firmalar	30
Tablo 6. %5-12'lik (1x1 mm) SDS poliakrilamid jelinin hazırlanışı	42
Tablo 7. Plazma MDA seviyesi ölçümü	51
Tablo 8. SOD aktivitesi ölçümü	55
Tablo 9. Katalaz aktivitesi ölçümü ve yapılan işlemler	58
Tablo 10. Eritrosit MDA ölçümü ve yapılan işlemler	60
Tablo 11. Hemoglobin ölçümü	62
Tablo 12. CA I ve modifiye CA I formlarının antijenik özelliği	67
Tablo 13. CA II ve modifiye CA II formlarının antijenik özelliği	69
Tablo 14. Çalışma grubundaki bireylerin CA I otoantikor titreleri	71
Tablo 15. CA I ve modifiye CA I formları otoantikor titreleri arasındaki korelasyon tablosu	72
Tablo 16. Çalışma gruplarındaki bireylerdeki CA II otoantikor titreleri	73
Tablo 17. CA II ve modifiye CA II formları otoantikor titreleri arasındaki korelasyon tablosu	74
Tablo 18. SOD, CAT ve GSH-Px aktivite sonuçları	74
Tablo 19. Eritrosit MDA sonuçları	75
Tablo 20. 3-NT, HNE ve Plazma MDA düzeyleri	76
Tablo 21. Oksidatif stres parametreleri ile CA I otoantikor titreleri arasındaki korelasyon tablosu	77
Tablo 22. Oksidatif stres parametreleri ile CA II otoantikor titreleri arasındaki korelasyon tablosu	78
Tablo 23. TNF- α ve IL-6 seviyeleri	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. 4-hidroksi-2,3-trans-nonenalin kimyasal yapısı	13
Şekil 2. Malondialdehitin kimyasal yapısı	14
Şekil 3. Protein tayininde kullanılan standart grafiği	36
Şekil 4. MDA'nın seyreltme oranına bağlı absorbands grafiği	38
Şekil 5. Peroksinitritin seyreltme oranına bağlı absorbands grafiği	40
Şekil 6. MDA standart grafiği	51
Şekil 7. 3-nitrotirozin standart grafiği	52
Şekil 8. 4-HNE standart grafiği	53
Şekil 9. IL-6 standart grafiği	53
Şekil 10. TNF- α standart grafiği	54
Şekil 11. Standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği	56
Şekil 12. Log (Standart SOD aktivitesi) ve % inhibisyon grafiği	57
Şekil 13. Standart GSH-Px aktivite grafiği	59
Şekil 14. Eritrosit MDA standart grafiği	61
Şekil 15. Fraksiyon tüplerindeki CA aktivitesi ve protein tayinleri	63
Şekil 16. CA I ve modifiye CA I formlarının antijenik özelliği	67
Şekil 17. Modifikasyonların CA I'in antijenik özelliğine etkisi	68
Şekil 18. CA II ve modifiye CA II formlarının antijenik özelliği	69
Şekil 19. Modifikasyonların CA II'nin antijenik özelliğine etkisi	70
Şekil 20. Bireylerdeki CA I formları otoantikor titreleri	72
Şekil 21. Bireylerdeki CA II formları otoantikor titreleri	73
Şekil 22. Antioksidan enzim aktiviteleri	75
Şekil 23. Eritrosit MDA sonuçları	76
Şekil 24. HNE, 3-NT ve Plazma MDA düzeyleri	77
Şekil 25. İnflamatuvar sitokinler	79

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. İmmünizasyon yapılan Balb-c fare görüntüsü	47
Resim 2. Saflaştırılan enzimin (CAI ve CA II) Coomassie Brilliant Blue R-250 İle boyanmış SDS-PAGE görüntüsü	64
Resim 3. MDA ile modifiye edilmiş CA izoenzimleri için western blot görüntüsü	65
Resim 4. PN ile modifiye edilmiş CA izoenzimleri için western blot görüntüsü	65
Resim 5. HNE ile modifiye edilmiş CA izoenzimleri için western blot görüntüsü	66

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

ACCP	Anti Siklik Sitruline Protein
AGE	İleri Glikozilasyon Son Ürünleri
ALE	İleri Lipid Peroksidasyon Son Ürünleri
AS	Ankilozan Spondilit
CA	Karbonik Anhidraz
CARP	Karbonik Anhidraz İlişkili Protein
CAT	Katalaz
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbant Assay
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
HNE (4-HNE)	4-Hidroksinonenal
IgG	İmmün Globulin G
IL-6	İnterlökin 6
MDA	Malondialdehit
NT (3-NT)	3- Nitrotirozin
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
PN	Peroksinitrit
RA	Romatoid Artrit
RF	Romatoid Faktör
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
SjS	Sjögren’s Sendromu
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBS	Tuzlu Tris Tamponu
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
SİMGELER	
α	Alfa
μ	Mikro

1. ÖZET

Oksidatif Olarak Modifiye Edilmiş Karbonik Anhidraza Karşı Otoantikor Oluşumunun ve Bu Antikorların Bazı Romatoid Hastalıklarla İlişkisinin İncelenmesi

Karbonik anhidraz (CA) geniş doku dağılımı olan bir metaloenzimdir ve bazı romatoid hastalıklarda bu enzime karşı otoantikor oluşmaktadır. Oksidatif stresin CA otoantikor oluşumu tetiklediğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmada karbonik anhidrazın 4-hidroksinonenal (HNE), malondialdehit (MDA), peroksinitrit (PN) ile modifikasyonunun CA otoantikorlarının oluşumu üzerine etkisi ve romatoid artrit (RA), ankilozan spondilit (AS), Sjögren's sendromu (SjS) hastalarında bu antikorlarla oksidan-antioksidan durum arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada eritrositlerden izole edilen CA I ve CA II izoenzimleri HNE, MDA ve PN ile modifiye edilip modifikasyonlar Western Blot ile teyit edildi. Antijeniteye modifikasyonların etkilerini incelemek amacıyla Balb-c fareler bu maddelerle immünize edildi ve serumlarında otoantikor titreleri ELISA ile belirlendi. Çalışma gruplarında CA ve modifiye CA otoantikorları belirlendi. Ayrıca hastalardan elde edilen serum ve eritrositlerde MDA, HNE, 3-nitrotirozin (3-NT), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutayon peroksidaz (GSH-Px) ölçülerek hastalardaki oksidan-antioksidan durum değerlendirildi. Antikor oluşumunu ve inflamasyonu tetikleyen sitokinler tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interleokin-6 (IL-6) ölçülerek otoantikorlarla arasındaki ilişki incelendi. Bireylerde PN modifiye CA I ve CA II otoantikorları kontrolle karşılaştırıldığında bütün gruplarda anlamlı fark bulundu. Saf CA ve modifiye formların otoantikor titreleri ile kontrol grupları arasında anlamlı fark görüldü ($p<0.001$). Farelerde modifiye formlar saf CA formuyla karşılaştırıldığında HNE ve MDA'nın antijenik özelliği azaltırken PN'nin arttırdığı belirlendi. Sonuç olarak oksidatif modifikasyonların CA izoenzimlerinin antijenik özelliklerini değiştirdiği özellikle PN ile yapılan modifikasyonların antijeniteyi arttırdığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: Karbonik Anhidraz, Oksidatif Stres, Otoantikorlar, Protein Modifikasyonu.

2. SUMMARY

The Investigation Of Autoantibody Formation Against Oxidatively Modified Carbonic Anhydrase And The Relationship Between These Antibodies And Some Rheumatoid Diseases

Carbonic anhydrase (CA) is a metalloenzyme with wide tissue distribution and in some rheumatoid disease autoantibodies formed against these enzymes. Recent studies have suggested that oxidative stress triggers anti-CA antibody formation. In this study we aimed to investigate the effects of CA modifications with 4-hydroxynonenal (HNE), malondialdehyde (MDA), peroxynitrite (PN) on CA autoantibody formation and the relationship between these antibodies and oxidant-antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis (RA), ankylosing spondylitis (AS), Sjögren's syndrome (SjS). In the present study CA I and CA II isoenzymes, isolated from erythrocytes, were modified with HNE, MDA and PN and the modification were verified with Western Blot analysis. Balb-c mice were immunized with these agents to determine the effects of the modification on antigenicity and also antibody titers were detected in the sera of mice. Autoantibody titers detected in individuals sera. In addition MDA, 4-HNE, 3-nitrotyrosine (3-NT), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured in serum and erythrocyte samples of the patients, thereby oxidant-antioxidant status was evaluated. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) are cytokines which trigger antibody formation and inflammation, were measured and relationship between autoantibody and these molecules were determined. Patients PN-modified CA I and CA II autoantibody levels were found significantly different ($p < 0.05$) in all groups compared with their controls. Significant difference was found between the autoantibody titers of both native and modified forms of CA and control groups ($p < 0.001$). When modified forms compared with native forms in mice, it was found that HNE and MDA decreased the antigenicity while PN increased. In conclusion, oxidative modifications altered the antigenic properties of CA isoenzymes, especially PN modifications increased the antigenicity.

Keywords: Carbonic Anhydrase, Oxidative Stress, Autoantibodies, Protein Modification.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

CA bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan monomerik yapılı bir metaloenzimdir. Memelilerde 16 farklı izoformu bulunan bu enzim, karbondioksitin (CO_2) hidrasyonu veya bikarbonatın (HCO_3^-) dehidrasyon reaksiyonlarını dönüşümlü olarak katalizleyerek, CO_2 ' in taşınması, elektrolit sekresyonu, pH' nın kontrolü, biyosentez olayları ve kalsifikasyon gibi birçok fizyolojik olayda rol almaktadır (1, 2). Birçok hastalıkta çeşitli CA izoenzimlerine karşı bir immün cevap olduğu gösterilmiştir. Hayvan modellerinde de çeşitli hastalıklarda CA otoantikorlarının olduğu ve CA II immünizasyonu ile çeşitli otoimmün hastalıkların oluşturulabileceği ifade edilmiştir (3, 4). Özellikle CA I ve CA II izoenzimlerine karşı oluşmuş otoantikorlar sistemik lupus eritematoz (SLE), SjS, RA, Grave' s hastalığı, hepatitler ve son dönem böbrek yetmezliği olan hastaların serumlarında bulunmuştur. CA izoenzimlerine karşı otoantikor üretim mekanizması ve bu mekanizmayı etkileyebilecek faktörler net olarak ortaya konulamamıştır (5-8).

Anabilim dalımızda yapılan bir çalışmada RA hastalarında CA II otoantikor titreleri ile eritrositlerdeki oksidatif stres arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (6). Oksidatif stres durumunda ROS ve RNS doğrudan veya oksidatif/nitrozatif stresin HNE, MDA ve PN gibi sekonder ürünleri ile dolaylı olarak proteinler, karbohidratlar ve DNA gibi biyomolekülleri modifiye etmektedir. Proteinlerde meydana gelen oksidatif modifikasyonlar proteinlerin üç boyutlu yapısını değiştirerek enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarında değişim, proteaz inhibitör aktivitesinde kayıp, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, immünojenik aktivitede artış gibi etkilere sebep olmaktadır. Bu modifikasyonlar proteini antijenik hale getirip kendisine karşı immün cevap oluşumuna sebep olmaktadır. Artmış oksidatif stres otoantikor üretimini tetiklemektedir (9). SOD geni çıkarılmış farelerde artan oksidatif stresin CA II' ye karşı immün cevap oluşumunu tetiklediği ve antioksidan kullanımının da bu cevabı azalttığı gösterilmiş ve CA II' ye karşı otoantikor üretiminde oksidatif stresin etkili olabileceği ifade edilmiştir (10).

RA, AS ve SjS kronik seyirli inflamatuvar romatoid hastalıklardır. Bu hastalıklara sahip bireylerin serumlarında bazı CA izoenzimleri de dahil olmak üzere çeşitli antijenlere karşı gelişmiş otoantikorlar belirlenmiştir (11-13). Ayrıca bu hastalıklar artmış oksidatif stresle de ilişkilidir. SjS gözyaşı ve tükürük bezleri başta olmak üzere vücuttaki

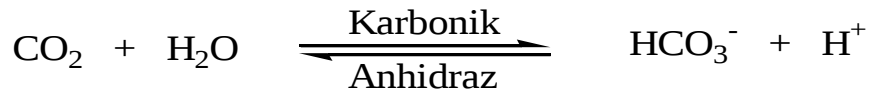
birçok ekzokrin organı etkileyebilen inflamatuvar sistemik bir hastalıktır. SjS gözyaşı ve tükürükte azalma ile karakterizedir ve bu durum (kserostomi) ağız kuruluğu ve göz kuruluğu (sikka kompleksi) ile sonuçlanmaktadır (14). SjS hastalarında çok sayıda antijene karşı otoantikor gelişmektedir. AS aksiyal iskeleti etkileyip omurganın birleşmesine neden olan immün aracılıklı bir hastalıktır. Bu hastalıkta zayıf da olsa bazı antijenlere karşı otoantikor gelişmektedir. RA özellikle eklemleri tutan, eklem çevresinde harabiyete sebep olabilen ve CA'nın da içinde bulunduğu birçok antijene karşı antikor gelişiminin olduğu otoimmün bir hastalıktır (15, 16).

Bu çalışmada, üzerinde en fazla araştırma yapılan CA izoenzimlerinden CA I ve CA II' ye karşı otoantikor oluşumunda HNE, MDA ve PN modifikasyonlarının etkisinin ortaya konulması, otoantikor oluşumlarının farklı düzeylerde olduğu RA, AS ve SjS hastalarında saf ve modifiye CA izoenzimlerine karşı otoantikor titrelerinin belirlenmesi ve bu otoantikor titreleri ile oksidatif stres arasındaki ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz (CA, E.C.4.2.1.1, karbonat hidroliyz) bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde Zn^{2+} iyonu ihtiva eden monomerik yapılı bir metaloenzimdir. İlk defa 1933 yılında memeli eritrositlerinden saflaştırılmıştır. CA' ın temel fizyolojik fonksiyonu CO_2 'in hidrasyonu veya HCO_3^- 'in dehidrasyon reaksiyonlarını dönüşümlü olarak katalizlemesidir (1).



Solunum, HCO_3^- ın dokular ve akciğerler arasında metabolize olmasında, pH ve CO_2 homeostazında, doku ve organlardaki elektrolit sekresyonunda, birçok biyosentez reaksiyonunda (glukoneogenez, lipogenez, üregenez vb.), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu, idrar asidifikasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi daha birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol almaktadır (2).

Fizyolojik önemi bugüne kadar belirlenememekle beraber, CA karboksilik, sülfonik, karbonik ve fosforik esterlerin, aldehytlerin ve pirüvatın hidrolizini de katalizler (17).

4.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

CA, prokaryotlardan ökaryotlara kadar çok geniş bir dağılıma sahip olup birbirinden bağımsız dört gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Bunlar α -CA (omurgalılar, bakteriler, algler ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında), β -CA (çoğunlukla bakteriler, algler, tek ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında), γ -CA (temel olarak archealarda ve bazı bakterilerde) ve δ -CA' dır (bazı deniz diatomlarında) (18).

En iyi karakterize edilen enzimler memelilerde tanımlanmış olup α -sınıfı enzimlerdir. Doku dağılımı ve hücreyel yerleşimi, katalitik özellikleri ve inhibitör duyarlılığı, fizyolojik ve patolojik rolleri birbirinden farklı olan 16 α -CA izoenzimi (Tablo 1) ve katalitik aktivitesi olmayan CA benzeri protein (CARP) bulunmuştur (19-21).

Tablo 1. α -CA izoenzimleri, hidrataz aktivitesi, sülfonamid inhibitörleri için afinite ve hücre içi yerleşimleri (18)

İzoenzim	Katalitik aktivite (CO ₂ hidrataz)	Sülfonamidler için afinite	Hücre içi yerleşim
CA-I	Orta dereceli	Orta dereceli	Sitozol
CA-II	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CA-III	Çok düşük	Çok düşük	Sitozol
CA-IV	Yüksek	Yüksek	Membrana-bağılı
CA-VA	Düşük-orta dereceli*	Yüksek	Mitokondri
CA-VB	Yüksek	Yüksek	Mitokondri
CA-VI	Orta dereceli	Yüksek	Tükrük/süt içinde
CA-VII	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CARP-VIII	Yok	#	Sitozol
CA-IX	Orta dereceli-yüksek	Yüksek	Transmembran
CARP-X	Yok	#	Salgılanır
CARP-XI	Yok	#	Salgılanır
CA-XII	Düşük	Çok yüksek	Transmembran
CA-XIII	Orta dereceli	Orta dereceli- yüksek	Sitozol
CA-XIV	Orta dereceli	Yüksek	Transmembran
CA-XV	Düşük	Bilinmiyor	Membrana bağlı

*pH 7,4'te düşük, pH 8,2'de orta dereceli veya yüksek

Doğal CARP izoenzimleri Zn(II) içermezler, bu yüzden sülfonamid inhibitörleri inhibitörleri için afiniteleri belirlenmemiştir.

4.2.1. Karbonik Anhidraz I

CA I, eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan sitozolik proteindir. İnsan eritrositlerinde CA II'den yaklaşık 6 kat daha fazla bulunan ancak aktivitesi CA II'nin % 15'i kadar olan bir izoenzimdir ($K_{cat}=2.10^5s^{-1}$). Aktivitesi çok yüksek olmamasına rağmen sağlıklı yetişkin eritrositlerinde CA I, total CA aktivitesinin %

15'sini oluşturmaktadır (17). CA I insan fetal eritrositlerinde bulunmaz. CA I, Cl⁻ tarafından inhibisyonda CA II'den daha fazla, sülfonilamid inhibitörlerinden de CA II'ye göre daha az etkilenir. CA I kalın bağırsak ve kornea epitellerinde, lenste, ter bezlerinde, miyoepitelyal hücrelerde, nötrofillerde ve yağ dokusunda bulunur. CA I birçok dokuda bulunmasına rağmen doku dağılımı CAII kadar fazla değildir.

4.2.2. Karbonik Anhidraz II

CA II, üzerinde en fazla çalışma yapılan sitozolik CA izoformudur. Hemen hemen her doku ve organda bazı hücre tiplerinde bulunur. CO₂ hidrasyonu için maksimum turnover sayısına sahip (1.10^6 s^{-1}) en yüksek katalitik aktiviteli ve en geniş dağılımlı izoenzimdir (22). CA II kemikte osteoklastlarda, beyinde, oligodendrositler ve beyin epitelyumunda, gözde lensler ve retina müller hücrelerinde, karaciğerde, böbrekte, salgı bezlerindeki asiner hücrelerde, pankreatik kanal hücrelerinde, gastrik parietal hücrelerde, uterusun endometriumunda, endotel hücrelerde, spermatozoada, eritrositlerde, trombositlerde bulunur. Bazı hücrelerde CA II asit-baz dengesi için temel rol oynar. Üriner asidifikasyon üretimi için H⁺ salgılayan renal tubuler, gastrik parietal hücreler tarafından H⁺ salgısına katkıda bulunur (1). CA II pankreas sıvısı için HCO₃⁻ katkısı yapan pankreatik kanal hücrelerine HCO₃⁻ temin eder. Dönüşümsüz körlüğe sebep olan glakomda CA II enziminin önemli rolü vardır. Bu hastalık anormal derecede yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkmaktadır. Dünyada on milyonu aşkın kişinin yüksek göz içi basıncına sahip olduğu tahmin edilmektedir. Aköz humor göz içi basıncının sağlanmasında büyük rol oynamaktadır (23). Aköz humorun salgılanmasında da CA II enziminin uyarıcı etkisi vardır. CA II aynı zamanda böbrekte, eritrositlerde ve karaciğerde proksimal tubüllerde CO₂ değişimine katkıda bulunur (24). CA II eksikliğinde beyin, böbrek ve kemikte serebral kalsifikasyon, renal tübüler asidoz ve osteropetrozis ile ilişkili önemli durumlar ortaya çıkmaktadır (7).

4.3. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem

Serbest radikaller bir yada daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Normal metabolizma olayları sırasında üretilmektedirler. Radikallerin canlıya zarar verme potansiyeli olmasına rağmen bazı metabolik olayların devamlılığı için bunların oluşumu kaçınılmazdır. Bu moleküller fizyolojik olarak mitokondriyal elektron transport sistemi reaksiyonları, ksantin oksidaz, lipooksijenaz gibi enzimlerin

reaksiyonları, antimikrobiyal aktivite sırasında oluşan solunum patlaması, otooksidasyon reaksiyonları gibi birçok endojen kaynak tarafından üretilmektedirler. Ayrıca bu moleküller çevresel ajanlar, farmasötikler, endüstriyel kimyasallar, sigara gibi bir dizi ekzojen kaynak tarafından da üretilmektedir (25).

Oksijen fazla etkin olmayan ancak in vivo şartlarda çok etkin türevlere metabolize olabilen bir bileşiktir. Oksijen canlı sistemde iki şekilde indirgenmektedir. Bunların ilki oksijenin 4 elektron alarak suya indirgenmesidir (% 95 oranında). İkincisiyse oksijenin basamak basamak tek değerli indirgenmeye uğramasıdır (% 5 oranında). Serbest radikaller de bu olay sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde, biyolojik sistemlerde ortaya çıkan en önemli serbest oksijen grupları süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve singlet oksijendir (1O_2).

Son derece reaktif olan bu moleküller ve bünyelerindeki elektron açığını kapatmak için lipitler, proteinler, karbohidratlar, nükleik asitler gibi birçok biyomoleküle saldırabilmektedir.

Oksijen serbest radikalleri yada daha genel ismiyle reaktif oksijen türleri (ROS) ve benzer şekilde reaktif nitrojen türleri (RNS) denen bu moleküller normal hücresel metabolizmanın ürünleridir. Düşük ve orta düzeydeki konsantrasyonları yararlı etkilere sahipken yüksek miktarları büyük oranda hücre hasarına sebep olabilmektedir. Oksidan moleküller şeklinde de adlandırılan ROS ve RNS doğrudan yada dolaylı olarak biyomoleküllere hasar verebilmektedir. Bu nedenle reaktif türlerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” olarak adlandırılmaktadır. Bu savunma sisteminde görev alan moleküllere de “antioksidan moleküller” denilmektedir (26). Antioksidan moleküller etkilerini dört farklı yolla ortaya koyabilmektedir. Oksidan molekülleri daha zayıf başka bir moleküle çevirerek, kendilerine bağlayarak veya moleküllere bir hidrojen aktararak onların aktivitelerini azaltarak hatta yok ederek etkisiz hale getirebilmektedirler. Bir diğer yol ise oksidatif olarak hasar görmüş molekülleri onarmaktır (27).

Antioksidanlar hücrede farklı kompartmanlarda veya hücre dışında yerleşerek savunma mekanizmasında rol oynamaktadır. Antioksidanlar enzimatik olarak etki gösterebilecekleri gibi non-enzimatik olarak da etki edebilmektedirler.

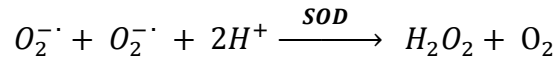
Enzimatik olarak etki eden antioksidanlar, hücrenin çeşitli organellerinde etki gösteren süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi enzimlerden oluşmaktadır. Çeşitli metal iyonlarını bağlama, serbest radikalleri yakalama, hapsetme ve süpürme gibi etkilere sahip glutatyon, bilirubin, ferritin, seruloplazmin ve ürik asit gibi yapılar non-enzimatik antioksidanlardır.

En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu hidrojen peroksite dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve hidrojen peroksiti suya indirgeyen katalaz (CAT)'dır. Bu endojen antioksidan enzimler serbest radikalleri zararsız hale getirmede büyük paya sahiptirler. Böylece organizma serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin oluşturacağı zarardan ya daha az etkilenir ya da hiç etkilenmez (28, 29).

4.4. Antioksidan Enzimler

4.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1.), süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir.



Katalizlediği reaksiyondan da anlaşılacağı üzere SOD gerçekte detoksifiye edici bir enzim değildir. Çünkü reaksiyon sonucunda oluşan H_2O_2 toksik bir moleküldür. Fakat bu reaksiyon süperoksit radikalinin detoksifikasyonuna giden yolun ilk basamağını oluşturmaktadır. İkinci basamak katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri tarafından H_2O_2 'in suya dönüşmesini sağlanmaktadır. Bu şekilde detoksifikasyon gerçekleştirilmektedir (28).

İnsanda iki tip SOD bulunmaktadır. Bunlar, sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerlerdir (Mn SOD).

Temel fonksiyonu oksijenin metabolize edildiği hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerinden korumaktır. Bu şekilde süperoksit radikalinin başlatabileceği lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir. Oksijen kullanımının fazla olduğu dokularda SOD aktiviteside yüksektir ve oksijenin kısmi basıncının artışı ile SOD aktivitesi artmaktadır.

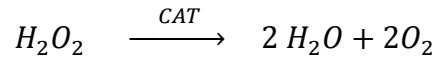
Fizyolojik şartlarda hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde hücre içi süperoksit düzeyi düşürülmektedir. SOD'un hücre içi aktivitesi çok yüksekken hücre dışı aktivitesi çok düşüktür (30, 31).

SOD fagosit edilmiş bakterilerin hücre içinde etkisiz hale getirilmesinde de rol oynadığından granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de yüksek oranda SOD bulunmaktadır. SOD enziminin yüksek katalitik aktivitesi sayesinde hücrelerde süperoksit birikimi engellenmektedir (32).

4.4.2. Katalaz (CAT)

Katalaz (EC 1.11.1.6) 4 tane hem grubu bulunduran hemoproteindir. Her alt birim enzimin kararlılığında rol oynadığı düşünülen bir molekül NADPH içermektedir. Katalaz oksijenli solunum yapan sitokrom sistemi içeren tüm hücrelerde bulunmaktadır.

Katalaz peroksizomlar başta olmak üzere endoplazmik retikulum ve sitozolde bulunmaktadır. Aktivitesi; karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kaslar ve eritrositlerde yüksektir. Görevi, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır (33).

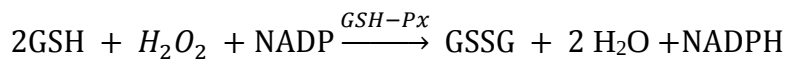


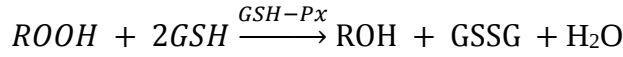
Katalaz hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük molekülleri indirgeyebilmektedir. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmemektedir (34).

4.4.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz (EC 1.11.1.19), 4 selenyum içeren tetramerik yapıda sitozolik bir enzimdir. En çok karaciğer ve eritrositte bulunmaktadır. Katalaz gibi hücrede H_2O_2 'nin temizlenmesinden sorumlu enzimdir. GSH-Px hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesini (lipit peroksidasyonunda zincir kırıcı etki) katalizler. Bu şekilde memeli hücreleri oksidatif hasara karşı korunmaktadır (35).

Glutasyon peroksidaz enzimi hidroperoksitlerin indirgenmesi reaksiyonu esnasında redükte glutasyonu (GSH) elektron alıcısı olarak kullanır ve sonuçta oluşan okside glutasyon (GSSG) NADPH bağımlı glutasyon redüktaz enzimi tarafından rejenere edilir.





Glutasyon (γ -glutamil sisteinil glisin, GSH); serbest sülfidril grubu içeren bir tripeptittir. Eritrositlerde GSH-Px hemoglobinin methemoglobine oksidasyonunu azaltarak eritrositin ömrünü uzatır (36).

4.5. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde olup ve bu durum “oksidatif denge” olarak tanımlanmaktadır. Çünkü fizyolojik fonksiyonları yerine getirebilmesi ile hasar oluşturma arasındaki denge ROS ve RNS’lerinin oluşum ve ortamdaki uzaklaştırılma hızına göre değerlendirilmektedir. Örneğin, bir hücrede saniye yaklaşık 50 hidroksil radikali oluşturmakta ve gün boyunca bu sayı 4 milyona ulaşmaktadır. Oluşan bu moleküller ya antioksidanlar tarafından uzaklaştırılmaktadır ya da çevredeki biyomoleküllere saldırılmaktadır (37).

Bu radikallerin oluşum hızındaki artış ya da ortadan kaldırılma hızındaki düşüş bu dengenin bozulmasına sebep olmaktadır. Bu şekilde oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulmasıyla oluşan duruma “oksidatif stres” denilmektedir. Artan oksidanlar dokularda harabiyete, proteinler, nükleik asitler, yapısal karbohidratlar ve lipidler gibi birçok biyomolekülün hasarına sebep olabilmektedir (38, 39).

Serbest radikallerin DNA ile reaksiyonu sonucunda baz ve şeker modifikasyonları, baz delesyonları ve zincir kırılmaları gerçekleşebilmektedir. DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona, hücresel disfonksiyona ve ölüme yol açabilmektedirler (40).

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar DNA ve proteinlere bağlanıp çapraz bağlar oluşturabilir. İnflamatuvar eklem hastalıklarında ve katarakta bir mukopolisakkarit olan hyalüronik asiti parçalarlar (41).

Proteinler, serbest radikal hasarına duyarlı moleküllerdir. Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit içeriğine göre değişir. Serbest radikallerin etkisi ile protein molekülleri üzerindeki sülfhidril ve amino gruplarında daha fazla hasar meydana gelmektedir. Bununla beraber triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin,

lizin ve sistein gibi aminoasit içeren proteinler daha duyarlıdır. Serbest radikallerin proteinlerle etkileşmesi sonucu oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır:

- 1- Aminoasitlerin modifikasyonu,
- 2- Proteinlerin fragmantasyonu,
- 3- Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalarıdır.

Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler. Serbest radikallerin etkisiyle IgG ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinler üç boyutlu yapılarını kaybederler. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (42-46).

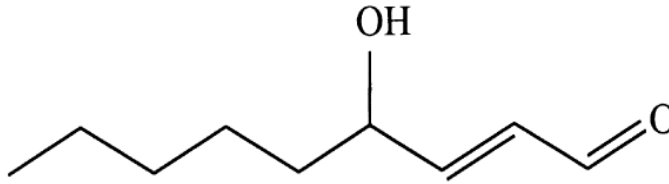
Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelebilir. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobin H_2O_2 ile reaksiyona girerek methemoglobin oluşturur (47-49).

Serbest radikallerin etkilerine karşı en duyarlı olan ve en çok maruz kalan moleküller lipidlerdir. Biyomoleküller arasında doymamış yağ asitleri yapılarındaki $C=C$ çift bağlar nedeniyle radikal hasarına en hassas olanlarıdır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı “lipid peroksidasyonu” olarak tanımlanmaktadır. Lipid peroksidasyonu hem bitkilerde hem de hayvanlarda gerçekleşebilen kompleks bir işlemdir. Bir hidrojen çıkışıyla veya bir oksijen radikalının eklenmesi ile başlatılan ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) hasarıyla sonuçlanan geri dönüşümsüz bir zincir reaksiyonudur. Lipid peroksidasyonu genel olarak serbest radikaller ya da radikalik yapıda olmayan maddeler gibi oksidan moleküllerin özellikle çoklu doymamış yağ asitleri gibi karbon-karbon çift bağı içeren lipitlere saldırması ile başlatılan lipid peroksil radikalleri ve hidroperoksitlerin oluşumuyla sonuçlanan bir reaksiyon dizisi olarak tanımlanır. ROS, lipid peroksidasyonunu indükleyerek fonksiyonel ve yapısal hücre hasarına neden olabilmektedir. Bu nedenle serbest radikal kaynaklı hasarın ana kaynağı lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu hücre membranlarının bütünlüğünü tehlikeye sokar ve hücre membranının akışkanlığını artırır. Membrana bağlı reseptör ve enzimlerin inaktive olmasına neden olur (39).

Lipid peroksidasyonu sürecinde birçok sitotoksik sürecin başlatılmasına sebep olabilen çok sayıda aldehitik yapılı yan ürün de oluşabilmektedir. Bu kısa zincirli aldehitler temel olarak üç gruba ayrılmaktadır. 4-hidroksi-2-alkenaller lipid peroksidasyonuna spesifik en baskın aldehit formudur. Lipid peroksidasyonundan köken alan diğer önemli reaktif aldehit formu ketoaldehitlerdir ve bunların en önemlisi malondialdehittir. 2-heksenal ve akroleinin de içinde bulunduğu 2- alkenaller lipid peroksidasyonu sürecinde oluşan reaktif yan ürünlerdir (50, 51).

4.5.1. 4-Hidroksi-2-nonenal (HNE)

Kimyasal yapısı Şekil 1’de gösterilen 4-hidroksi-2,3-*trans*-nonenal ilk kez 1991 yılında Hermann Esterbauer ve arkadaşları tarafından karakterize edilmiştir (52).



Şekil 1. 4-hidroksi-2,3-*trans*-nonenalın kimyasal yapısı

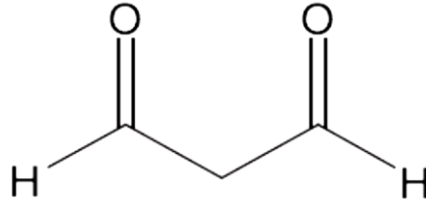
HNE, linoleik asit, ve araşidonik asit gibi w-6 çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan ana aldehid yapılı son üründür. Molekül ağırlığı 156 g/mol olan amfifilik bir bileşiktir. 4-Hidroksi-2,3-*trans*-nonenal, 4-hidroksinonenal ya da HNE olarak da kısaltılmaktadır. Yapısında 3 farklı fonksiyonel grup içeren çok reaktif bir moleküldür. Bu fonksiyonel gruplar karbonil grubu C=O, C=C çift bağ içeren konjuge yapı ve hidroksil grubudur. C=C çift bağı ile indirgenme ve epoksidasyon reaksiyonları ve tiyol grupları ile Michael eklenmesi reaksiyonu vermektedir. Karbonil grubu ile asetal/tiyoasetal yada Schiff bazı oluşumu, indirgenme veya yükseltgenme reaksiyonu verebilmektedir. OH- grubu ile yükseltgenerek keton oluşturabilmektedir.

HNE, protein zincirindeki özellikle sistein histidin ve lizin rezüleri üzerinden HNE-protein ürünleri oluşturmaktadır. Nadiren de arjinin ve glutamata bağlanabilmektedir. Bu moleküller arasında ilgi sırası Cys>> His> Lys şeklinde değişmektedir. Bu eklenme reaksiyonlarında protein üzerindeki amino asit rezidüsünün önemli olmakla birlikte polarite, mikro çevre, tersiyer veya kuarterner yapıya ulaşılabilirlik gibi faktörler de

önemli rol oynamaktadır (53). Birçok biyolojik aktiviteye sahiptir bununla beraber çok sayıda da sitotoksik, genotoksik, mutajenik ve ileri sinyal etkisi göstermektedir (49). Biyolojik etkisini kimyasal yapısına bağlı olarak göstermektedir. Proteinler, peptidler, fosfolipidler, nükleik asitler ve diğer biyomoleküllerle hızlı bir şekilde reaksiyon verebilmektedir(54).

Metabolik sendrom, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar kanser gibi birçok hastalıkta HNE sadece oksidatif stres markırı olarak değil aynı zamanda hastalığa sebep olan bir ajan olarak rol oynamaktadır (55).

4.5.2. Malondialdehit (MDA)



Şekil 2. Malondialdehitin kimyasal yapısı

Malondialdehit üç karbonlu düşük molekül ağırlıklı bir aldehittir. Kimyasal yapısı Şekil 2’de görülen MDA üç ya da daha fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan aldehit yapıları bir yan üründür. Serbest amino asitler ve proteinlerle Schiff bazı oluşturabilmektedir. Elektrofilik yapısından dolayı oldukça reaktif bir moleküldür. Lizin, histidin, arjinin gibi amino asitler güçlü bir şekilde reaksiyon vermektedir. Kimyasal olarak ROS’tan daha stabildir ve membranda geçebilmektedir (51).

MDA miktarı, lipid peroksidasyonunun derecesini göstermektedir. Bu nedenle lipidlerin oksidatif yıkımının ve doku hasarının belirteci olarak ölçülmektedir (56). En bol bulunan lipid peroksidasyonuna spesifik aldehittir. Lipid peroksidasyon çalışmalarında 2-tiyobarbitürik asit aracılığıyla belirlenmesi en yaygın ölçüm yollarından biridir.

Membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olan MDA; deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki

determinantların agregasyonu gibi etkileriyle iç membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca, nükleusa diffüze olabildiğinden DNA'nın nitrojen bazlarıyla da reaksiyona girmektedir. MDA, bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (51).

4.6. Nitrosatif Stres

Nitrik oksit ($\text{NO}^{\cdot}$) ortaklanmamış bir elektron içeren radikalik küçük bir moleküldür. Nitrik oksit fizyolojik ve patofizyolojik uyarılara cevap olarak L-arjininin L-sitruline metabolize edilmesi esnasında sentezlenmektedir. Bu reaksiyon nöronal (nNOS), indüklenebilir (iNOS) ve endotelial (eNOS) olmak üç izoformu bulunan nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından katalizlenmektedir (52).

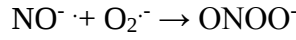
$\text{NO}^{\cdot}$ bol miktarda bulunan oldukça reaktif bir radikaldir. Kan basıncının düzenlenmesi, nörotransmisyon, savunma mekanizmaları, düz kasların gevşemesi ve immun düzenlenme birçok fizyolojik olayın gerçekleştirilmesinde rol alan önemli bir sinyal molekülüdür. Patolojik şartlarda sentezi artan nitrik oksit antimikrobiyal etki gibi yararlı etkiler gösterebilirken, sitotoksik etkiler de gösterip doku hasarına da sebep olabilmektedir (58, 59).

$\text{NO}^{\cdot}$ hem sulu ortamda hem de lipid ortamında çözünebilen bir moleküldür. Bu nedenle sitoplazmadan plazma membranına kolayca difüze olabilmektedir. $\text{NO}^{\cdot}$ ekstraselüler alanda oksijen ve suyla reaksiyon vererek nitrat ve nitrit anyonuna dönüşmektedir. $\text{NO}^{\cdot}$ ve süperoksit radikali ile reaksiyon verebilmektedir. Süperoksit radikalinin ortamda bulunduğu durumlarda süperoksit dismutaz enzimiyle nitrik oksit yarışmaktadır. Oksidatif stres durumunda süperoksit radikalinin miktarının artması ve/veya SOD enziminin yetersiz kalması durumunda nitrik oksitle süperoksit peroksinitrit oluşturmak üzere reaksiyona girer. Bu molekülde reaktif nitrojen türlerindendir.

Reaktif nitrojen türlerinin aşırı üretimine “nitrozatif stres” denilmektedir. Nitrozatif stresin ana kaynağı peroksinitrittir. Nitrozatif stres nitrozilasyon reaksiyonlarına sebep olmaktadır (60, 61).

4.6.1. Peroksinitrit (PN)

Peroksinitrit, iki serbest radikalın (nitrik oksit ile süperoksit anyonunun) endojen reaksiyonu sonucu oluşan son derece reaktif bir moleküldür.



Bu molekül oldukça güçlü oksitleyici ve nitratlayıcı bir ajandır ve bu etkisini fizyolojik pH'da sergileyebilmektedir (61).

Fizyolojik peroksinitrit sentezindeki ön maddeler radikal yapıda iken peroksinitrit radikalik yapıda olmayan bir anyondur. Fakat verdiği hasar bu radikallere kıyasla çok daha ileri seviyededir. Ayrıca öncül maddeleri ile karşılaştırıldığında peroksinitrit extraselüler alandaki 10 milisaniyelik yarı ömrü ile kendisini oluşturan maddelere göre kısmen stabil ve uzun ömürlüdür (62).

Özellikle proteinlerin tirozin rezidüleri, tiyol grupları ve doymamış yağ asitleri gibi birçok biyomolekül peroksinitrit ile okside olabilmekte ve/veya nitrozillenebilmektedir. Proteinlerin nitrozillenmesi aterosklerotik lezyonlarda, neonatal akciğer hasarında, hipertansiyonda, Parkinson, Huntington ve Alzheimer hastalıklarında, multiple sklerozda, otoimmün miyokarditisde, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozda gözlenmektedir (63-73).

4.7. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu

Proteinlerin oksidatif modifikasyonu protein oksidasyonu olarak bilinmektedir. Protein oksidasyonu, proteinlerin ROS/RNS ile doğrudan veya oksidatif/nitrozatif stresin sekonder ürünleri ile dolaylı reaksiyonu sonucu meydana gelen modifikasyondur. Tanımdan da anlaşılacağı üzere protein oksidasyonu sadece ROS/RNS ile indüklenmez aynı zamanda ROS etkisiyle oluşan lipid peroksidasyon ürünleri (MDA, HNE, vb.) ve süperoksit ve nitrik oksit radikallerinden oluşan PN ve şeker gliksidasyon ürünleri de proteinlerin aminoasit içeriğinde modifikasyonlara neden olmaktadır. Proteinlerin modifikasyonunda asıl grubu proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonlar oluşturmaktadır (42, 45, 74).

Bu modifikasyonlar ROS, RNS veya bu reaktif türlerin biyomoleküllere saldırmasıyla oluşan yan ürünlerin proteinlerin amino asit rezidüleriyle verdiği reaksiyon sonucu gerçekleşmektedir. Modifikasyon sonucunda proteinler, polipeptit zincirlerinin fragmentasyonu ile düşük molekül ağırlıklı ürünler oluşturabilmekte veya protein-protein çapraz bağları ile yüksek molekül ağırlıklı ürünlere dönüşebilmektedir. Meydana gelen oksidatif değişiklikler proteinlerin üç boyutlu yapısı bozabilmekte ve hücrede önemli

roller üstlenen proteinlerin fonksiyonlarını etkileyebilmektedir. Bunun sonucunda protein agregasyon ve fragmentasyon hızında artış, enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarında azalma, proteaz inhibitör aktivitesinde kayıp, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozda bozulma, gen transkripsiyonunda değişiklik, immünojen aktivitede görülebilmektedir. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu, kalp-damar sistemi rahatsızlıkları da dâhil olmak üzere bir çok bozukluk ile hastalığın etyolojisinde ve ilerlemesinde rol oynar. Protein karbonil oluşumu, tiyol gruplarının kaybı, nitrozin oluşumu ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşumu protein oksidasyonuna yol açan başlıca moleküler mekanizmalardır. Oksidasyonla ilgili mekanizmaların çokluğundan dolayı proteinlerin oksidatif modifikasyonu ile ilgili kabul edilen genel bir sınıflandırma yoktur (43, 45).

Bu oksidatif modifikasyonlar dönüşümlü modifikasyonlar ve dönüşümsüz modifikasyonlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. HNE, MDA ve PN bu moleküllere kovalent olarak bağlanmaktadır ve oluşan modifikasyon dönüşümsüzdür (9).

4.8. Otoimmünite

İmmün sistemin temel görevi kendisinden olanı kendisinden olmayandan ayırma, yabancı olan antijenleri tanıma ve onlara karşı immün cevap oluşturmaktır. İmmün sistem bu denetimi ve immün cevap oluşturma görevini B ve T lenfositler ile makrofajlar gibi hücreler vasıtasıyla gerçekleştirmektedir (15).

Fizyolojik şartlarda hiçbir canlı kendi antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaz kendinden olan moleküllere karşı toleranslıdır buna 'self tolerans' denilmektedir. Canlıda çeşitli yollarla otoimmünite önlenmektedir. Fakat immün toleransı düzenleyen bir veya daha fazla temel mekanizma bozulduğunda immün sistem kendi antijenlerine karşı da immün cevap oluşturmaya başlamaktadır. Organizmanın kendi protein ve doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya otoimmünite denilmektedir (75).

4.8.1. Otoimmün Hastalıklar

Otoimmünitenin rol aldığı canlının kendi antijenlerine karşı immün cevap oluşturduğu hastalıklara otoimmün hastalıklar denilmektedir. Otoimmünite sadece organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya, T lenfositler ve antikorların varlığı ile ilgili bir durumdur. Her immün cevap bir hastalığa sebep

olmayabilir. Otoimmün hastalıkların başlıca özelliği meydana gelen doku hasarının immün sistemin kendi antijenlerine karşı başlattığı immün reaksiyon sonucu gerçekleşmesidir. Çölyak hastalığı, tip 1 diyabet (IDDM) ve SLE, SjS, Churg-Strauss sendromu, Hashimoto tiroidit, Graves hastalığı, idiyopatik trombositopenik purpura, RA bu hastalıkların en tanınmış olanlarıdır. Otoimmun hastalıkları gerçekleştiği organa göre iki gruba ayrılabilir. Hastalık belli bir organda gerçekleşiyorsa organ spesifik otoimmun hastalıklar olarak sınıflandırılmaktadır. Hastalık birden fazla organı etkiliyorsa organ spesifik olmayan yada sistemik otoimmun hastalıklar adını almaktadır. Otoimmun hastalıkların oluşma mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Fakat otoimmün hastalıkların oluşumunu tetikleyen birçok faktör bulunmaktadır (76).

1. Genetik faktörler
2. İmmünolojik faktörler
3. Hümmoral immün cevap
4. İmmün kompleksler
5. Hücrel immün cevap
6. Viral faktörler

4.8.2. Otoimmün Hastalıkların Patolojik Mekanizmaları

Otoimmünite adı verilen organizma için iç savaş denilebilecek bu olay sonucu otoimmun hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilecek immünopatolojik mekanizmaları şöyle sıralanmaktadır (15).

1. Hücrelerin iç kısmında bulunan immün sistemle doğrudan bağlantısı olmayan hücre dışına çıkmamış maddeler immün sistemle karşılaşp tanışmamış olduklarından, vücudun bağışıklık sistemi tarafından tanınmaz. Fakat mekanik darbeye hücrenin parçalanması gibi herhangi bir etkiyle, hücre içinde gizlenmiş olan bu proteinler hücre dışına çıkıp dolaşıma katılırsa immün sistem bu yapıları yabancı olarak algılayıp onlara karşı immün cevap oluşturur. Bu maddelerin bulunduğu dokulara da zarar verebilmektedir. Sempatik oftalmide bu mekanizma etkilidir. Normal şartlarda göz içerisinde bulunan ve dolaşıma çıkmayan antijen dolaşıma çıkınca immün cevap oluşumuna sebep olmaktadır.

2. Kimyasal, fiziksel ya da bazı biyolojik etkenler organizmadaki yapılara antijen özelliği kazandırıp bu yapıların vücudun bağışıklık sistemi tarafından yabancı olarak algılanmalarına neden olabilmektedir.

3. Bazen, vücuda dışardan girmiş olan yabancı maddeye karşı oluşturulan antikorlar çapraz reaksiyon denilen reaksiyon sonucu vücudun kendi proteinlerine de saldırabilmektedir.

4. Antikor oluşumunu sağlayan hücrelerde meydana gelen bazı değişiklikler vücudun kendi dokularına karşı antikor oluşturmalarına sebep olabilmektedir.

4.8.3. Otoantikorlar

Antikorlar, antijenlere karşı plazma hücreleri tarafından üretilen ve antijenleri ile birleşme özelliğine sahip spesifik globulinlerdir. Antijenler, organizmaya girdiklerinde immün yanıt oluşturan ve sonucunda ortaya çıkan antikor ve hücre yüzey molekülleri ile birleşme özelliği gösteren, organizmanın yapısına yabancı olan maddelerdir. Bunlar protein, karbohidrat, lipid, nükleik asit gibi farklı yapılarda olabilmektedirler. Çeşitli yollarla etki göstermektedirler (77).

- Antikorlar hücre dışı mikropların hücre duvarına tutunarak konak hücreyi enfekte etmelerini ve kolonizasyonunu önler. Polisakkarid yapısında olan ve kapsüllü olan mikroorganizmalara karşı savunmada hücresele immüniteden daha kuvvetlidir.

- Toksinlerin konak hücrelerine bağlanmasını önler, nötralize eder ve elimine eder.

- Antikorlar mikroorganizmaları kaplar (opsonizasyon), fagosit yüzeyindeki Fc reseptörüne bağlanarak onların fagositozunu kolaylaştırır.

- Antikor aracılı hücresele sitotoksosite: NK hücre ve lökositler, sahip oldukları FcR aracılığı ile antikor kaplı hücrelere bağlanırlar ve oluşan sinyaller ile aktive olurlar ve hedef hücrelere granüllerini boşaltarak öldürürler.

- Kompleman sistemini aktive ederler: IgM, IgG1, IgG3 ile klasik kompleman yolunu aktive ederler.

- Mukozal immün yanıtta rol oynar: Mukozal immünitenin temel mediatörü sekretuar IgA (sIgA) ve daha az miktarda IgM antikorudur. sIgA'nın mukozal yüzeylerde fonksiyonları; mikroorganizmanın tutunmasının önlenmesi, virus nötralizasyonu, enzim ve toksinlerin nötralizasyonu, antijen emiliminin baskılanmasıdır (78).

Organizmanın kendi antijenlerine (otoantijen) karşı oluşturduğu antikorlara otoantikor denilmektedir. Bu antikorlar tüm hücre tiplerindeki bir antijene karşı gelişebileceği gibi vücudun bir organının spesifik hücresindeki bir antijene karşı da gelişebilmektedir. Otoantikorlar kendi antijenlerine bağlanıp yukarıda bahsedilen mekanizmaları aktifleştirmektedir.

Otoantikorlar, antikorların spesifiklikleri, indüksiyonları, etkileri ve klinik önemleri bakımından oldukça heterojen bir grubunu oluşturmaktadır. Bu antikorlar proteinlere (hücre içi enzimleri, reseptörler, yapısal proteinler vs.), glikoproteinlere (beta-2 glikoprotein I vs.), nükleik asitlere (DNA, RNA), fosfolipidlere (kardiyolipin), glikosifingolipidlere (gangliosidler) karşı oluşabilmektedirler.

Otoantikorlar serum ve diğer vücut sıvılarında (sinoviyal sıvı, serebrospinal sıvı gibi) saptanabilirler. Tanındığı hedef yapı tipine göre dokulara da bağlanabilirler. İmmün yanıtın başlıca amacı organizmanın korunmasıdır. Bazen immün yanıt sonucu oluşan antikorlar patojen veya antijenden daha çok hasara neden olabilmektedir. Bu antikorlar otoimmün hastalığı olan hastalarda inflamasyon ve toleransın kaybının temel mekanizmaları hakkında bilgi vermektedir. Birçok otoimmün hastalıkta aylar veya yıllar öncesinden herhangi bir klinik bulgu gelişmeksizin otoantikorların varlığı gözlenmiştir. Otoantikorlar spesifik klinik bulgular, hastalık şiddeti ve ilerlemenin derecesini de gösteren belirteçlerdir (76, 78, 79).

Otoimmün hastalıkların anlaşılması zor kompleks yapıya sahip olmalarına karşın otoantikorların bu hastalıkların immunopatogenezinde önemli rolü vardır.

4.9. CA Otoantikorları ve Hastalıklarla İlişkisi

Inagaki ve arkadaşları ilk kez 1991 yılında sistemik lupus ertromatos veSjS hastalarının serumlarında CA II otoantikorlarının varlığını göstermiştir (5). Nishimaro ve ark. tarafından SjS hastalarında pankreas, tükürük bezi ve özafagus gibi ekzokrin organların ekstraklarında CA II'ye bağlanan monoklonal antikorun varlığı gösterilmiştir (80). Benzer şekilde Gordon ve arkadaşları tarafından otoimmün karaciğer hastalığında CA II otoantikorları tanımlanmıştır (81). Hayvan modellerinde yapılan bir çalışmada insan CA II ile PL/J ırkı fareleri immünize ederek otoimmün sialoadenitis oluşturulması başarılmıştır (1). Benzer şekilde daha sonraki yıllarda farklı araştırmacılar tarafından

Balb-c ırkı farelerin CA II ile immünizasyonu sonucu immün aracılıklı kolongitis ve pancreatitis oluşturulmuştur (4).

Anabilim dalımızda da yapılan çalışmalarda son dönem böbrek yetmezliği, RA, Grave's hastalarının serumlarında CA II otoantikörleri belirlenmiştir (6-8).

Ayrıca yapılan birçok çalışmada RA ve otoimmün pankreatit gibi otoimmün hastalığı olan kişilerin serumlarında CA I, CA II, CA III ve CA IV otoantikörleri belirlenmiştir (82, 83).

Bu çalışmaları takiben, polimiyosit, sistemik sikleroz, endometriyozis, otoimmün kolonjitis, kronik viral hepatit, Tip 1 diyabet gibi çeşitli hastalıklarda CA otoantikörleri belirlenmiştir (3, 5, 76, 84-87). Bazı hastalıklar için bu antikörlerin güvenilebilir bir teşhis göstergesi olabileceği ileri sürülmüştür (88). Özellikle AIC ile antimitokondrial antijeni negatif PBC hastaların ayırımında kullanılabileceği ifade edilmiştir (89).

CA II otoantikörleri birçok hastalıkta belirlenmesine karşın bu hastalıkların patolojisindeki rolü anlaşılamamıştır. Bu konuda araştırmacılar arasında çeşitli görüşler ileri sürülmektedir. Birincisi hastalığın patolojik seyrine bağlı olarak oluşan doku harabiyetinin bir sonucu olarak CA II'ye karşı bir antikor oluşturulduğudur. İkincisi oluşan antikörlerin CA II'ye karşı oluşmadığını, ancak, moleküler taklit (molecular mimicry)'den dolayı farklı bir antijene karşı üretilmiş antikörün CA II ile çapraz reaksiyon verdiğini ve bu antijenin membrana bağlı diğer CA izoenzimleri (CA IV, IX, XII) olabileceğidir. Fuji ve ark. 2007 yılında SOD geni çıkarılmış farelerde yaptıkları bir çalışmada, eritrositlerde artmış oksidatif strese bağlı olarak CA II'ye karşı antikor oluştuğunu ve bu antikor oluşumunu N-asetilsistein kullanımı ile azaldığını göstermişlerdir (10, 90). Ancak bugüne kadar kesin bir mekanizma ortaya konulamamıştır.

Birçok hastalıkta CA otoantikörleri belirlenmiş olmasına karşın hastalıkların patolojisindeki rolü tam anlaşılamamıştır.

4.10. Romatoid Artrit (RA)

RA, kronik seyirli inflamatuvar otoimmün bir hastalıktır. RA'nın etiyolojisi tam bilinmemektedir. Ancak yaygın görüşe göre hastalık, genetik olarak yatkın kişilerde, tam olarak bilemeyen çevresel etkenlerin antijenik uyarısıyla başlayıp immün sistemdeki

kompleks etkileşimlerle kronik hale gelmektedir. Etiyolojide rol oynadığı düşünülen faktörler; enfeksiyöz ajanlar, genetik, immün sistem bozukluğu, travma, stres, cinsiyet, endokrin, metabolik, çevresel, nutrisyonel ve psikolojik faktörlerdir (16).

Prevalansı yaklaşık % 0.8'dir, prevalansı yaşla beraber artmaktadır. Kadınlarda erkeklerden yaklaşık üç kat daha fazla görülmektedir. Genellikle yavaş ve sinsi bir şekilde başlayan RA kronik bir poliartrittr. İlk spesifik olmayan yakınmalar halsizlik, yorgunluk, iştahsızlık, kilo kaybı, yaygın kas-iskelet ağrılarıdır. Haftalar bazen aylar süren süreçte artralji, sabah tutukluğu ve eklemlerde şişlik gelişebilmektedir (15, 91).

Romatoid faktör (RF), romatoid artritli hastaların % 70-80'inde pozitifdir. Ancak RA için spesifik değildir birçok hastalıkta da pozitif sonuç vermektedir. Ayrıca bu hastaların yaklaşık % 28'inde CA II otoantikorları da belirlenmiştir (4). RA hastalarının büyük bir kısmında posttranslasyonel modifikasyona uğramış proteinlere karşı otoantikorlarının varlığı ile karakteristiktir. Anti siklik sitruline protein antikorları (ACCP), antiperinükleer faktör (APF), antikeratin antikorları (AKA), antifilagrin bunların bazılarıdır. ACCP RA'lı hastaların büyük çoğunluğunda belirlenmektedir. Bu antikorlar RA'da nispeten erken ortaya çıkmaktadırlar ve hastalık için yüksek özgüllük (% 98) sergilemektedirler (13, 92, 93).

4.11. Sjögren's Sendromu (SjS)

Gözyaşı ve tükürük bezleri başta olmak üzere vücuttaki birçok ekzokrin organı etkileyebilen inflamatuvar sistemik bir hastalıktır. Gözyaşı ve tükürükte azalma ile karakterizedir ve bu durum (kserostomi) ağız kuruluğu ve göz kuruluğu (sikka kompleksi) ile sonuçlanmaktadır (14).

SjS ekzokrin bezlerin lenfositik infiltrasyonu ve B lenfosit hiperreaktivitesi ile karakterizedir. Ayrıca kronik yorgunluk, eklem ağrıları da bu hastalığın en yaygın belirtilerindendir (15).

Olası prevalansı % 1 civarındadır. Tanı kriterleri çok katı olmasına rağmen sık rastlanan otoimmün romatizmal hastalıklardan biridir. Orta yaşlı ve yaşlı kadınlarda (45-55 yaş başlangıç yaşı) görülme sıklığı fazladır. Kadınlarda erkeklere göre 9:1 oranında daha fazla görülmektedir (94).

SjS kronik otoimmün bir hastalıktır. Organ spesifik ve organ spesifik olmayan bir dizi otoantikor varlığı ile karakterizedir. Anti SSA/Ro ve anti SSB/La antikorları, romatoid faktör, antinükleer antikorlar gibi organ spesifik olmayan, nükleer veya sitoplazmik antijene karşı gelişmiş bir dizi otoantikor Sjögren's sendromunun mevcudiyeti ile ilişkili olarak hasta serumlarında bulunabilmektedir (12, 95).

ANA (anti-nükleer antikorlar) normal hücre çekirdeği bileşenlerine reaksiyon gösteren antikorlardır. Sjögren's sendromlu hastaların % 70'inin ANA değerleri pozitifdir. Pek çok romatizmal hastalık için pozitif olan romatoid faktör, SjS hastalarının da % 60-70'inde pozitifdir. Anti-Ro/SSA ve anti-La/SSB antikorları SjS için gösterge antikorlardır. Hastaların yaklaşık % 70'inde SS-A, % 40'ında ise SS-B pozitifdir. SjS hastalarının serumlarında CA otoantikorları da belirlenmiştir (5). Bu antikorlar yaygın olarak görülmesine rağmen hastalığa spesifik değildir ayrıca birçok organda büyük oranda belirlenen otoantikorlar organ spesifik değildir (79, 96).

4.12. Ankilozan Spondilit (AS)

AS, omurganın birleşmesine neden olabilen esas olarak aksiyal iskeleti tutan sebebi tam olarak bilinmeyen kronik inflamatuvar romatizmal bir hastalıktır. Spondiloartrit grubu hastalıkları denen bir grup hastalığın önemli bir üyesidir.

Alt bel bölgesinde sabah tutukluğunun eşlik ettiği alt lumbal veya gluteal bölgede derin olarak hissedilen birkaç saat süren aktivite dönemlerinde düzelen dinlenme dönemlerinde tekrarlayan ağrılar AS'nin başlangıç belirtileridir. Erkeklerde bayanlara göre üç kat daha fazla görülmektedir (15).

Hastalığın etyolojisi açık olmamakla birlikte iyi bilinen genetik bir yapısı mevcuttur. Günümüzde kesin olarak bilinen AS ve HLA-B27 genleri arasındaki ilişki ilk kez 1973 yılında tanımlanmıştır. AS'li hastaların % 90- 95'inde HLA-B27 pozitif olarak bulunmuştur. Buna karşın B27 hastalık için genetik riskin üçte birinin daha azından sorumludur (97, 98).

Patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber hemen hemen tamamı immün aracılıklıdır. Hastalarda inflamatuvar cevabın oluşumunda interlökin-2 (IL-2), IL-6 ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) gibi sitokinler sorumludur. Bunlardan TNF- α esas olarak makrofajlar ve aktive T hücrelerden salınmaktadır. TNF- α , diğer

proinflamatuvar sitokinler ve adezyon moleküllerinin yapımı, immün hücrelerin aktivasyonu ve enzimlerin indüksiyonunu sağlamaktadır (99, 100).

Ankilozan spondilite özel tanımlanmış bir otoantikor bulunmamaktadır. Anti-nötrofil sitoplazmik antikorları (ANCA) ankilozan spondilitle ilişkilidir fakat hastalığın şiddeti ile korelasyon göstermemektedir (11).

4.13. İnflamatuvar Sitokinler

4.13.1. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)

Tümör nekroz faktörü (TNF) doğal bağışıklık, hücre regülasyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz ve aynı zamanda kanserli hücrelerin yıkımı gibi süreçlerde görev alan polipeptid yapıda bir sitokindir.

Alfa ve beta olmak üzere tümör nekroz faktörün iki tipi bulunmaktadır. TNF- α büyük oranda aktif makrofajlar ve monositlerden salgılanmaktadır. Bunun yanında aktif T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü hücreler, mast hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblastlar, bazofiller, tümör hücreleri gibi bir dizi hücre tarafından da sentezlenmektedir. TNF- β ise çoğunlukla T lenfositler tarafından salgılanır. Etkisi TNF- α ile aynıdır. Fakat TNF- α 'dan daha zayıf bir etki oluşturmaktadır. İki molekülün aminoasit benzerliği çok düşük (% 28) olmasına rağmen reseptörleri ve etki mekanizmaları aynıdır (100-103).

TNF- α hücre içi sinyal yollarını etkileyerek apoptozise ve nekrozise neden olmaktadır. Aynı zamanda enfeksiyon ve kansere direnmede önemli bir proteindir (104).

TNF- α inflamasyonda önemli bir aracı molekül olarak rol almaktadır. TNF- α konsantrasyona bağlı olarak inflamasyonda farklı olayların meydana gelmesini sağlamaktadır (101, 105, 106). Düşük konsantrasyondaki ($<10^{-9}$ M) TNF lokal inflamasyonu indükler. Orta düzeydeki konsantrasyonlarda TNF- α enfeksiyonlara karşı yangının sistemik etkilerini gösterir. Bunu prostaglandin E-2 sentezini artırarak ateşin yükselmesine neden olmak, akut faz proteinlerinin sentezini arttırmak, damar endotelinin prokoagulan ve antikoagulan aktiviteleri arasındaki dengeyi değiştirerek pıhtılaşma sistemini aktive etmek gibi fonksiyonları ile gerçekleştirmektedir.

Uzun süreli salınımında yağ ve kas hücrelerinde azalmaya bağlı kaşeksiye neden olur. Kaşeksi, TNF ile uyarılan iştah azalması sonucu oluşur.

Yüksek konsantrasyondaki ($\geq 10^{-7}$ M) TNF- α miyokardiyal kasılmayı ve damar çevresindeki düz kasların elastikiyetini inhibe ederek kan basıncının düşmesine ve şoka neden olmaktadır. Ayrıca endotelin normal antikoagülan etkisini kaybetmesini yol açarak damar içi tromboza neden olmaktadır. Endotel hücrelerinde bulunan ve pıhtılaşmayı engelleyen bir glikoprotein olan trombomodülinin salınmasına da engel olur. Bunların dışında TNF'nin aşırı salınımı ağır metabolik bozukluklara da neden olabilmektedir.

Aynı zamanda birçok hücre tipinde büyüme ve farklılaşmayı düzenler. Özellikle interferon- gamma ile kombinasyonu sitotoksiktir.

4.13.2. İnterlökin-6 (IL-6)

IL-6, 21-28 kDa molekül ağırlığında bir glikoproteindir. Monosit, fibroblast ve endotelial hücreleri gibi birçok hücrenin uyarılması sonucu sentezlenip salınmaktadır. IL-6 hücre savunmasında merkezi rol oynayan çok fonksiyonlu sitokindir IL-6 aktif B-hücreleri tarafından antikor salınmasını uyardığından başlangıçta B-hücre farklılaşma faktörü olarak tanımlanmaktaydı. Fakat daha sonra IL-6'nın sitotoksik T-hücreleri, megakaryositler ve diğer hemopoetik hücreler üzerinde proliferasyon ve farklılaşma sağlayıcı etkileri yanında, hepatik akut faz proteinlerinin ve plazma hücreleri tarafından immünglobulinlerin yapımının uyarımına neden olduğu bildirilmiştir (107).

IL-6 aşırı ekspresyonu multiple miyeloma, romatoid artrit, psöriyazis, menopoz sonrası oluşan osteoporoz gibi bazı hastalıkların patolojisiyle ilişkilidir. IL-6 hematopoiezis, immun cevap gibi hücre savunma mekanizmalarında ve akut faz reaksiyonlarında merkezi rol oynamaktadır (108).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Çalışma Grupları

5.1.1.1. Kullanılan Fareler

Çalışmamızda KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen Balb-c türü 6-7 haftalık 45'i dişi 45'i erkek toplam 100 adet fare kullanıldı. Bu fareler KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde deneysel çalışma için 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortam sağlanarak ve ad libidum olarak beslenerek barındırıldı. Yapılan deneylerin tümü Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2011/29 protokol no'lu etik kurulu (Bkz. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onay Belgesi) başvurusunun onayı ile yapıldı.

5.1.1.2. Bireyler

Çalışmaya, KTÜ Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniği'ne başvuran ve EULAR kriterlerine göre romatoid artritli 34 hasta, Amerika-Avrupa Konsensüs kriterlerine göre Sjögren's sendromlu 32 hasta ve ASAS kriterlerine ankilozan spondilit tanısı almış olan 33 hasta ve gönüllü olarak çalışmaya katılan, yaş ve cinsiyet yönünden hasta grubuyla eşleştirilmiş sağlıklı 37 kişi katıldı. Çalışmaya katılan kişiler, daha önce tıp fakültesi insan etik kurulunda onaylanan 2011/90'nolu raporuna (Bkz. Etik Kurul Onay Belgesi) uygun olarak çalışma hakkında bilgilendirildi ve aydınlatılmış onamları alındı (Bkz. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu).

Tablo 2. Bireylerin biyokimyasal parametreleri ve demografik özellikleri

	n	CRP (mg/dL)	ESH (mm/saat)	Hb (g/dL)	Yaş	Cinsiyet (E/K)
Normal Değer						
Aralığı		<0.3	0-20	12-17		
AS	33	0.82 ± 0.72	14.14 ± 13.52	14.042 ± 1.80	42.7 ± 12.6	22/11
RA	34	1.22 ± 1.19	19.31 ± 19.98	13.06 ± 2.45	62.9 ± 10.3	27/7
SjS	32	1.10 ± 1.78	34.24 ± 22.10	13.52 ± 2.15	58.3 ± 11.2	30/2
Kontrol	37	*	*	*	49.0 ± 8.5	24/13

*: Ölçülmemiştir.

5.1.2. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Marka, Model
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
Diyaliz Torbası	Serva 44145 Servapor Dialysis Tubing, Sigma Aldrich D9277 Dialysis Tubing Cellulose Membrane
Dondurucu	Arçelik, Altus (-20 °C), Thermo Electron Corporation (-80 °C)
Elektroforez Sistemi ve Görüntüleme	Biorad
Etüv	Gallenkamp
Hassas Terazı	Mettler Toledo, AB204-S
İnkübatör	Shel Lab Shaking Incubator, Heraeus
Karıştırıcı	Ika Vortex Genius 3
Kromatografi Kolonu	Sigma
Liyofilizatör	Telstar Cryodos
Manyetik Karıştırıcı	Ikamag RH
Mikropleyt Okuyucu	Versa Max Microplate Reader
Mikropleyt Yıkayıcı	Biotek, ELx50
Otomatik Pipet 0.5-10 µL	Eppendorf
Otomatik Pipet 100-1000 µL	Socorex
Otomatik Pipet 10-100 µL	Socorex
Otomatik Pipet 1-5 mL	Eppendorf
Otomatik Pipet 20-200 µL	Eppendorf
Peristaltik pompa	Pharmacia LKB-Pump P-1
pH –metre	Hanna Instruments HI 2211
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge, 5810
Sinyal kaydedici	Packard model 610
Sinyal kontrol sistemi	Pharmacia LKB-Control Unit UV-1
Soğutmalı santrifüj	Beckman Coulter Allegra 64R
Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1601

5.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar

Kullanılan Kimyasallar	Üretici Firma
1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP)	Sigma
2-merkaptoetanol	Merck
4-Hidroksinonenal (HNE)	Cayman
Akrilamid karışımı (%40'lık)	Biorad
Amonyum Persülfat (APS)	Merck
Amonyum sülfat	Merck
Asetik Asit (CH ₃ COOH)	Sigma
Bakır (II) Klorür (CuCl ₂)	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Bromfenol Mavisi	Sigma
Complete Freund Adjuvant	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Etanol	Sigma
Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA)	Merck
Fosforik Asit (H ₃ PO ₄)	Sigma
Fosfotungstik Asit	Merck
Gliserol	Sigma
Glisin	Sigma
Goat anti-HNE Poliklonal Antikoru	Millipore
Goat anti-rabbit HRP takılı IgG, Fc	Millipore
HEPES	Ambresco
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	Merck
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck
Incomplete Freund Adjuvant	Sigma
İzopropanol	Sigma
Kloroform	Merck
Ksantin	Sigma

(Devamı)

Ksantin Oksidaz	Sigma
L-Tirozin	Merck
Mangan (IV)Oksit (MnO_2)	Merck
Metanol	Sigma
N,N,N,N-Tetra Metil Etilen Diamin (TEMED)	Bio-Rad
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Serva
Orto-fenilen diamin	Sigma
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	Merck
Potasyum Ferrisiyanür ($K_3Fe(CN)_6$)	Merck
Potasyum Klorür (KCl)	Merck
Potasyum Siyanür	Merck
Rabbit anti-3 nitrotirozin Poliklonal Antikoru	Millipore
Rabbit anti-goat HRP takılı IgG, Fc	Millipore
Rabbit anti-human HRP takılı IgG, Fc	Millipore
Rabbit anti-MDA Poliklonal Antikoru	Millipore
Sepharose -4B	Sigma
Sitrik Asit	Merck
Siyanojen Bromür ($CNBr$)	Sigma
Sodyum Asetat ($NaCH_3COO$)	Merck
Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH_2PO_4)	Merck
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Merck
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Sigma
Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Sodyum meta-arsenit	Merck
Sodyum nitrit ($NaNO_2$)	Merck
Sodyum Perklorat ($NaClO_4$)	Merck
Sodyum Sülfat (Na_2SO_4)	Merck
Sülfanilamid	Sigma
Sülfürik Asit (H_2SO_4)	Merck

(Devamı)

Süperoksit Dismutaz (SOD) Standartı	Sigma
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma
Trikloro Asetik Asit (TCA)	Sigma
Tris(hidroksimetil)-aminometan	Ambresco
Tween-20	Merck
Yağsız Süt Tozu	Pınar

5.1.4. Kullanılan Ticari Kitler

Tablo 5. Kullanılan kitler ve üretici firmalar

Kullanılan Ticari Kitler	Üretici Firmalar	Ürün Kodu
IL-6 ELISA Kiti (Human)	eBioscience	BMS213/2
TNF- α ELISA Kiti (Human)	Dia Source	KAP1751
4-Hidroksinonenal ELISA Kiti (Human)	Sun Red	201-12-1979
3-Nitrotirozin ELISA Kiti (Human)	Bioassay Technology Laboratory	E1425Hu
Glutasyon Peroksidaz Assay Kiti	Cayman Chemical Company	703102

5.2. Yöntem

5.2.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Eritrositlerinden İzolasyonu

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin eritrositlerden izole edilmeleri için Sepharose-4B'ye kenetlenmiş sülfanilamidin kullanıldığı afinite kromatografisi uygulandı. Enzimlerin kolondan elusyonunu takiben eluatlar diyaliz edilerek istenmeyen bileşenler uzaklaştırıldıktan sonra enzim çözeltileri dondurup kurutma (liyoofilizasyon) yöntemi ile deriştirildi (109).

5.2.1.1. Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jelinin hazırlanmasında Sepharose-4B'nin serbest hidroksil gruplarının siyanojen bromür (CNBr) ile aktifleştirilmesini takiben tirozinin kovalent olarak takılması ve ona da sülfanilamidin kenetlenmesi yolunun izlendiği metot kullanıldı (109).

Sülfanilamid karbonik anhidraz inhibitörüdür, enzimi kolonda tutmak için kullanıldı. Bu jel insan eritrositlerinden CA I ve II izoenzimlerinin saflaştırılmasında kullanıldı.

Sepharose-4B'nin Aktifleştirilmesi

Kullanılan Çözeltiler

4 M NaOH: 8g NaOH saf suda çözülüp hacmi 50 mL'ye tamamlandı.

0.1 M NaHCO₃ (pH 10): 2.1 g NaHCO₃ 200mL saf suda çözülüp pH 10'a ayarlanıp hacmi 250 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Aktifleştirilmiş Sepharose-4B jeli hazırlamak için 20 mL jel buz banyosunda soğuk saf su ile birkaç defa yıkandı, sulu kısım uzaklaştırıldı. Son olarak jel eşit hacimde saf su ile birleştirildi. Bu süspansiyon manyetik karıştırıcı ile yavaş yavaş karıştırılırken üzerine 4 g toz CNBr eklendi. Bu işlemler CNBr'ün toksik olması nedeniyle çeker ocakta kapalı ortamda yapıldı. Buz banyosunda karıştırmaya devam ederken 4 M NaOH çözeltisiyle pH 11'e getirildi. Bu işlem sırasında ortamın sıcaklığını düşük tutmak için ara ara saf sudan hazırlanmış buz parçaları ilave edildi. pH 11'e sabitlenmesi yaklaşık 15 dakika aldı, ortama bol miktarda buz ilave edip karışım Buchner hunisinden süzüldü. Bunun ardından 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO₃ (pH 10) çözeltisi ile yıkama yapıldı ve jel bir behere alındı.

Tirozin Takılması

Kullanılan Çözeltiler

2 mg/mL L-Tirozin: 80 mg L-tirozin 40 mL 0.1 M NaHCO₃ (pH 10) içerisinde çözüldü.

0.2 M NaHCO₃ (pH 8.8): 1.68 g NaHCO₃ 80 mL saf suda çözülüp pH 8.8'e ayarlanıp 100 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

0.1 M NaHCO₃ ile yıkanıp behere aktarılan jel üzerine 2 mg/mL'lik 40 mL L-tirozin çözeltisi ilave edildi. pH'nın 11'e ayarlanması jelin tamponla yıkanması ve tirozin çözeltisiyle karıştırılması işlemleri çok çabuk (90 saniyeyi geçmemeli) yapılmaya çalışıldı. CNBr'nin jelin hidroksil gruplarına takılması ile oluşturduğu -OCN yapısının

kararlılığı oldukça düşüktür, sürenin uzaması halinde aktifleşmiş gruplar tekrar –OH gruplarına dönüşebilir ve tirozin takılması bu durumda gerçekleşmez.

Tirozin bağlanmasının tamamlanması için süspansiyon 4° C’de 2 saat buz banyosunda yavaşça karıştırılıp ardından 4° C’de 16 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda jel yıkama suyu 280 nm’de absorbans vermeyinceye kadar bol saf su ile yıkandı. Bu şekilde reaksiyona girmemiş tirozin ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra jel bir de 100 mL 0.2 M NaHCO₃ (pH 8.8) ile yıkandı. Son olarak tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL’si içerisine alındı.

Sülfanilamid Kenetlenmesi

Kullanılan Çözeltiler

1 M HCl: 8.3 mL % 37’lik HCl (d: 1.19 g/mL) 80 mL saf suda çözülüp hacmi 100 mL’ye tamamlandı.

1 M NaOH: 10 g NaOH 200 mL saf suda çözülüp hacmi 250 mL’ye tamamlandı.

2.5 mg/mL Sülfanilamid: 25 mg sülfanilamid 10 mL 1M HCl içerisinde çözüldü

15 mg/mL NaNO₂: 75 mg NaNO₂ içeren 5mL saf suda çözüldü.

1 M H₂SO₄: 5.43 mL % 98’lik H₂SO₄ (d:1.84g/mL) 80mL saf suda çözülüp hacmi 100 mL’ye tamamlandı.

0.05 M Tris-SO₄ (pH 7.4): 6.05 g tris(hidroksimetil)-aminometan 900 mL saf suda çözülüp 1 M H₂SO₄ ile pH 7.4’e ayarlanıp hacmi 1 L’ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Buz banyosunda 10 mL sülfanilamid çözeltisine 5 mL NaNO₂ çözeltisi damla damla eklendi. 10 dakika içerisinde amonyağa benzer keskin kokudan diazolandiğı anlaşılan sülfanilamid çözeltisi, içerisinde Sepharose-4B-L-tirozin bulunan 40 mL süspansiyon üzerine ilave edildi. 1M NaOH çözeltisi kullanılarak süspansiyonun pH’ı 9.5’e getirildi. pH 8 civarındayken renk kırmızıya dönmeye başladı. Kırmızımsı renkteki jel pH 9.5’te oda sıcaklığında 3 saat yavaşça karıştırıldı.

Süspansiyon Buchner hunisinden süzüldü, önce 1L saf su sonra 200 mL 0.05 M Tris-SO₄ (pH 7.4) tamponu ile yıkandı. Bu işlemler sırasında jelin tamamen

kurutulmamasına dikkat edildi. Yıkamaların ardından jel aynı tamponun içerisinde alınıp kolona yüklenene kadar 4 °C’de saklandı.

5.2.1.2. Hemolizatın Hazırlanması

Kullanılan Çözeltiler

İzotonik Tuz Çözeltisi (% 0.9 NaCl): 9 g NaOH 900 mL saf suda çözülüp hacmi 1L’ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı:

Enzim saflaştırmasında kullanılacak olan kanlar kan bankasından temin edildi. Kan numuneleri 10 mL’lik EDTA’lı tüplere alınıp 3000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi, üst kısımdaki plazma ve lökosit tabakaları uzaklaştırıldı. Eritrosit izotonik tuz çözeltisiyle üç defa yıkandı. Bu şekilde eritrosit paketleri hazırlandı. İzotonik tuz çözeltisiyle yıkanmış eritrositler paketleri üzerine hacimlerinin 1.5 katı soğuk saf su eklenerek hemoliz edildi. Hemolizli kanlar birleştirip 4 °C’de yarım saat süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak eritrositlerin tamamen hemoliz olması sağlandı.

Elde edilen hemolizattan hücre zarlarını uzaklaştırmak için numuneler 4°C’de 20000 rpm’de 40 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısımlar bir beherde toplandı, hücre membranlarından oluşan alt kısımdan almamaya özen gösterildi. Manyetik karıştırıcı ile karıştırırken hemolizatın pH’ı katı Tris kullanılarak 8.7’ye ayarlandı. En geç iki gün içinde kolona uygulandı. Uygulanana kadar 4 °C’de saklandı.

5.2.1.3. Kolonun Hazırlanması ve Hemolizatın Kolona Uygulanması

Kullanılan Çözeltiler

Dengeleme Tamponu (25 mM Tris - 0.1 M Na₂SO₄ pH 8.7): 3.03 g Tris(hidroksimetil)-aminometan ve 14.2 g Na₂SO₄ 900 ml saf suda çözülüp, pH 1M HCl ile 8.7’ye ayarlandı ve hacim 1L’ye tamamlandı.

Yıkama Tamponu (25 mM Tris - 22 mM Na₂SO₄ pH 8.7): 3.03 g Tris(hidroksimetil)-aminometan ve 3.12 g Na₂SO₄ 900 ml saf suda çözülüp, pH 1M HCl ile 8.7’ye ayarlandı ve hacim 1L’ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Hazırlanan afinite jelinin üst kısmındaki sıvı uzaklaştırıldı, dengeleme tamponu ilave edildi. Alt ucundan sinterleşmiş camdan oluşan süzme sistemi bulunan kolona dengeleme tamponu dolduruldu ve peristaltik pompa kullanılarak boruların tamponla doldurulması sağlandı. Kolonun üst kısmı kapatıldı, sıvı seviyesi kolonun üst kısmının az aşağısında olacak ve cam kısımdan görülecek şekilde ayarlandı. Daha sonra sıvı akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde peristaltik pompanın dönüş hızı ayarlandı ve borunun ucu jel süspansiyonuna daldırılıp jelin kolona yavaşça yüklenmesi sağlandı. Jelin kolona paketlenmesi işlemleri sırasında jelde kabarcık veya çatlak oluşmamasına özen gösterildi. Jelin kolona paketlenmesinin ardından jel dengeleme tamponu ile akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde sabit tutulup 24 saat dengelenmeye bırakıldı. Bu hız enzimlerin elusyonunda da aynen uygulandı.

Hemolizat, uygulamaya hazır hale getirilen sisteme, borunun ucu dengeleme tamponundan çıkartılıp hemolizat içerisine daldırılarak yüklendi. Hemolizat yüklemesi tamamlanması ile CA I ve II izoenzimleri kolona tutturulmuş oldu. Bu işlemin ardından yıkama tamponu (25 mM Tris-22 mM Na₂SO₄ pH 8.7) sistemden geçirilerek hemolizattan gelen istenmeyen bileşikler uzaklaştırıldı. Yıkama işlemine hemoglobinin kırmızı rengi kayboluncaya ve eluatın 280 nm'deki absorbansının 0.02'nin altına düşünceye kadar devam edildi.

5.2.1.4. Karbonik Anhidraz I Elüsyonu

Kullanılan Çözeltiler

CA I Elüsyon Tamponu (50 mM Na₂HPO₄ - 1 M NaCl pH 6.3): 3.55 g Na₂HPO₄ ve 29.25 g NaCl 450 mL saf suda çözüldü, çözeltinin pH'sı 1 M HCl ile 6.3'e ayarlandı ve hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Afinite kolonuna tutturulan CA I izoenziminin elusyonu için CA I elüsyon tamponu kullanıldı. Akış hızının 20 mL/saat olduğu sistemde eluatlar fraksiyon toplayıcı ile 5'er mL'lik kısımlar halinde tüplere toplandı. Toplanan eluatlar kullanılabilecek kadar 4 °C'de saklandı. Eluatların 280 nm'deki absorbansları kullanılarak CA I izoenziminin kolondan tamamen ayrılışı takip edildi.

5.2.1.5. Karbonik Anhidraz II Elüsyonu

Kullanılan Çözeltiler

CA II Elüsyon Tamponu (0.1 M CH₃COONa - 0.5 M NaClO₄ pH 5.6): 9.19 g NaClO₄ ve 2.04g CH₃COOH.3H₂O 125 mL saf suda çözüldü, çözeltinin pH 5.6'ya ayarlandı ve hacmi 150 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Hazırlanışı

Karbonik anhidraz I izoenziminin kolondan elusyonunun tamamlanmasının (280 nm'deki absorbansın 0.02'nin altına düşmesinin) ardından karbonik anhidraz II elusyon tamponu kolona 20 mL/saat'lik akış ile uygulandı. Eluatlar 5'er mL'lik fraksiyonlar halinde tüplere toplandı ve bu işleme 280 nm'deki absorbans 0.02'nin altına düşene kadar devam edildi. Eluatlar işlemlere kadar 4 °C'de saklandı.

Elusyon işleminin ardından kolona tekrar dengeleme tamponu uygulandı. Afinite jeli bir sonraki kullanıma kadar dengeleme tamponu içerisinde 4 °C'de saklandı.

5.2.2. Protein Tayini

Eluatlardaki 280 nm'de absorbans takibi protein varlığını ölçmek için kullanıldı. İkinci olarak modifiye Bradford metodu (Coomassie Brilliant Blue yöntemi) uygulanarak eluatlardaki enzim miktarının ve aktivitesinin hesaplanmasında kullanmak üzere protein miktarları belirlendi (110).

Bu yöntem fosforik asitli ortamda Coomassie Brilliant Blue G250'nin proteinlere bağlanması ve oluşan mavi renkli kompleksin 600 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler

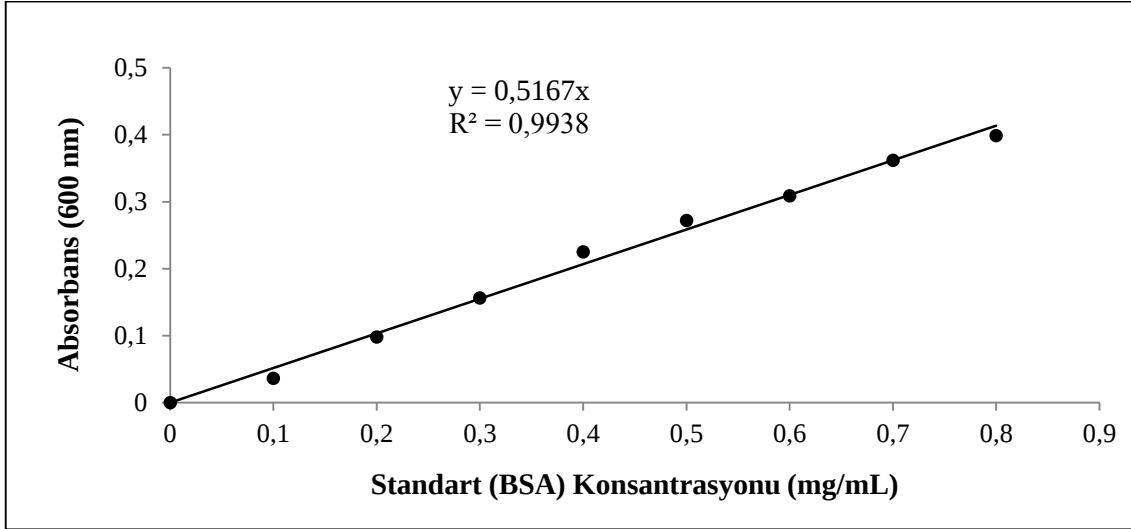
Bradford Reaktifi: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 5 mL % 95'lik etanolde çözüldü, üzerine 10 mL % 85'lik H₃PO₄ eklendi. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Standart Çözeltileri: Standartlar BSA'dan 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 mg/mL'lik konsantrasyonlarda hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Eluatlardaki protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 100 µL Bradford Reaktifi ve 10 µL numune alındı. Bu miktarlar pleyte yüklendikten sonra pipetaj yapılarak

karıştırıldı. Mikropleyt okuyucu ile 600 nm’de absorbanlar okundu. Şekil 3’teki standart grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar hesaplandı. Sonuçlar mg/mL cinsinden ifade edildi.



Şekil 3. Protein tayininde kullanılan standart grafiği

5.2.3. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Tayini

Tüplerde toplanan elüatlarda CA hidrataz aktivitesi modifiye Wilbur-Anderson metoduna göre yapıldı (111). Metodun prensibi ortamda substrat olarak bulunan karbondioksitin hidrasyonu sonucu ortaya çıkan H^+ 'nın ortamın pH'sını 8.2'den 7.0'a düşürmesi için geçen sürenin ölçülmesine dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler

2.5 mM HEPES Çözeltisi: 6.51g HEPES 800 mL saf suda çözülüp pH 8.8'e ayarlanır. Ve hacim 1L'ye tamamlanır.

Doygun CO_2 Çözeltisi: 250 mL saf sudan 40-45 dakika boyunca CO_2 gazı geçirilerek hazırlanır.

Deneyin Yapılışı

CA hidrataz aktivitesi 0°C de pH düşüşünün takibiyle potansiyometrik metotla ölçüldü. Reaksiyon karışımı 100 μ L eluat alınıp üzerine 2.4 mL HEPES (2.5 mM pH:8.8) ve 2.5 mL % 100 CO_2 gazı ile doyurulmuş saf su ilave edilerek elde edildi. Reaksiyon

doğru CO₂ çözeltisi ilavesiyle başlatıldı. Reaksiyonun soğuk ortamda gerçekleşmesi için reaksiyon tüpü buz banyosu içerisinde tutuldu. pH-metrenin elektrodunun çevresi parafilmle iyice sarılıp reaksiyon tüpünün içine gaz kaçağı olmayacak şekilde yerleştirildi. pH'nın 8.2'den 7.0'a düşüşü kronometre ile takip edildi. Tüm ölçümler en az iki kez tekrarlandı ve geçen sürelerin ortalaması kullanıldı. CO₂ hidrataz aktivitesi enzim ünitesi olarak hesaplandı.

$$EU = \frac{t_0 - t_n}{t_n}$$

EU: enzim ünitesi

t₀ :enzimsiz denemede ölçülen süre

t_n: numune varlığında ölçülen süre

5.2.4. Diyaliz

Afinite kromatografisi ile elde edilen eluatlardaki tampon bileşenlerinin ve modifikasyonlar sonunda enzime bağlanmadan kalan serbest aldehit ve peroksinitritin ortamdan uzaklaştırılması amacı ile kullanıldı.

Kullanılan Çözeltiler

Aktifleştirme Tamponu (100 mM NaHCO₃ / 10mM EDTA pH 7.4): 8.4 g NaHCO₃ ve 3.72 g EDTA 900 mL saf suda çözöldü, pH 7.4'e ayarlandı ve hacmi 1L'ye tamamlandı.

10 mM PBS: 1.08 g Na₂HPO₄.2H₂O, 0.62 g NaHPO₄.2H₂O, 8.02 g NaCl ve 0.18 g KCl 900mL saf suda çözöldü, pH 7.4'e ayarlanıp hacim 1 L'ye tamamlandı.

10 mM EDTA / 10 mM PBS: 3.72 g EDTA 10 mM PBS içersinde çözölüp hacmi 1L'ye tamamlandı.

% 0.1 Kloroform:1mL kloroform 1L saf suda çözöldü.

5.2.4.1. Diyaliz Torbasının Aktifleştirilmesi

İstenilen boyutta kesilen diyaliz torbaları 1L'lik bir beher içine alındı üzerine aktifleştirme tamponu ilave edilip 60 °C'de 2 saat boyunca yavaşça karıştırıldı. Tampon uzaklaştırılıp işlem tekrarlandı. Ardından diyaliz torbaları saf sudan geçirilip yine 60 °C'de 1 saat karıştırıldı, sıvı kısım uzaklaştırılıp çözelti berraklaşınca kadar bu işlem

tekrarlandı. 4 °C'e kadar yavaşça soğutulduktan sonra kullanılabilece kadar % 0.1'lik kloroformda saklandı.

5.2.4.2. Diyaliz İşlemi

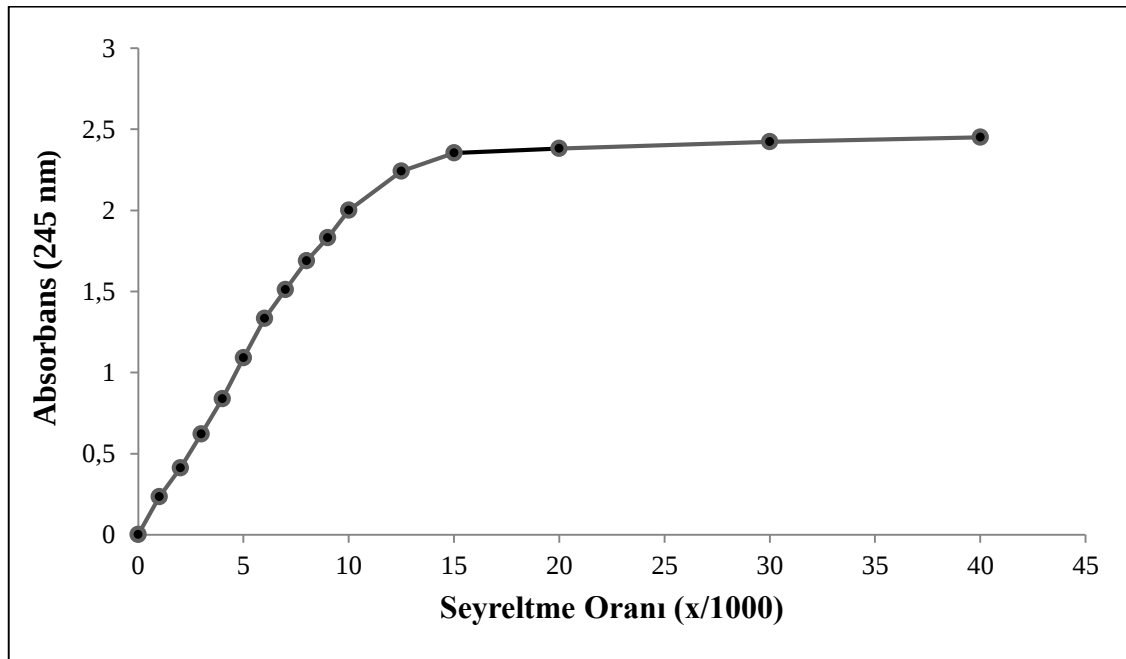
Diyaliz işlemi 4 °C'de her 4 saatte bir tamponu tazeleyerek önce 10 mM EDTA-10 mM PBS içerisinde 8 saat süreyle ardından 10 mM PBS içerisinde 8 saat süreyle ve en son saf su içinde 8 saat süreyle gerçekleştirildi. Diyaliz işlemi biten numuneler liyofilize edildi. -80 °C de işlem yapılabilece kadar saklandı.

5.2.5. CA İzoenzimlerinin MDA, HNE ve PN ile Modifikasyonu

5.2.5.1. Karbonik Anhidrazın MDA ile Modifikasyonu

Kullanılan Çözeltiler

MDA Çözeltisi: 37 °C de 1M HCl içinde TMP (malondialdehit bis(dimetilasetal)) 30 dakika hidroliz edildi. 1 M NaOH ile pH'ı 7.4'e ayarlandı (112). 245 nm'deki molar absorptivite katsayısını $\epsilon=31500 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ kullanarak hazırlanan MDA'nın konsantrasyonu her çalışma öncesinde belirlendi. Bu amaçla çeşitli oranlarda seyreltmeler yapılarak ölçümler tekrarlandı bu veriler grafiğe geçirilerek sentezlenen MDA'nın konsantrasyonu hesaplandı (Şekil 4). Taze hazırlamaya özen gösterildi.



Şekil 4. MDA'nın seyreltme oranına bağlı absorbans grafiği

50 mM Sodyum Fosfat Tamponu (pH: 7.4): 3.44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 4.79 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 900mL saf suda çözülüp pH 7.4'e ayarlandı ve hacmi 1L'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

1 mg/mL CA enzimi pH 7.5 olan 50 mM'lık 1 mL sodyum fosfat tamponunda 5-0.05 mM arası MDA konsantrasyonlarında modifikasyonların gerçekleşmesini sağlamak için 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı (113, 114). Modifikasyonun ardından pH 7.5 olan 50 mM'lık sodyum fosfat tamponuna karşı 24 saat 4 °C'de diyaliz edildi (Elde edilen modifiye enzim -80 °C'de bir aya kadar saklanabilmektedir).

Enzim üzerinde MDA modifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için western blot yapıldı. Bu amaçla primer antikor olarak rabbit anti-MDA poliklonal antikoruna bloklama tamponuyla üretici firmanın tavsiye ettiği gibi 1000 kat seyreltilerek kullanıldı. Sekonder antikor olarak goat anti-rabbit HRP takılı IgG 10000 kat seyreltilerek kullanıldı.

5.2.5.2. Karbonik Anhidrazın HNE ile Modifikasyonu

Kullanılan Çözeltiler

HNE Çözeltisi: Konsantrasyonu 64 mM olan HNE Cayman firmasından temin edildi.

1 mg/mL'lik karbonik anhidraz enzimi pH'sı 7.4 olan 50 mM'lık sodyum fosfat tamponunun 1 mL'sinde 5-0.5 mM HNE konsantrasyonlarında 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Ardından aynı tampona karşı 24 saat 4 °C'de 6 saat ara ile tamponu değiştirilerek diyaliz edildi (114).

Modifikasyonun kontrolü için western blot işlemi yapıldı. Primer antikor olarak goat anti-HNE poliklonal antikoruna 1000 kat seyreltilerek kullanıldı. Sekonder antikor olarak rabbit anti-goat HRP takılı IgG antikoruna 10000 kat seyreltilerek kullanıldı.

5.2.5.3. Karbonik Anhidrazın PN ile Modifikasyonu

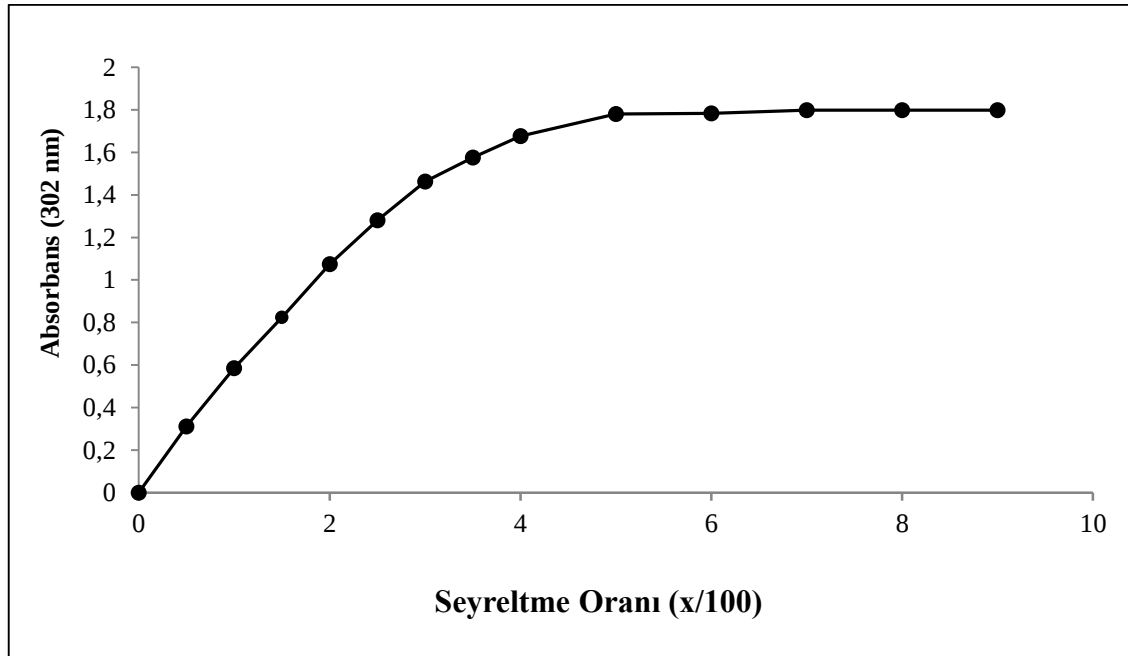
Kullanılan Çözeltiler

PN Çözeltisi: Peroksinitrit, asidik hidrojen peroksidin nitrit anyonuyla reaksiyonu sonucu elde edildi. 0.7 M HCl ile asitlendirilmiş ortamda soğukta 0.6 M NaNO_2 ve 0.6 M H_2O_2 hızlı bir şekilde karıştırılarak reaksiyona sokuldu. Ortam 1.2 M NaOH çözeltisi

ile hızlı bir şekilde bazikleştirilerek oluşan kararsız yapıdaki peroksinitröz asitin (ONOOH) peroksinitrit anyonuna dönüştürülmesi sağlandı.

Bazikleştirmeyeyle kararlı yapıdaki peroksinitritin elde edilmesinin ardından ortamda kalan H_2O_2 fazlası mangan(IV) oksit (MnO_2) muamesiyle ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Elde edilen peroksinitrit $-80\text{ }^{\circ}C$ 'de saklandı (115).

Peroksinitritin 302 nm dalga boyundaki molar absorptivite katsayısı ϵ : $1690\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak konsantrasyonu hesaplandı. Bu amaçla çeşitli oranlarda seyreltmeler yapılarak ölçümler tekrarlandı bu veriler grafiğe geçirilerek PN konsantrasyonu hesaplandı (Şekil 5). Bu amaçla yapılan seyreltmelerde 1 M NaOH kullanıldı.



Şekil 5. Peroksinitritin seyreltme oranına bağlı absorbans grafiği

Deneyin yapılışı

Peroksinitrit konsantrasyonu hesaplandıktan sonra 1 mg/mL karbonik anhidraz enzimi içeren 50 mM'lık pH 7.5 olan sodyum fosfat tamponunda peroksinitritin 0.1-3 mM farklı konsantrasyonlarıyla $37\text{ }^{\circ}C$ 'de yarım saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 50 mM'lık sodyum fosfat tamponuna karşı 24 saat boyunca $4\text{ }^{\circ}C$ 'de 6 saat ara ile tampon değiştirilerek diyaliz edildi (114, 116).

Modifikasyonun kontrolü için western blot yöntemiyle gerçekleştirildi. Primer antikor olarak rabbit anti-nitrotirozin poliklonal antikorları 1000 kat seyreltilerek kullanıldı. Sekonder antikor olarak HRP takılı goat anti-rabbit IgG, antikoru 10000 kat seyreltilerek kullanıldı.

5.2.6. SDS-PAGE ve Western Blot

Eritrositlerden afinite kromatografisi ile elde edilen karbonik anhidraz enzimlerinin saflığının kontrolü için SDS-PAGE modifiye Laemmli metoduna göre yapıldı (117). Ayrıca yapılan modifikasyon işlemlerini doğrulamak için modifiye edilen ve edilmemiş olan maddelere Western blot uygulandı.

Kullanılan Çözeltiler

Ayırma Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 8.8): 44.2 g Tris HCl 180 mL deiyonize suda çözüldü, pH 8.8'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Yükleme Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 6.8): 22.1 g Tris HCl 90 mL deiyonize suda çözüldü, pH 6.8'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

% 10 (w/v) Sodyum Dodesil Sulfat (SDS): 2 g SDS 20 mL deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

SDS-PAGE Tank Tamponu (10 X): 30.3 g Tris HCl, 144 g glisin ve 10 g SDS (% 0.1 w/v) 1 L deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı. Çalışma çözeltisi deiyonize su ile 1X olacak şekilde sulandırıldı.

% 10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS): 100 mg APS 1 mL deiyonize suda çözüldü ve 4 °C'de saklandı.

SDS PAGE Numune Yüklemeye Tamponu (5X): 0.67 mL yüklemeye tamponu, 5 mL gliserol, 0.5 g SDS, 5 mg bromfenol mavisi, 0.5 mL 2-merkaptetanol, 3.8 mL deiyonize su içerisinde çözüldü ve aligotlanarak -20 °C'de saklandı.

Sabitleme Çözeltisi: % 50 izopropanol, % 10 TCA ve % 40 saf su içerecek şekilde hazırlandı (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılır).

Renklendirme Çözeltisi: 0.66 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 120 mL metanol, 24 mL asetik asit ve 120 mL saf su ilavesi ile hazırlandı.

Renksizleştirme Çözeltisi: % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 saf su içerecek şekilde hazırlandı.

5.2.6.1. SDS- PAGE Jellerinin Hazırlanması

Çalışmalarda Karbonik Anhidraz enziminin molekül ağırlığına en uygun jel olan % 5'lik ayırma jeli ve % 12'lik yükleme jeli kullanıldı.

Tablo 6. % 5-12'lik (1x1mm) SDS poliakrilamid jelinin hazırlanışı

Kimyasallar	% 5 lik Ayırma Jeli (mL)	% 12'lik Yükleme Jeli (mL)
ddH ₂ O	3.08	2.17
% 40 akrilamid karışımı	0.56	1.50
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	-	1.25
1.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25	-
% 10 SDS	0.05	0.05
% 10 APS	0.05	0.05
TEMED	0.005	0.005

Camlar kontaminasyonları veya jel kalıntılarını engellemek için önce saf su ile ardından % 70'lik etil alkol ile temizlendi. Temizlenen camlar peçete ile kurulandı. Uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel hazırlama standına yerleştirildi. Bu sırada jelin alt kısımdan sızmasına dikkat edildi.

Öncelikle ayırma jeli yüklenmektedir. Gereksinim duyulan ayırma jeli yüzdesine göre jellerin hazırlanması için gerekli olan kimyasallar kabin içerisine yerleştirildi.

Kimyasallar yukarıda Tablo 6'da verilen sıraya ve miktarlara göre 50 mL beherde karıştırıldı istenilen yüzdeye göre hazırlandı. SDS ve APS ekledikten sonra karışımın homojen hale gelmesi için dairesel biçimde bir hareket yapılarak karıştırıldı. Polimerleşmeyi sağlayacak olan TEMED eklenmeden önce jeli dökmek için kullanılacak pipet 1 mL'e ayarlandı. TEMED eklendikten sonra birkaç kez pipetaj yapılarak

TEMED'in homojen bir biçimde yayılması sağlandı. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı. Hazırlanan karışım camlar arasına hava kabarcığı bırakmadan aktarıldı. Jel kısa camın üst kısmından 1 cm aşağısına kadar eklendi. Bu kısma soğuk izopropanal eklenerek üst kısmın düz bir şekilde polimerleşmesi sağlandı. Falkonda arta kalan jel baz alınarak polimerizasyonun tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edildi (Polimerleşme yaklaşık 30-60 dk).

Ayırma jeli polimerleştikten sonra, jelin üzerindeki izopropanol (bütanol su karışımı da olabilir) dökülerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan az miktardaki izopropanol kağıt mendile emdirilerek jelin üzerinden alındı.

Ayırma jeline benzer şekilde Tablo 6'da verilen sıraya ve miktarlara göre hazırlanan yükleme jeli hızlı biçimde camlar arasında kalan 1 cm'lik boşluğa aktarıldı. Alkolle dezenfekte edilen tarak dikkatlice camlar arasına yerleştirildi. Polimerizasyon için beklendi (Polimerleşme yaklaşık 30-60 dk). Bu şekilde hazırlanan jel hemen kullanılacağı gibi ıslak bir peçeteye ardından streç filme sarılıp kurumasına izin verilmezse bir haftaya kadar 4 °C'de saklanabilir.

5.2.6.2. SDS-PAGE

Polimerizasyonun tamamlanmasından ardından camlar tanktaki haznesine dikkatlice yerleştirildi. Tank tamponu tank üzerinde belirtilen noktalara kadar dolduruldu. Tarak tanka tampon doldurulduktan sonra kuyucuklara zarar vermeden çıkartıldı. Kuyucuklara tamponla birkaç kez pipetaj yapıldı. Bu şekilde jel, örneklerin yüklenmesi için hazır hale getirildi.

Yürütülecek proteinlerin (örneklerin) üzerine uygun miktarda yükleme tamponu eklendi [1:4 (yükleme tamponu (5x): numune)]. Örnek-Yükleme tamponu karışımı 95 °C'de 5 dakika kaynatıldı (denatürasyon için). Kuyucuklara maximum 10 µg örnek (ortalama 2-5 µg) ve aynı şekilde markır yüklendi. Tanka bir buz aküsü atılarak aşırı ısınma engellendi. Örnekler 80 Voltta 10 dakika ardından 110 Voltta yaklaşık 1-1.5 (60-90 dk) saat yürütüldü. Yürüme, markırın yürüme hızı kontrol edilerek ayarlandı.

Yürütme işlemi biten jel tanktan çıkarıldı. Saf suyla yıkandı. İki cam arasına spatula sokularak camlar birbirinden dikkatlice ayrıldı. Jelin artık kısımları (yükleme jeli, jelin kenar kısımları gibi) spatula ile kesilip atıldı. Jel sabitleştirme çözeltisine alındı bu çözeltide 30-40 dakika çalkalanarak proteinlerin jele sabitlenmesi sağlandı. Ardından jel

başka bir kaba alınıp üzerini örtecek kadar renklendirme çözeltisi ilave edilip 1-2 saat çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkartılıp renksizleştirme çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla çözelti değiştirilip jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içerisinde çalkalandı. Son olarak jel saf su içine alınıp görüntülendi.

5.2.6.3. Western Blot

Kullanılan Çözeltiler:

Transfer Tamponu: 3 g Tris ve 14.4 g glisin 700 mL deiyonize su içerisinde çözüldü 200 mL metanol eklendi ve hacmi 1L'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

TBS (10X): 31.52 g Tris HCl ve 80 g NaCl çözülerek toplam hacim deiyonize su ile 900 ml'ye tamamlandı pH 7.6'ya ayarlanarak son hacim 1L'ye tamamlandı.

TBST: 100 mL 10X TBS ve 1 mL Tween-20 1 L deiyonize suda dilue edildi.

Bloklama Çözeltisi (%5 BSA-TBST / Süt Tozu-TBST): 5 g BSA veya süt tozu 100 mL 1X TBST içerisinde çözülerek 4 °C'de saklanır. Gerekli durumda BSA ve süt tozu birlikte kullanılabilir.

Primer Antikor: Bloklama tamponu ile primer antikor için üretici firmanın tavsiye ettiği oranda seyreltilerek hazırlandı.

Sekonder Antikor: Bloklama tamponu ile sekonder antikor için tavsiye edilen oranlarda seyreltilerek hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

Yukarıda anlatıldığı gibi SDS-PAGE işlemi aynı şekilde gerçekleştirildi. Yürütülecek proteinlerin miktarları primer antikorun ölçebileceği ve üretici firma tarafından tavsiye edilen konsantrasyon değerleri kontrol edilerek belirlendi. Örneklerin üzerine uygun miktarda yükleme tamponu eklenerek yürütüldü. Fakat sabitleştirme çözeltisine alınmadan membrana transfer edilir.

Kaset açılıp kasetin siyah kısmından başlayarak üzerine transfer tamponu ile ıslatılan siyah sünger yerleştirildi. İki cam arasına spatula sokularak camlar birbirinden dikkatlice ayrıldı. Jelin artık kısımları (yükleme jeli, jelin kenar kısımları gibi) spatula ile kesilip atıldı. Jelin sağ alt tarafında işaretlemek amacıyla hafifçe kesildi. Transfer

tamponu ile ıslatılan 2 ince whatman kâğıdı siyah sünger üzerine yerleştirildi. Jel uygun biçimde yerleştirildi whatman kâğıtlarının üzerine yerleştirildi. Saf metanol ile aktive edilen PVDF membran (5-10 sn) jelin üzerine yerleştirildi (membran ile jel arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi). Son olarak transfer tamponu ile ıslatılmış 2 ince Whatman kâğıdı membran üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilerek sandviç oluşturuldu. Sandviç oluşturulduktan sonra tüm hava boşluklarının giderilmesi için yuvarlak bir silindir ile hafif basınç uygulanarak sandviç üzerinde yuvarlandı. Siyah sünger en üste konularak kaset kapatıldı. Kutuplara dikkat edilerek bu kaset tanka yerleştirildi. Tank transfer tamponu ile doldurulup içine ısınmayı engellemek için bir buz aküsü konuldu. Transfer işleminin gerçekleşmesi için 100 Voltta 1 saat yürütüldü.

5.2.6.4. Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmünokimya ile Görüntülenmesi

Blotlama işlemi bittikten sonra membran, bloklama için hazırlanan 10 mL bloklama çözeltisi 50 mL'lik falkon içerisine yerleştirildi, oda sıcaklığında 1 saat roller mikserde inkübasyona bırakıldı. Bloklanan membran, taze olarak üretici firmanın önerdiği gibi bloklama çözeltisinde 1000 kat seyreltilerek hazırlanan primer antikor çözeltisi (MDA ile modifiye edilmiş enzim için rabbit anti-MDA poliklonal antikor çözeltisi) içerisinde roller mikserde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Primer antikorla inkübasyonun ardından membran 3 defa 10'ar dakika TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Daha sonra membran primer antikora uygun bloklama tamponuyla üretici firmanın önerdiği gibi bloklama tamponuyla 10000 kat seyreltilerek hazırlanan sekonder antikor çözeltisi ile (Rabbit anti-MDA poliklonal antikoru için goat anti-rabbit HRP takılı IgG, Fc, antikoru çözeltisi ile roller mikserde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu inkübasyondan sonra membran tekrar 3 defa 10'ar dakika TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Üçüncü yıkamadan sonra membran pens ile kenarından tutularak bir kurulama kağıdı üzerinde kenarından değdirilerek kuruması sağlandı ve temiz bir kaba aktarıldı. İmmünokimya ile saptamak için hazırlanan 1 mL ECL solüsyonu ile muamele edildi (1-2 dk). Üzeri şeffaf plastik bir membranla kapatıldı. hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek kemilünesans görüntüleme yapıldı.

5.2.7. Deney Grupları

5.2.7.1. Fareler ve İmmünizasyon

Çalışmamızda KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen Balb-c türü 6-7 haftalık 50'i dişi 50'i erkek toplam 100 adet fare kullanıldı. Deneyde kullanılan farelere yem ve su ad libitum olarak verildi. Çalışmamızda her biri 10 fareden oluşan 9 grup oluşturuldu. Beşi erkek beşi dişi olmak üzere her bir grup cinsiyet açısından eşit sayıda fareden oluştu. Enjeksiyon yapılacak maddelere (antijene) gruplar ayrıldı.

- 1.Karbonik anhidraz I grubu
- 2.MDA-modifiye karbonik anhidraz I grubu
- 3.HNE-modifiye karbonik anhidraz I grubu
- 4.Peroksinitrit-modifiye karbonik anhidraz I grubu
- 5.Karbonik anhidraz II grubu
- 6.MDA-modifiye karbonik anhidraz II grubu
- 7.HNE-modifiye karbonik anhidraz II grubu
- 8.Peroksinitrit-modifiye karbonik anhidraz II grubu
- 9.Kontrol grubu (immunojen verilmeyen grup)

Ön denemeler için de 10 fare kullanıldı.

İmmünizasyon İşlemi

İmmünizasyon işlemlerinde her bir immunojen madde eşit hacimde Freund adjuvantla çift başlı iğne kullanılarak iyice karıştırılıp iyi bir emülsiyon haline getirilerek hazırlandı. Emülsiyonun gerçekleşip gerçekleşmediği suya damlatılarak kontrol edildi. Eğer emülsiyon suya damlatıldığında dağılmıyorsa enjeksiyona hazır demektir.

İlk enjeksiyonda antijen (modifiye ya da modifiye olmamış karbonik anhidraz) ile eşit hacimde complete Freund adjuvantın (CFA) karıştırılması sonucu elde edilen emülsiyondan her bir fareye 200 µL (100 µL antijen +100 µL Freund adjuvant) subkutan olarak enjekte edildi. Enjeksiyon sonrasında bezelye tanesine benzer görüntü (Bkz. Resim 1) işlemin doğru yapıldığını göstermektedir. Bu şekilde her seferinde farelere 0,1 mg antijen enjekte edilmiş oldu. İki hafta ara ile üç enjeksiyon yapıldı. İkinci ve üçüncü enjeksiyonlarda her bir fareye yine 200 µL emülsiyon enjekte edildi fakat bu emülsiyonlar

hazırlanırken ilk işlemde farklı olarak CFA yerine örnekle eşit hacimdeki incomplete Freund adjuvant kullanıldı. Üçüncü enjeksiyondan iki hafta sonra farelerin dekapitasyonla kanları alındı. Bu kanlar 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilip serumları ayrıldı ve otoantikor titrelerinin belirlenmesinde kullanıldı (3, 118).



Resim 1. İmmünizasyon yapılan Balb-c fare görüntüsü

5.2.8. Farelerde Karbonik Anhidraz Antikor Titrelerinin Belirlenmesi

Hosoda ve arkadaşları tarafından geliştirilen ELISA yönteminde (119) bazı değişiklikler yapılarak çalışma gruplarındaki farelerin HNE, MDA ve PN ile modifiye edilmiş CA I ve CA II'ye ayrıca modifiye edilmemiş CA I ve CA II'ye karşı gelişmiş otoantikor titrelerinin belirlenmesinde kullanıldı. Her numune için ölçümler iki kez tekrarlandı.

Kullanılan Çözeltiler

Kaplama Tamponu: A çözeltisi (0.2 M Na_2CO_3): 1.06 g Na_2CO_3 50mL deiyonize suda çözüldü. B çözeltisi (0.2 M NaHCO_3): 0.84 g NaHCO_3 50ml deiyonize suda çözüldü. 8 mL A çözeltisi ve 17 mL B çözeltisi alındı bir miktar deiyonize suda çözüldü. pH 9.6'ya ayarlanıp hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Birinci Yıkama Tamponu (10 mM PBS Tamponu): 8 g (0.14 M) NaCl, 0.2 g (2.7 mM) KCl, 0.2 g (1.5 mM) KH_2PO_4 ve 2.17 g (8.1 mM) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılıp bir miktar deiyonize suda çözüldü. 1N NaOH ile pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı. Hacmi deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

İkinci Yıkama Tamponu (Tween-20 PBS Çözeltisi): 50 µL tween-20 100 mL PBS tamponunda çözöldü.

% 3'lük Bloklama Tamponu: 3 g süt tozu 100 mL PBS'de çözölererek hazırlandı.

% 1'lik Seyreltme Tamponu: 1 g süt tozu 100 mL PBS'de çözölererek hazırlandı.

Sitrat-Fosfat Tamponu: 0.1 M (2.10 g) sitrik asit ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$), 0.2 M (3.12g) sodyum hidrojen fosfat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) bir miktar deiyonize suda çözölüp pH 4.8'e ayarlandı. Hacim 100 mL'ye tamamlandı. Substrat çözeltisi hazırlamak için kullanıldı.

Antikor (Konjugat) çözeltisi: 5 µL Horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human IgG antikorı alınır ve bloklama tamponu ile 10 mL'ye tamamlanır.

Substrat Çözeltisi: 10 mg orto-fenilen-diamin pH 4.8 olan sitrat -fosfat tamponunun 25 mL'sinde çözöldü. Kullanılmadan hemen önce çözeltiye 10 µL, % 30'luk hidrojen peroksit ilave edildi.

2 M H_2SO_4 Çözeltisi: % 98'lik H_2SO_4 'ten 10.8 mL alınıp deiyonize suyla 100 mL'ye tamamlandı. Reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

Deneyin Yapılışı:

Kaplama tamponunda seyreltilen ve konsantrasyonu 5 µg/mL olacak şekilde hazırlanan CA I veya CA II çözeltilerinden 50'şer µL ELISA pleytindeki kuyucuklara aktarıldı. 18 saat 4 °C'da inkübasyona bırakıldı (kaplama yapılırken her serum örneği için 4 kuyucuk ayrılır ve bu kuyucukların ikisi CA I veya CA II ile kaplandı. İkisi kaplanmadı. Sonuçlar değeriendirilirken kaplı olan kuyucukların absorbens değerilerinden kaplanmamış olan kuyucukların absorbens değeri çıkartıldı.

Pleyt PBS tamponu (birinci yıkama çözeltisi) ile 5'er dakika arayla 3 kez yıkandı. Yıkama işlemi şu şekilde yapıldı: Önce ELISA yıkayıcısında pleyt bir kez yıkandı ve ardından sekizli pipetle 200 µL yıkama tamponu kuyucuklara pipetlendi ve çalkalayıcıda 5 dakika çalkalandı ve ardından ELISA yıkayıcısında yıkandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.

Yıkama işleminin ardından kuyucuklara 200 µL bloklama tamponu ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

Bloklamanın ardından Pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile aynen ikinci basamakta izah edildiği gibi 3 kez yıkandı.

Hasta ve kontrol serumları seyreltme tamponuyla 1/200 oranında seyreltildi. Her bir seyreltilmiş serum örneği 100'er µL 3'ü kaplanmış 3'ü kaplanmamış olmak üzere toplam 6 kuyucuğa pipetlendi ve 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi.

İnkübasyonun ardından pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile ikinci basamakta izah edildiği gibi 3 kez yıkandı.

Kuyucuklara % 1 süt tozu ihtiva eden seyreltme tamponuyla 1/2000 oranında seyreltilmiş antikor çözeltisinden (horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human IgG antikor) 100'er µL ilave edildi ve oda sıcaklığında 1.5 saat çalkalayıcıda bekletildi.

İnkübasyonun ardından pleyt tween-20 içeren PBS tamponu (ikinci yıkama çözeltisi) ile ikinci basamakta izah edildiği gibi 3 kez yıkandı.

Pleytlere 100 µL substrat çözeltisi ilave edildi. 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi.

100 µL 2 M H₂SO₄ bütün kuyucuklara pipetlenerek reaksiyon durduruldu. ELISA okuyucusunda 485 nm'de absorbans okundu.

CA kaplanmış kuyucukların 485 nm'deki absorbans değerlerinin ortalamasından CA kaplanmamış kuyucuklardaki absorbans değerlerinin ortalaması çıkarılarak sonuçlar elde edildi. Elde edilen bu fark serumlardaki CA otoantikor titreleri olarak hesaplandı.

5.2.9. Çalışma Grubu (Bireyler)

Çalışmaya, KTÜ Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Polikliniği'ne başvuran ve EULAR kriterlerine göre romatoid artrit, Amerika-Avrupa Konsensüs kriterlerine göre Sjögren's sendromu ve ASAS kriterlerine göre ankilozan spondilit tanısı konmuş olan hastalar ve gönüllü olarak çalışmaya katılan, yaş ve cinsiyet yönünden hasta grubuyla eşleştirilmiş sağlıklı kişiler katıldı.

Bu kişilerden sabah aç karnına biri biyokimya tüpü ve biride EDTA'lı tüp olmak üzere iki tüp kan alındı. Alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip serum ve plazmaları ayrıldı. Plazmaları ayrılan EDTA'lı tüpteki kanlara hacimlerinin 3 katına kadar izotonik tuz çözeltisi ilave edildi, tüp birkaç defa hafifçe ters-düz edilip santrifüj edildi. Ara yüzeyde beyaz bir tabaka şeklinde duran lökositler ve üst kısım uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi üst kısım berraklaşana kadar devam ettirilerek eritrosit paketleri hazırlandı. Hazırlanan serum, plazma eritrosit paketleri aligotlanıp -80 °C'de saklandı.

5.2.9.1. Bireylerde Karbonik Anhidraz Otoantikor Titrelerinin Belirlenmesi

Fare serumlarında olduğu gibi çalışma grubundaki Sjögren's sendromlu, ankilozan spondilitli, romatoid artritli ve sağlıklı gönüllülerden alınmış olan serum örneklerinde de otoantikor titreleri belirlendi. Fare serumlarındaki ölçümlerden farklı olarak insan serumlarındaki otoantikor ölçümlerinde sekonder antikor olarak HRP takılı rabbit anti-human IgG antikor kullanıldı.

5.2.9.2. Plazma MDA Seviyesi Tayini

Plazma Lipid peroksit seviyesi ölçümü Yagi (120) yöntemiyle yapıldı. Lipid peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. TBA ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipitleri proteinle birlikte fosfotungstik asit/sülfürik asit sistemiyle çöktürüldü.

Kullanılan Çözeltiler

0.042 M Sülfürik Asit: 570 μL % 98'lik H_2SO_4 bir miktar su içeren balon jöjeye pipetlenip hacim 250 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk Fosfotungstik Asit: 0.5 g $\text{H}_3(\text{W}_3\text{O}_{10})_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4.5 mL deiyonize suda çözüldü.

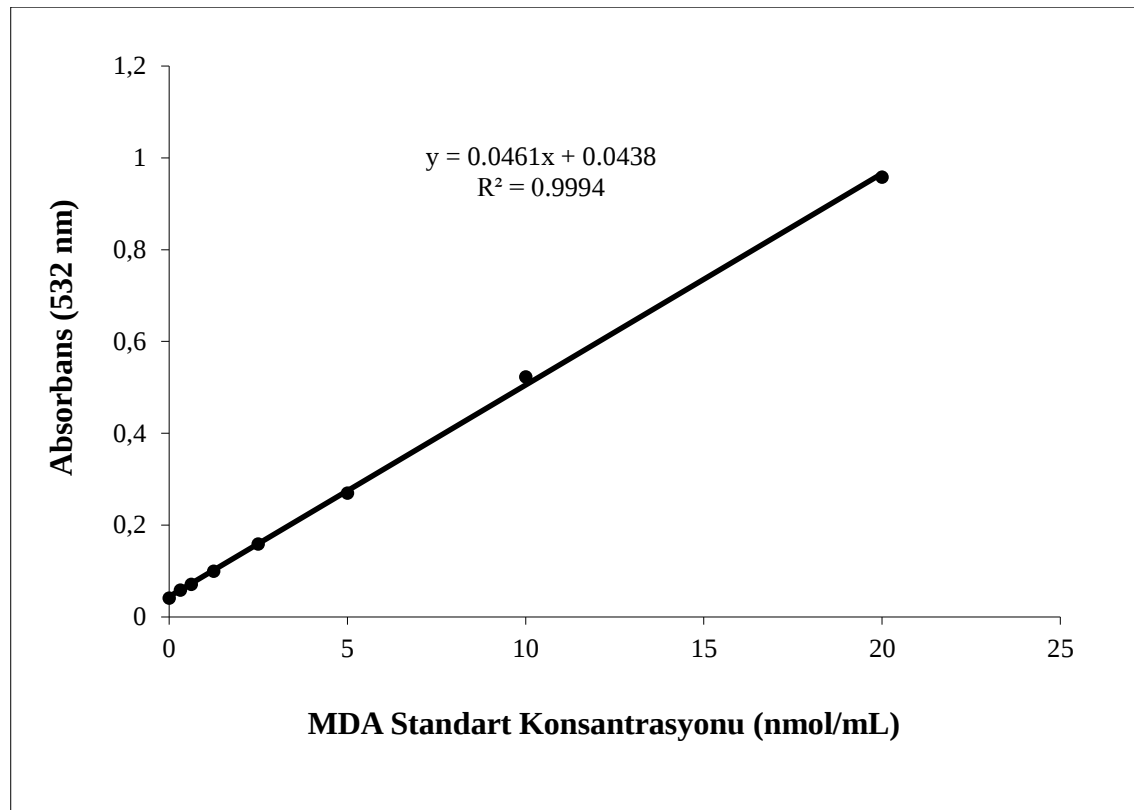
% 0.67'lik Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisi: 0.67 g TBA % 50'lik 100 mL asetik asit çözeltisinde ısıtılarak çözüldü (günlük hazırlandı).

Standart Çözeltileri: 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 nmol [(1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP)) /mL: 164.7 μL TMP 0.01 M HCl ile 100 mL'ye tamamlandı ve 50 $^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat inkübe edildi. Bu 10 mM'lık stok çözeltiden 10 μL alınıp 10 mL'ye deiyonize suyla tamamlanarak hazırlanan 10 μM 'lık standarttan seri dilüsyonlar yaparak standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 7. Plazma MDA seviyesi ölçümü

Reaktifler	Numune (mL)
Plazma	0.3
H ₂ SO ₄	2.4
Fosfotungstik asit	0.3
Hafifçe vortekslenerek 5 dakika beklendi. 4000 rpm 'de 10 dakika santrifüjlendi. Üst faz atıldı.	
Deiyonize su	4.0
Çökelek vortekslenerek çözüldü.	
TBA çözeltisi	1.0
1 saat kaynar su banyosunda tutuldu ve soğutuldu.	
n-bütanol	3.0

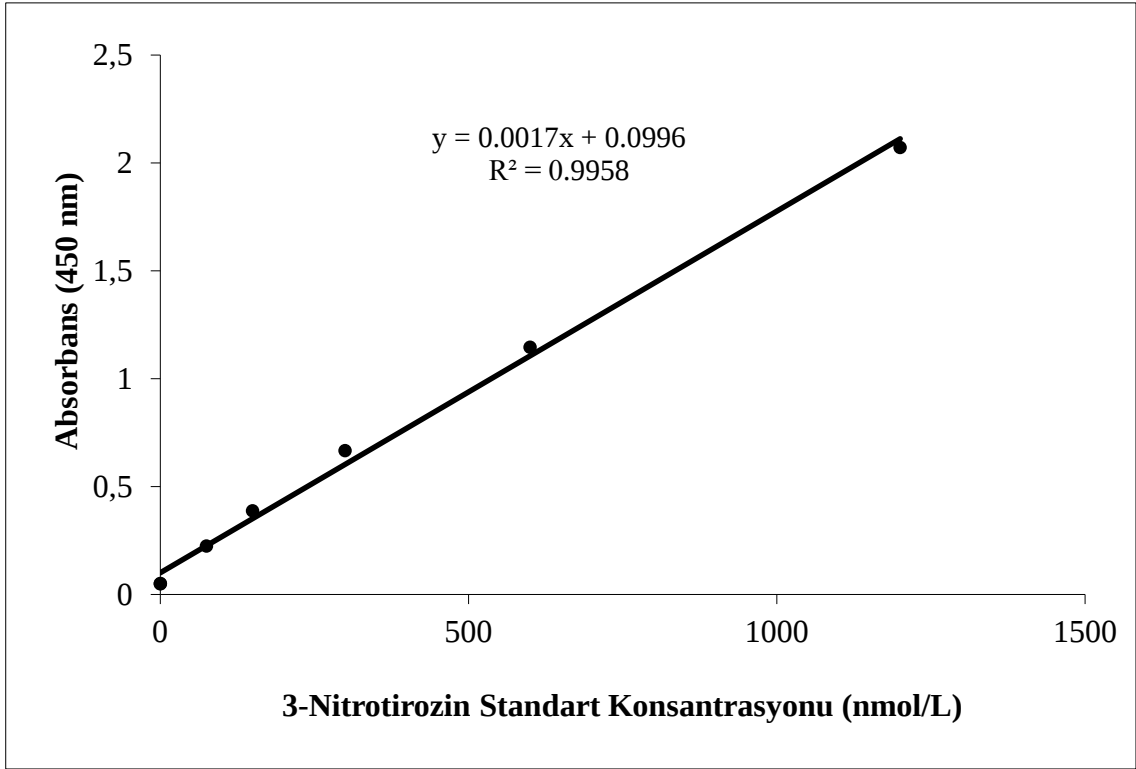
Tablo 7’de ifade edildiği gibi pipetlemeler ve işlemler yapıldı. Sonuçlar MDA için hazırlanan Şekil 6’daki standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 6. MDA standart grafiği

5.2.9.3. Plazma 3-Nitrotirozin Seviyesinin Belirlenmesi

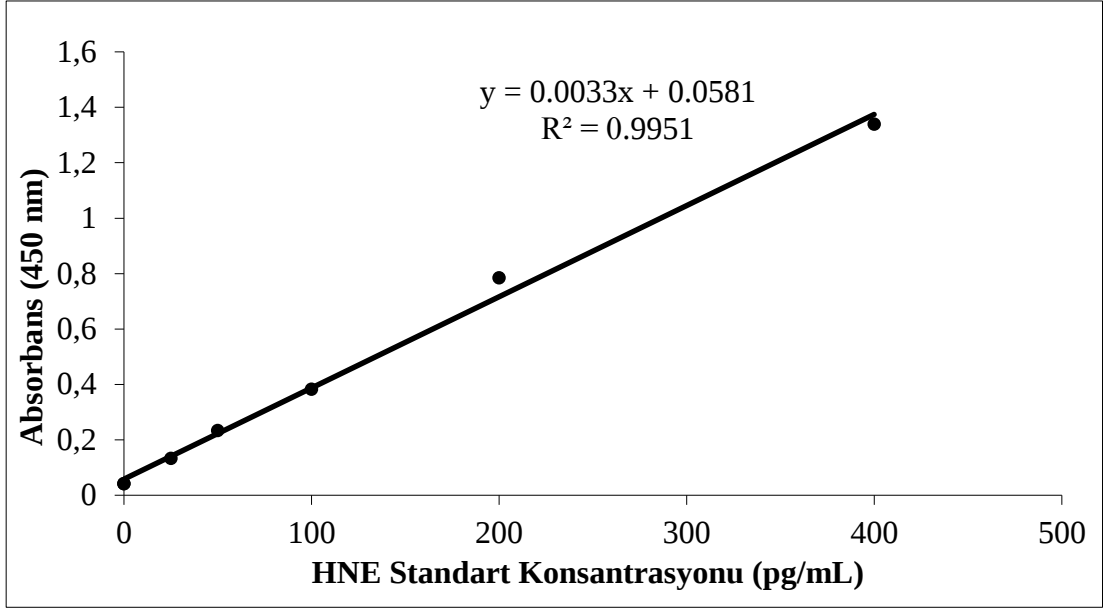
Plazma 3-nitrotirozin seviyesi E0738Hu katalog numaralı Bioassay Technology Laboratory firmasına ait ELİSA kiti ile belirlendi. İşlemler kit protokolüne göre gerçekleştirildi. Şekil 7'deki standart grafiği kullanılarak konsantrasyonlar hesaplandı.



Şekil 7. 3-nitrotirozin standart grafiği

5.2.9.4. Plazma HNE Seviyesinin Belirlenmesi

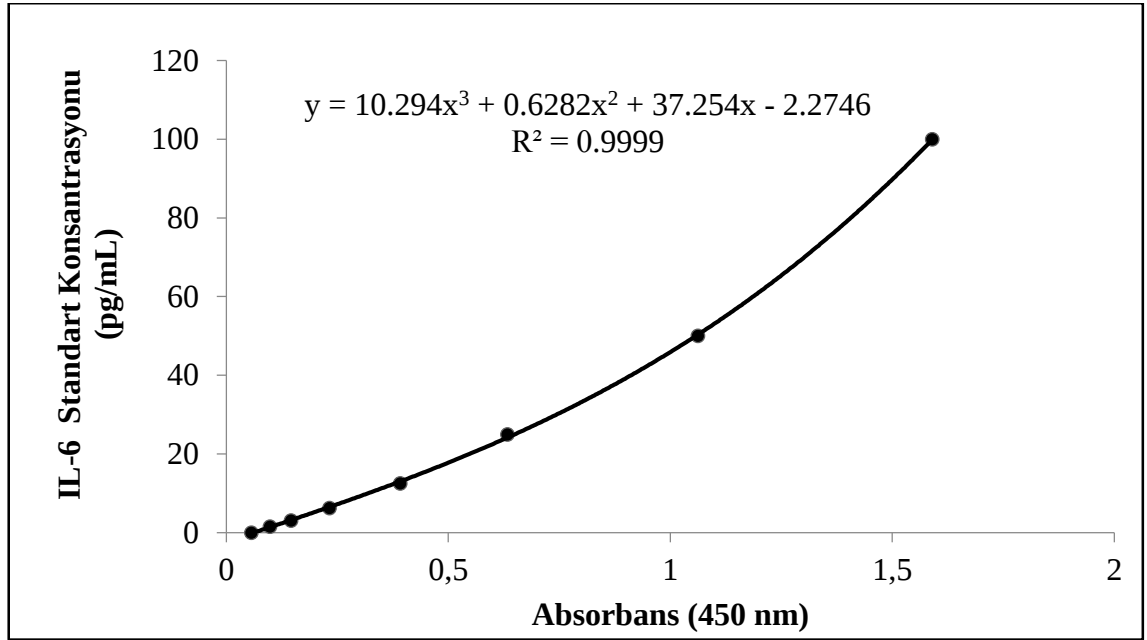
Plazma 4-hidroksinonenal seviyesi 201-12-1979 katalog numaralı Sun Red firmasına ait ELİSA kiti ile belirlendi. İşlemler kit protokolüne göre gerçekleştirildi. Şekil 8'deki standart grafiği kullanılarak konsantrasyonlar hesaplandı



Şekil 8. 4-HNE standart grafiği

5.2.9.5. Plazma IL-6 Seviyesinin Belirlenmesi

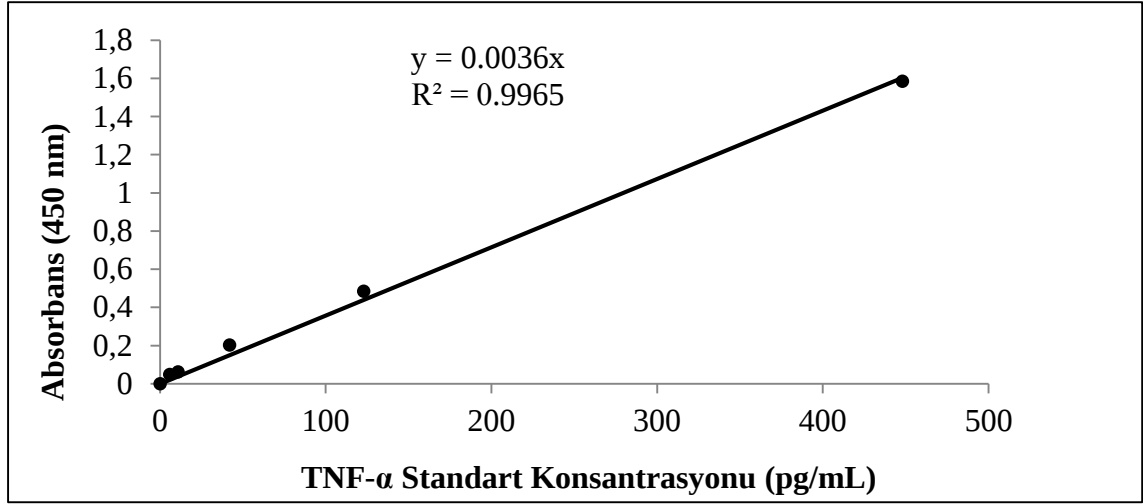
Plazma IL-6 seviyesi BMS213/2 referans numaralı eBioscience firmasına ait ELİSA kiti ile ölçüldü. İşlemler kit protokolüne göre gerçekleştirildi. Şekil 9'daki standart IL-6 grafiğinde yararlanarak konsantrasyonlar hesaplandı.



Şekil 9. IL-6 standart grafiği

5.2.9.6. Plazma TNF- α Seviyesinin Belirlenmesi

Plazma TNF- α seviyesi KAP1751 katalog numaralı Dia Source firmasına ait ELİSA kiti ile ölçüldü. İşlemler kit protokolüne göre gerçekleştirildi. Şekil 10'daki standart grafiğinden yararlanarak konsantrasyonlar hesaplandı.



Şekil 10. TNF- α standart grafiği

5.2.9.7. Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Süperoksit dismutaz aktivitesi, Sun ve Oberley (121) metoduna göre yapıldı. Bu metod, ksantin-ksantin oksidaz sisteminin oluşturduğu süperoksit radikallerinin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgeyerek oluşturduğu mavi-mor rengin 560 nm'de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Eritrositlerdeki SOD'un ortamdaki süperoksit radikallerini uzaklaştırması sonucu optik dansitede meydana gelen azalmadan yararlanılarak SOD tarafından katalizlenen reaksiyonun % inhibisyonu hesaplandı. % 50 inhibisyona karşı gelen SOD miktarı bir enzim ünitesi olarak alındı.

Kullanılan Çözeltiler

Etanol:Kloroform Karışımı (5:3): 50 mL etanol 30 mL kloroformla karıştırıldı.

0.3 mmol/L Ksantin Çözeltisi: 3.65 mg ksantin 80 mL deiyonize suda çözüldü.

0.6 mmol/L EDTA Çözeltisi: 8.93 mg EDTA 40 mL deiyonize suda çözüldü.

150 μ L NBT Çözeltisi: 4.9 mg NBT 40 mL deiyonize suda çözüldü. NBT günlük taze hazırlandı.

400 mM Na₂CO₃ Çözeltisi: 1.01 g Na₂CO₃ 24 mL deiyonize suda çözüldü.

1 g/L BSA: 24 mL deiyonize suda 12 mg BSA çözüldü.

167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 3.3 U/mL'lik orijinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL'ye amonyum sülfatla tamamlandı. Ksantin oksidaz günlük hazırlandı.

0.8 mmol/L CuCl₂ Çözeltisi: 5.37 g CuCl₂ 50 mL deiyonize suda çözüldü. Günlük taze hazırlandı.

2 mol/L Amonyum Sülfat: 2.64 g amonyum sülfat 10 mL deiyonize suda çözüldü.

SOD Standartları: 10, 8, 4, 3, 2, 1, 0.5 U/mL'lik SOD standartları ve kör hazırlandı.

Reaksiyon karışımı: 80 tüp için; 80 mL 0,3 mM ksantin çözeltisi, 40 mL 0,6 mM EDTA çözeltisi, 40 mL 150 µM NBT çözeltisi, 24 mL 400 mM Na₂CO₃ çözeltisi, 12 mL 1g/L BSA karıştırıldı. Reaksiyon karışımı hazırlanırken hacimler hesaplanıp bütün maddeler aynı kapta karıştırıldı. Yukarıda ifade edilen konsantrasyon ifadeleri son konsantrasyonlardır. Ksantinin kolay çözünmesi için bunların aynı ortamda olması gerekir.

Deneyin yapılışı

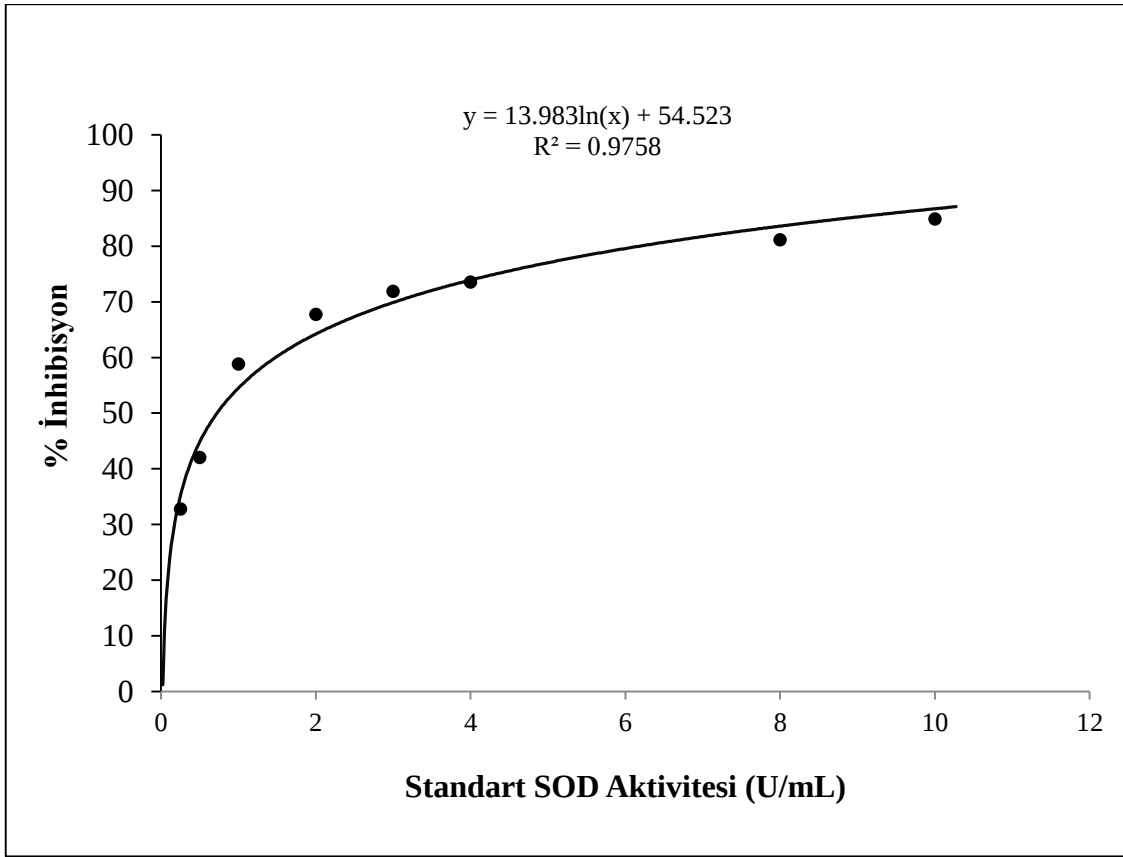
100 µL eritrosit paketi 900 µL soğuk saf su ile karıştırılıp hemoliz edildi. Elde edilen hemolizata 800 µL etanol:kloroform (5:3) karışımı eklenip vortekslendi. 18 000 x g'de 4 °C'de bir saat santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant SOD aktivitesi ve katalaz aktivitesi ölçümünde kullanıldı.

Tablo 8. SOD aktivitesi ölçümü

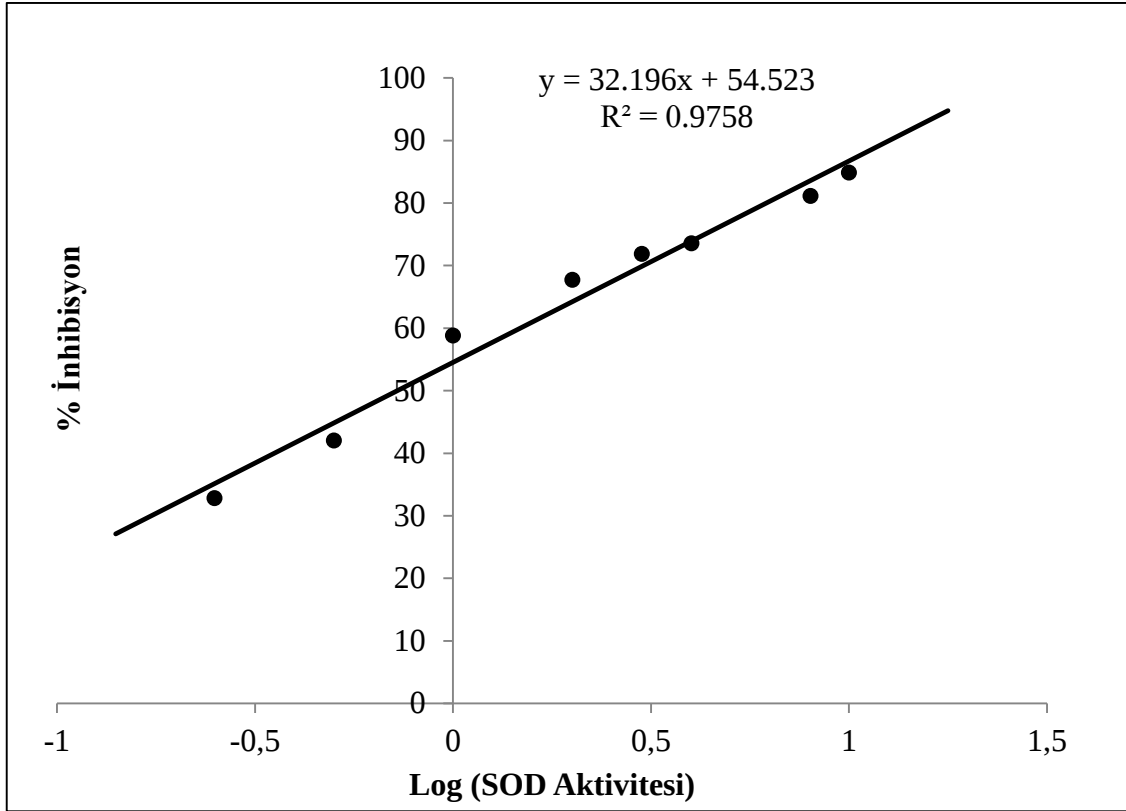
Çözeltiler	Hacim (mL)
Reaksiyon karışımı	1.225
Süpernatant	0.25
Ksantin oksidaz	0.025
25 °C'da 20 dakika inkübasyona bırakıldı (karanlıkta).	
Bakır klorür	0.5
560 nm'de absorbans ölçüldü.	

Tablo 8’de ifade edildiği gibi pipetlemeler ve işlemler yapıldı ve 560 nm de absorbanslar ölçüldü. Hesaplamalar % inhibisyon olarak hesaplandı. Şekil 11’deki standart grafiği SOD aktivitesinin logaritması alınarak Şekil 12’deki lineer standart grafiğine dönüştürüldü. Bu grafikten yararlanılarak % inhibisyonlar SOD aktivitesine dönüştürüldü. % 50 inhibisyona karşılık gelen SOD aktivitesi bir bir enzim ünitesi olarak alındı. Sonuçlar hemoglobin miktarına bölünerek U/g Hb olarak hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A \text{ kör} - A \text{ numune})}{A \text{ kör}} \times 100$$



Şekil 11. Standart SOD aktivitesi ve % inhibisyon grafiği



Şekil 12. Log(Standart SOD aktivitesi) ve % inhibisyon grafiği

5.2.9.8. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini

Katalaz aktivitesi, temel prensibi amonyum molibdatın hidrojen peroksitle oluşturduğu sarı renkli kompleksin 405 nm’de absorbansının ölçülmesi esasına dayanan Goth metoduna göre yapıldı (122).

Kullanılan Çözeltiler

60 mM Sodyum Potasyum Fosfat Tamponu (pH 7.0): 5.37 g KH_2PO_4 ve 3.65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ yaklaşık 750 mL saf suda çözülür, pH 7.0’a ayarlanır ve hacmi 1 L’ye tamamlandı.

32.4 mM Amonyum Molibdat Çözeltisi: 1.89 g amonyum molibdat 50 mL saf suda çözülür.

65 mM H_2O_2 Çözeltisi: 280 μL % 35’lik H_2O_2 50 mL fosfat tamponunda çözülür. H_2O_2 çözeltisi taze hazırlandı.

Tablo 9. Katalaz aktivitesi ölçümü ve yapılan işlemler

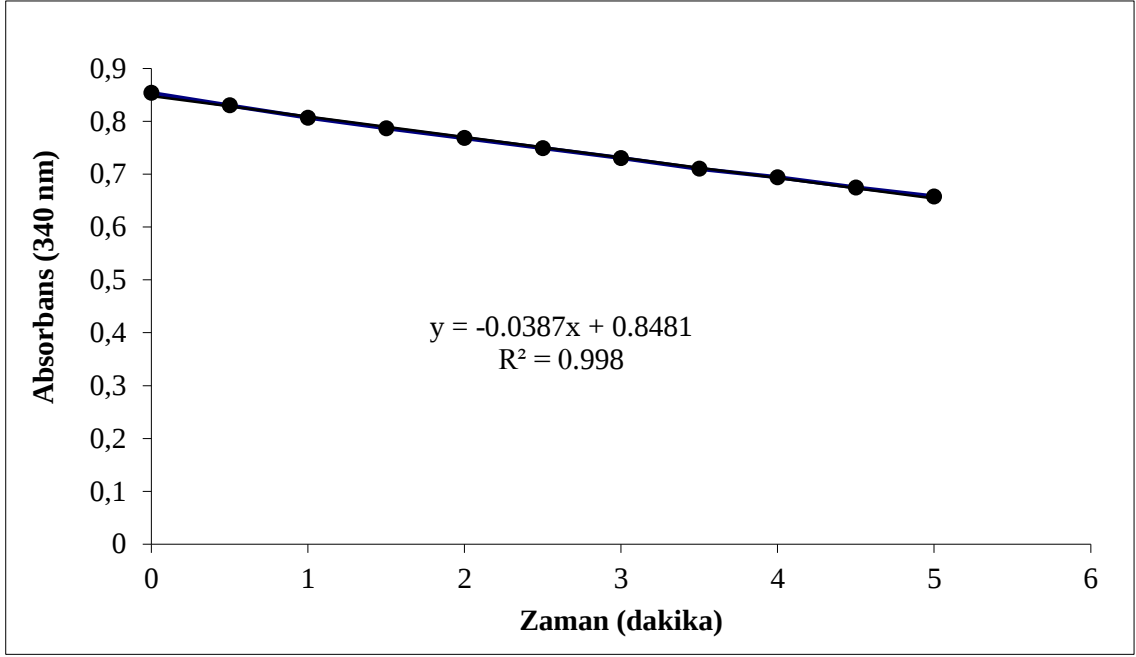
Çözeltiler	Numune	Kör 1	Kör 2
Numune	20 µL		
Tampon		20 µL	120 µL
H ₂ O ₂ 'li tampon	100 µL	100 µL	
37 °C'de 1 dakika bekletildi.			
Amonyum molibdat çözeltisi	100 µL	100 µL	100 µL
405 nm'de absorbansları okundu.			

Tablo 9'da ifade edilne işlemler yapıldı. Ölçülen absorbans değerleri aşağıdaki denklemde yerine konularak katalaz aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar hemoglobin miktarlarına bölünerek U/g Hb olarak ifade edildi.

$$Katalaz\ aktivitesi\left(\frac{U}{mL}\right)=\frac{(A\ kör2 - A\ numune)}{(A\ kör2 - A\ kör\ 1)} \times 271$$

5.2.9.9. Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini

Eritrosit GSH-Px ölçümü 703102 nolu Cayman firmasının spektrofotometrik assay kiti ile gerçekleştirilmiştir. Eritrosit GSH-Px ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir ve elde edilen GSH-Px kontrolünün aktivite grafiği Şekil 13'de gösterilmiştir. Elde edilen aktivite değerleri hemoglobin miktarına bölünerek ifade edildi.



Şekil 13. Standart GSH-Px aktivite grafiği

5.2.9.10. Eritrosit MDA Seviyesinin Belirlenmesi

Eritrosit MDA seviyesi Stocks ve Dormandy metoduna göre gerçekleştirildi (123). Bu metod MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA)'ın ısıtılması sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi esasına dayanır.

Kullanılan Çözeltiler

Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS): 1.76 mL 0.5 M KH_2PO_4 çözeltisi ve 6.08 mL 0.5 M K_2HPO_4 çözeltisi % 0.9'luk NaCl çözeltisinde karıştırılıp pH 7.4'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 1 L'ye tamamlandı.

0.4 M Sodyum Azid: 2.6 g NaN_3 100 mL PBS'de çözülür.

TBA Çözeltisi: 0.1 g TBA 500 μL 1N NaOH çözeltisinde çözülür bir miktar saf su ilave edilir ısıtılır iyice çözündükten sonra hacmi 10 mL'ye tamamlanır.

% 28'lik Trikloro Asetik Asit Çözeltisi: 14 mg TCA 50 mL saf suda çözülür.

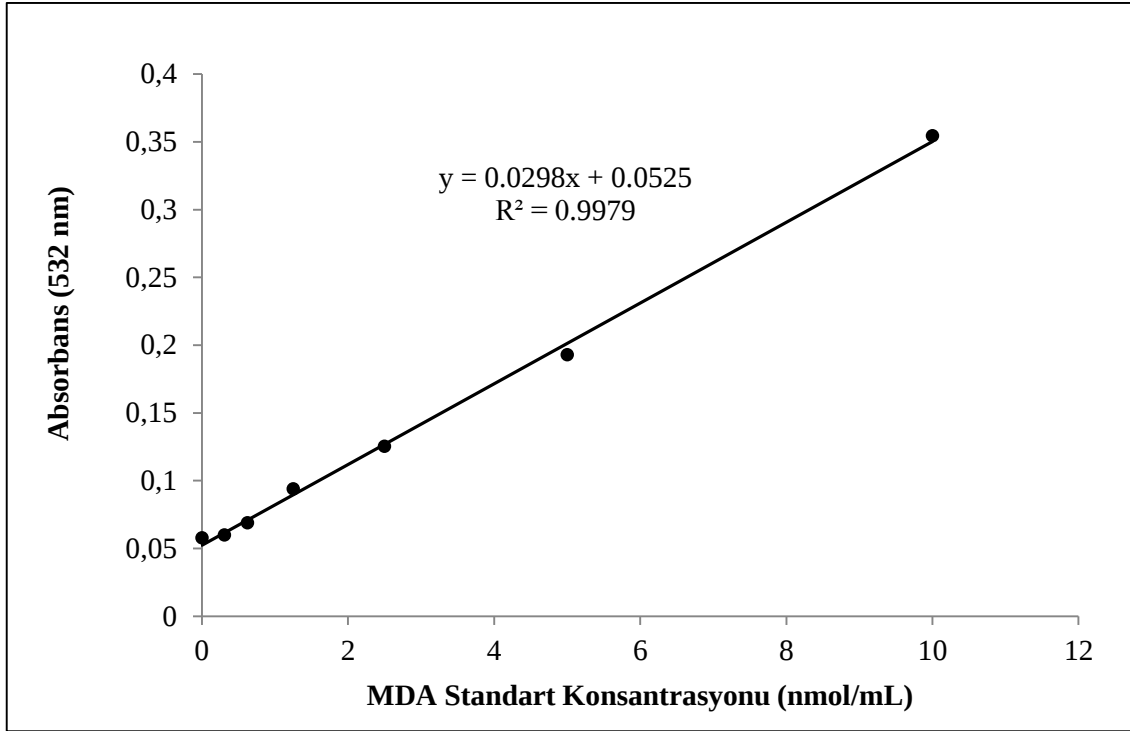
Sodyum Arsenit Çözeltisi: 0.52 g sodyum meta-arsenit 20 mL % 28'lik TCA'da çözülür.

Standartlar Çözeltileri: 10, 5, 2.5, 1, 1.25, 0 nmol/mL konsantrasyonlarda MDA standartları hazırlandı.

Tablo 10. Eritrosit MDA ölçümü ve yapılan işlemler

Çözelti	Hacim (µL)
Eritrosit paketi	100
Azitli PBS çözeltisi	900
37 °C de 10 dakika karıştırılır.	
PBS çözeltisi	1000
37 °C’de 2 saat çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı.	
Hücre süspansiyonu oluşturuldu.	
Süspansiyon	300
TCA-arsenit	200
3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alındı.	
Süpernatant ve standartlar	300
TCA	100
TBA	100
15 dakika kaynar su banyosunda bekletildi.	
Soğutulduktan sonra mikropipetle aktarıldı. 532 nm de absorbansları okundu.	

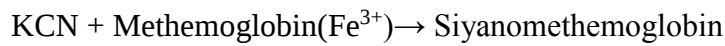
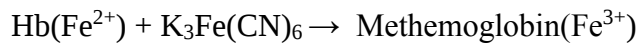
Tablo 10’da ifade edildiği gibi işlemler gerçekleştirildi. Şekil 14’deki MDA standart grafiğinden yararlanarak örneklerdeki MDA konsantrasyonu hesaplandı. Belirlenen MDA düzeyleri hemoglobin değerlerine bölünerek ifade edildi.



Şekil 14. Eritrosit MDA standart grafiği

5.2.9.11. Hemogloblin Miktarının Belirlenmesi

Metodun temel prensibi; Drabkin çözeltisindeki ferrosiyanür ile hemogloblin molekülündeki +2 değerlikli demirin +3 değerliğe yükseltgenmesiyle methemoglobine daha sonra da bu methemoglobinin potasyum siyanür ile kararlı siyanomethemoglobin bileşiğine dönüşmesi esasına dayanır (124).



Oluşan siyanomethemoglobinin 540 nm'deki absorbansı ölçülerek Hb miktarı belirlenmektedir.

Kullanılan Çözeltiler

Drabkin çözeltisi: 0.05g KCN, 0.2 g potasyum ferrosiyanide ve 1 g Na₂CO₃ saf suda çözülüp hacmi 1L ye tamamlanır.

Tablo 11. Hemoglobin ölçümü

Çözeltiler	Hacim (mL)
Numune	0.02
Drabkin çözeltisi	5
Vortekslendi. Oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi.	
540 nm’de absorbans ölçüldü.	

Tablo 11’de ifade edilen işlemler gerçekleştirildi. Standart kullanmadan doğrudan örneklerin 540 nm’deki absorbans değerleri aşağıdaki denklemler de yerine konularak hemoglobin miktarları hesaplandı.

$$\text{Hb(g/L)} = \frac{A^{540} \times 16114 \times \text{dilüsyon katsayısı}}{11.0 \times d \times 1000}$$

$$\text{Hb} \left(\mu \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{A^{540} \times \text{dilüsyon katsayısı}}{11.0 \times d \times 1000}$$

A^{540} : çözeltinin 540 nm’deki absorbansı

16114: hemoglobinin monomerik moleküler ağırlığı

Dilüsyon katsayısı: 251 $\left(\frac{5020 \mu\text{L}}{20 \mu\text{L}} \right)$

11.0: 540 nm’de milimolar absorptivite katsayısı

d: ışık yolu(cm)

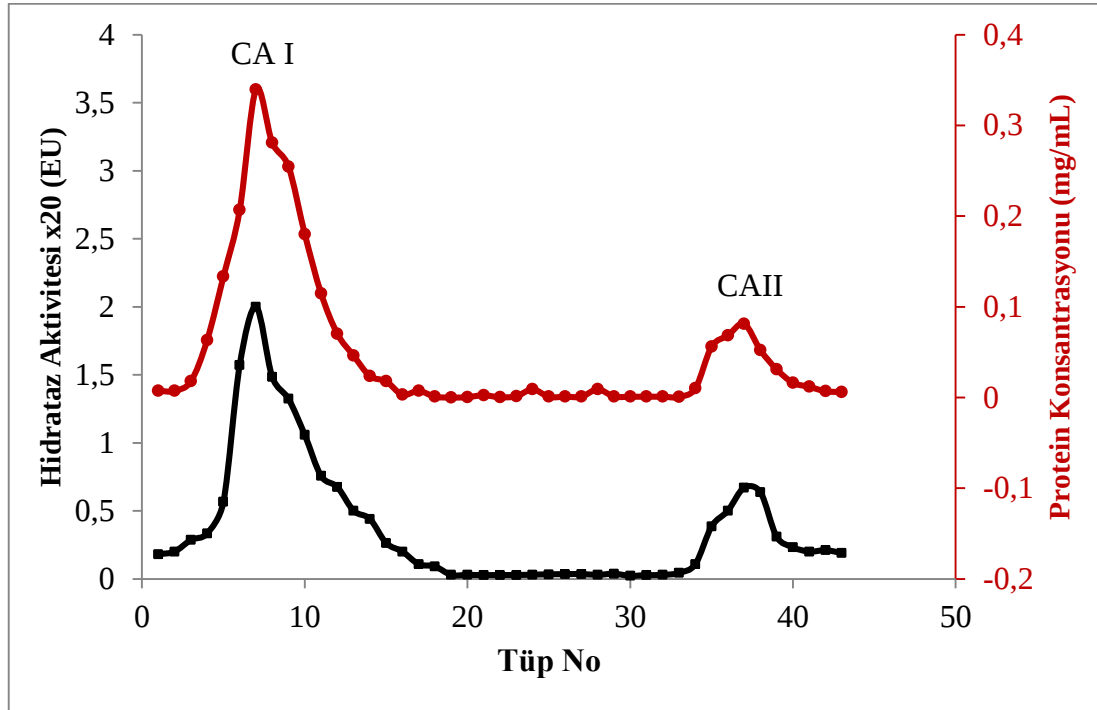
5.3. İstatistiksel Yöntemler

Elde edilen sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov Testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uyan; bağımsız parametrelerin ikili karşılaştırmaları için Student t testi, ikiden fazla bağımsız grupların değerlendirmesinde ANOVA testi uygulandı. Normal dağılıma uymayan ikiden fazla parametrenin değerlendirilmesi için Mann Whitney U testleri uygulandı. Parametreler arasındaki ilişki ortaya konmasında Spearman korelasyon testi uygulandı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Karbonik Anhidrazın Eritrositlerden İzolasyonu

Sülfanilamid takılı Sepharose-4B'nin kullanıldığı afinite kromatografisi ile elde edilen 5 mL'lik fraksiyonlarda Bradford metoduyla protein tayini gerçekleştirildi ve CA hidrataz aktivitesi ölçüldü. Bu değerler grafiğe aktarıldığında Şekil 15'de görüldüğü gibi fraksiyonlardaki protein konsantrasyonuyla hidrataz aktiviteleri birbirleriyle örtüşmektedir. Grafikteki ilk pik CA I izoenzimine, ikinci pik CAII izoenzimine aittir.



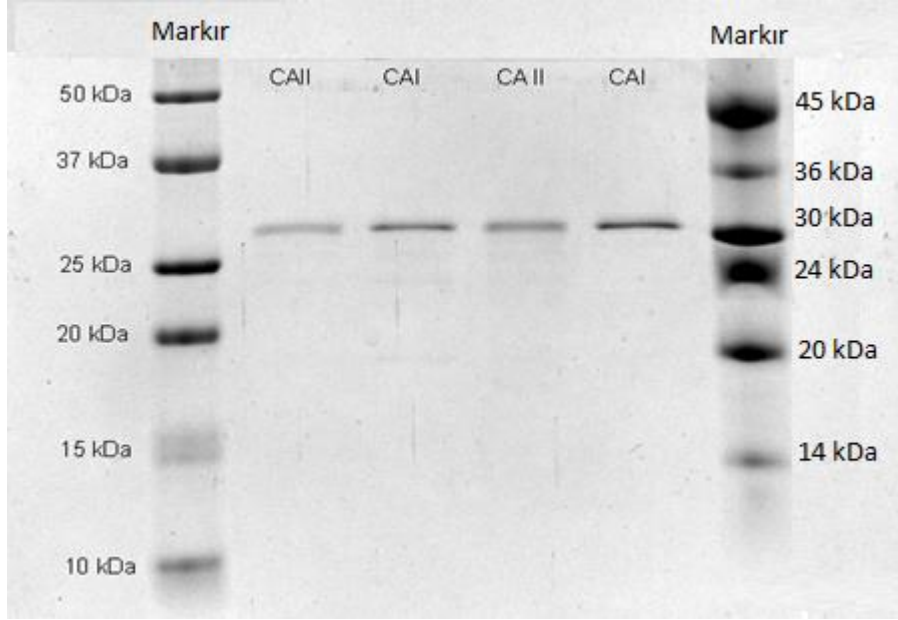
Şekil 15. Fraksiyon tüplerindeki CA Aktivitesi ve protein tayinleri

Şekil 15'ten yararlanılarak hangi fraksiyonların alınacağına karar verildi. Bu amaçla protein miktarı ile hidrataz aktivitesi örtüşen ve mümkün olduğunca baseline'nın üzerinde kalan fraksiyonlar alınıp kullanıldı.

6.2. İzole Edilen Karbonik Anhidrazın Saflığının Kontrolü

Afinite kromatografisiyle eritrositlerden izole edilen CA I ve CA II liyofilize edilerek deriştirildi. Daha küçük bir hacimde 50 mM'lık fosfat tamponunda çözöldü. Elde edilen CA çözeltilerinin konsantrasyonu belirlendi. CA I çözeltilisinin

konsantrasyonu 5 mg/mL iken CA II çözeltisinin konsantrasyonu 2.5 mg/ml bulundu. CA I ve CA II örneklerinin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE uygulandı.



Resim 2. Saflaştırılan enzimin (CAI ve CA II) Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanmış SDS-PAGE görüntüsü

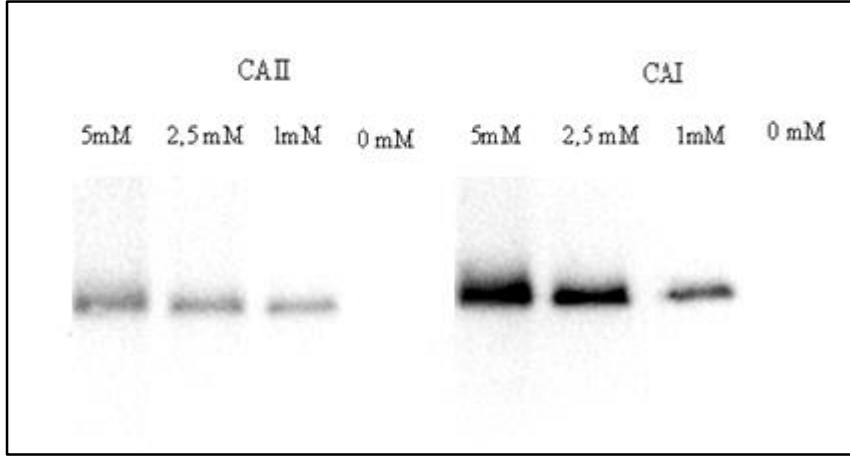
CA I ve CA II izoenzimlerinin molekül ağırlığı yaklaşık 30 kDa'dur. Elde edilen SDS-PAGE görüntüsünde (Resim 2) 30 kDa molekül ağırlığına karşılık gelen bölgede tek bant bulundu. Ayrıca yapılan aktivite tayinlerinde eşit konsantrasyondaki CA II çözeltisindeki CA hidrataz aktivitesi CA I çözeltisindekinden yaklaşık 9 kat daha fazla bulundu (1 mg/mL CA I enziminin aktivitesi 204.5 EU iken eşit konsantrasyondaki CA II enziminin aktivitesi 1786.0 EU'dur) .

6.3. Karbonik Anhidrazın Oksidatif Modifikasyonu

SDS-PAGE ile saflığı kontrol edilen CA izoenzimleri modifikasyon işlemlerinde kullanıldı. İlgili çözeltilerde son konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde ayarlandı. MDA, HNE ve PN'nin farklı konsantrasyonları ile modifiye edildi.

6.3.1. Karbonik Anhidrazın MDA ile Modifikasyonu

CA I ve CA II enzimi farklı konsantrasyonlardaki (0-5 mM) MDA ile modifiye edildi. Primer antikor olarak anti-MDA antikorunu kullanılarak western blot uygulandı.

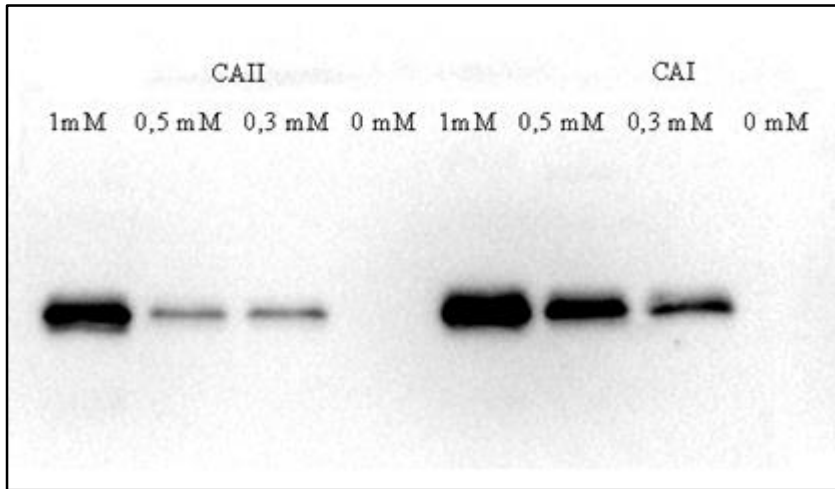


Resim 3. MDA ile modifiye edilmiş CA izoenzimleri için western blot görüntüsü

Resim 3'deki western blot görüntüsünde 30 kDa civarında tek bant gözlenmektedir. Ayrıca MDA konsantrasyonuna bağlı olarak bantlardaki yoğunluk artmaktadır. MDA modifikasyonunun olmadığı 0 mM MDA içeren çözeltinin uygulandığı bölgede bant bulunmamaktadır.

6.3.2. Karbonik Anhidrazın PN ile Modifikasyonu:

CA I ve CA II enzimi farklı konsantrasyonlardaki (0-1 mM) PN ile modifiye edildi. Primer antikor olarak anti-nitrotirozin antikorları kullanılarak western blot uygulandı.

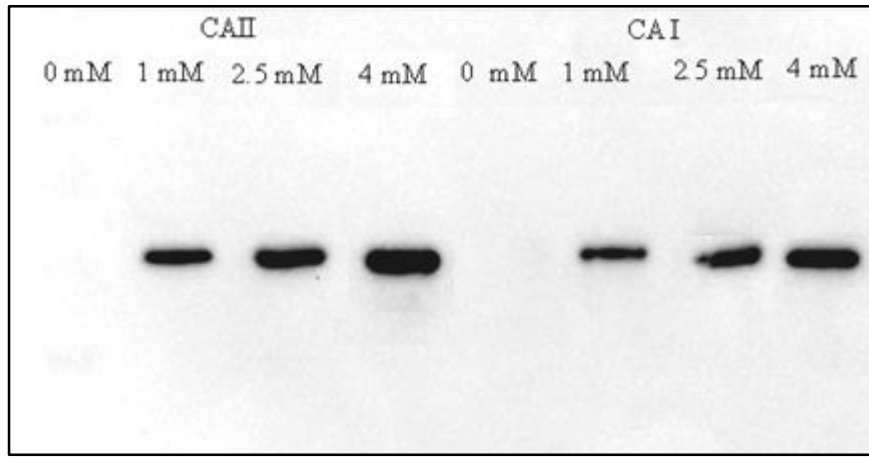


Resim 4. PN ile modifiye edilmiş CA izoenzimleri için western blot görüntüsü

Resim 4'deki western blot görüntüsünden 30 kDa civarında tek bant gözlenmektedir. Ayrıca PN konsantrasyonuna bağlı olarak bantlardaki yoğunluk artmaktadır. PN modifikasyonunun olmadığı 0 mM PN içeren çözeltinin uygulandığı bölgede bant bulunmamaktadır.

6.3.3. Karbonik Anhidrazın HNE ile Modifikasyonu

CA I ve CA II enzimi farklı konsantrasyonlardaki (0-5 mM) HNE ile modifiye edildi. Primer antikor olarak anti HNE antikor kullanılarak western blot uygulandı.



Resim 5. HNE ile modifiye edilmiş CA izoenzimleri için western blot görüntüleri

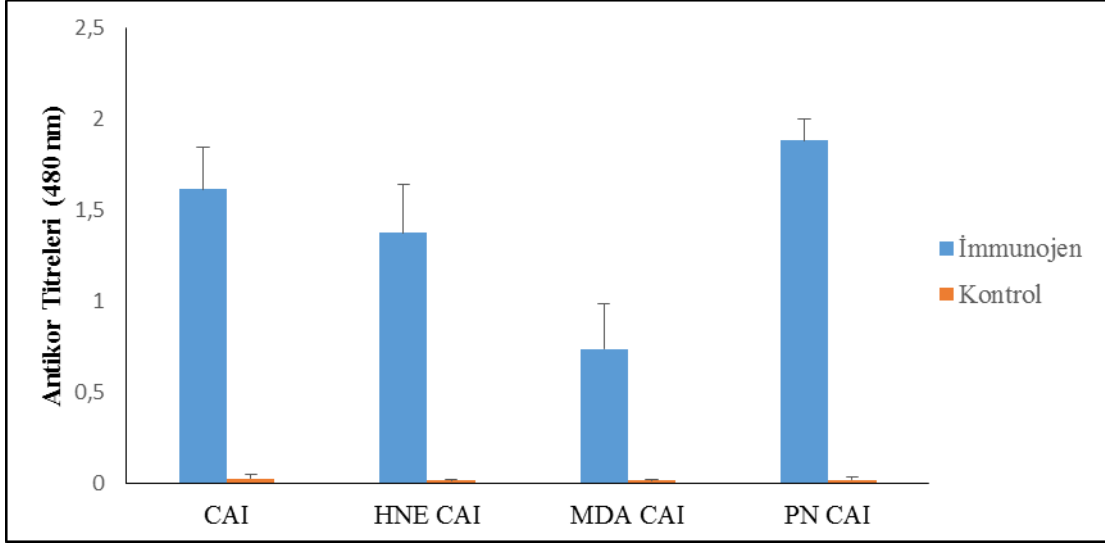
Resim 5'deki görüntüden 30 kDa civarında tek bant gözlenmektedir. Ayrıca PN konsantrasyonuna bağlı olarak bantlardaki yoğunluk artmaktadır. HNE modifikasyonunun olmadığı 0 mM HNE içeren çözeltinin uygulandığı bölgede bant bulunmamaktadır.

6.4. Farelerde CA ve Modifiye CA Formları ile İmmünizasyon Sonuçları

Modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş CA izoenzimleri Freund adjuvantla emülsifiye edilip Balb-c farelere subkutan olarak enjekte edildi. İmmünizasyon aşamasının ardından farelerin dekapitasyonla kanları alındı. Hosoda ve ark. geliştirdiği ELISA yöntemiyle CA izoenzimlerine karşı gelişen antikor titreleri belirlendi.

6.4.1. Farelerde CA I ve Modifiye CA I Antikor Titreleleri

Saf CA I enzimi ve modifiye formları ile mikroplyetler kaplanıp ELISA yöntemiyle farelerin serumlarındaki antikor titreleleri belirlendi.



Şekil 16. CA I ve modifiye CA I formlarının antijenik özelliği

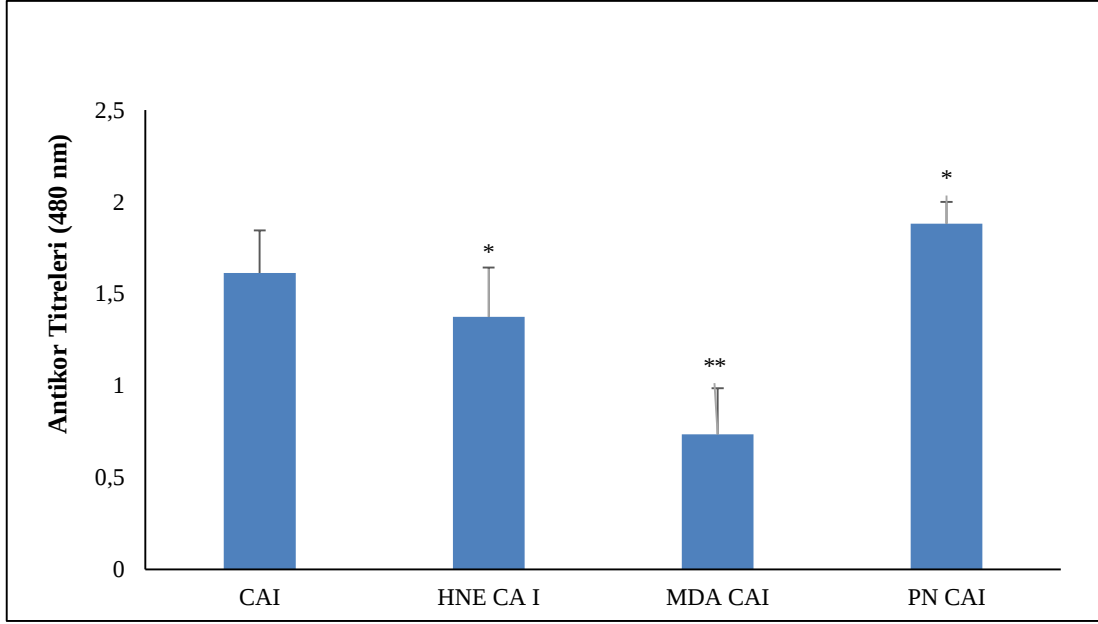
Saf CA I ve HNE, MDA, PN modifiye CA I formlarına karşı antikor oluşmaktadır (Şekil 16). Saf CA I ve modifiye CA I formlarına karşı gelişen antikor titreleleri kontrolleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p < 0.001$ düzeyinde yüksek bulundu (Tablo 12).

Tablo 12. CA I ve modifiye CA I formlarının antijenik özelliği

Antijen	Kontrol Grubunda Antikör Titreleleri	İmmünojen Verilen Gruplarda Antikör Titreleleri
CAI	0.028 ± 0.024	1.613 ± 0.232*
HNE CAI	0.017 ± 0.006	1.374 ± 0.268*
MDA CAI	0.014 ± 0.005	0.736 ± 0.25*
PN CAI	0.019 ± 0.016	1.883 ± 0.118*

*İstatistiksel olarak kontrol grubu ile ilgili grup arasındaki $p < 0.001$ düzeyindeki farkı göstermektedir.

HNE, MDA ve PN modifiye CA I antikorları ile saf CA antikorları ile karşılaştırıldığında modifiye formlarla saf CA I antikorları arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu (Şekil 17). HNE ve PN modifiye CAI antikor titreleri saf CA I antikor titreleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p<0.05$ düzeyinde farklıdır.



Şekil 17. Modifikasyonların CA I'in antijenik özelliğine etkisi. * Saf CA I ile ilgili grup arasındaki $p<0.05$ düzeyindeki farkı göstermektedir. ** Saf CA I ile ilgili grup arasındaki $p<0.001$ düzeyindeki farkı göstermektedir.

MDA modifiye CA I antikor titreleri ise $p<0.001$ düzeyinde farklıdır. HNE ve MDA modifikasyonları CA I'in antijenik özelliği azaltırken PN modifikasyonu artırmıştır.

6.4.2. Farelerde CA II ve Modifiye CA II Antikorları

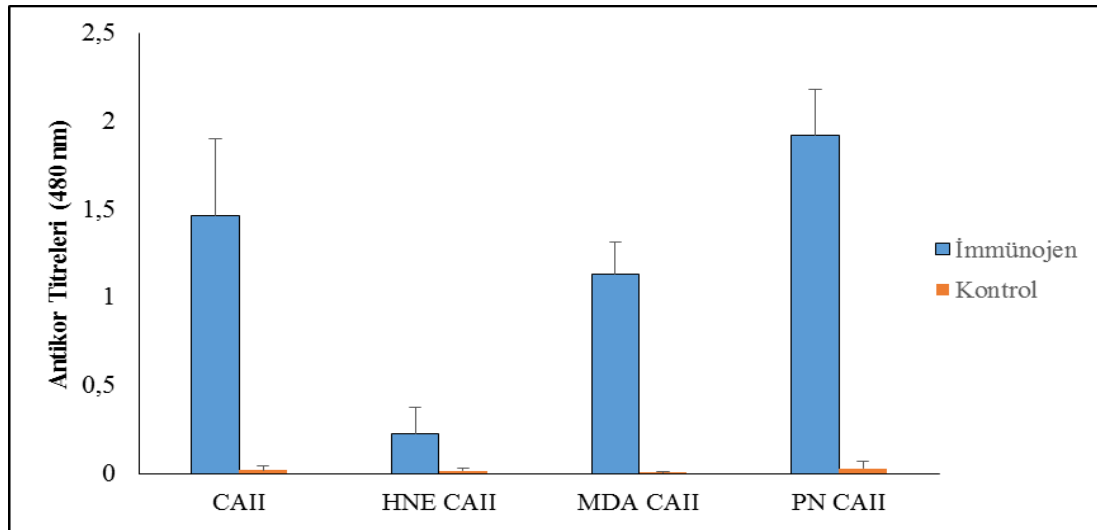
Saf CA II enzimleri ve HNE, MDA, PN modifiye CA II formları ile mikroplyetler kaplanıp ELISA yöntemiyle farelerin serumlarındaki antikor titreleri belirlendi.

Tablo 13. CA II ve modifiye CA II formlarının antijenik özelliği

Antijen	Kontrol Grubunda Antikor Titreleeri	Antijen Verilen Gruplarda Antikor Titreleeri
CAII	0.022 ± 0.025	1.464 ± 0.435*
HNE CAII	0.021 ± 0.017	0.232 ± 0.146*
MDA CAII	0.010 ± 0.006	1.132 ± 0.187*
PN CAII	0.034 ± 0.038	1.919 ± 0.262*

*İstatistiksel olarak kontrol grubu ile ilgili grup arasındaki $p < 0.001$ düzeyindeki farkı göstermektedir.

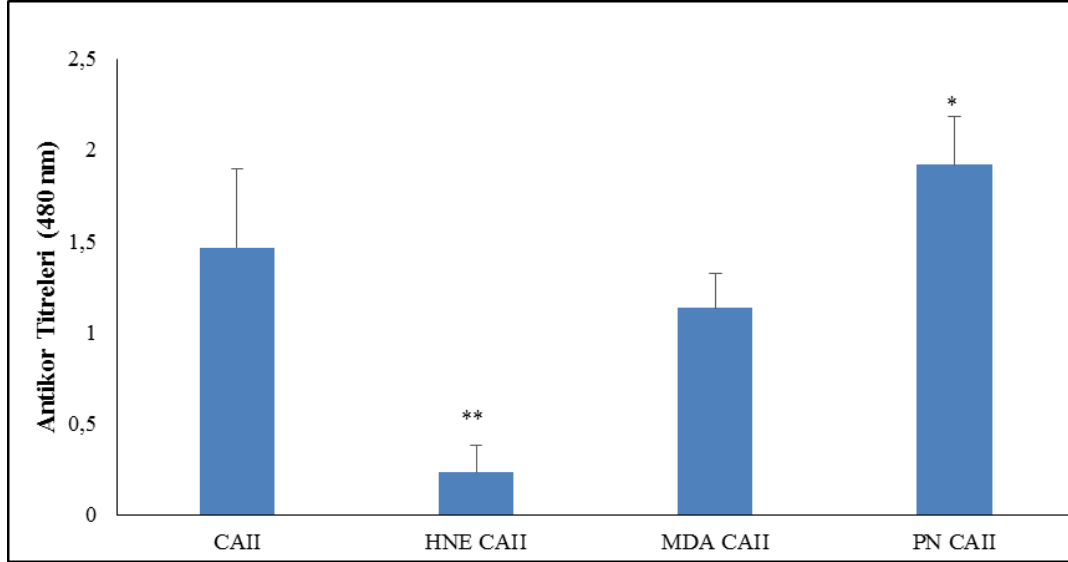
HNE, MDA, PN modifiye CA II ve saf CA II antikor titreleri kontrolleriyle karşılaştırıldığında bütün modifiye CA II formlarıyla saf CA II antikor titreleri arasında istatistiksel olarak $p < 0.001$ düzeyinde yüksektir (Tablo 13).



Şekil 18. CAII ve modifiye formlarının antijenik özelliği

Saf CA II'ye ve bütün modifiye CA II formlarına karşı antikor oluşmaktadır (Şekil 18). HNE, MDA, PN modifiye CAII antikor titreleri ile saf CA II antikor titreleri ile karşılaştırıldığında, HNE ve PN modifiye formlarla saf CA II antikorları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Şekil 19). HNE modifiye CA II antikor titreleri saf CA II antikor titrelerinden anlamlı derecede düşükken, PN

modifiye CA II antikor titreleri ile saf CAII antikor titrelerinden anlamlı derecede yüksektir.



Şekil 19. Modifikasyonların CA II'nin antijenik özelliğine etkisi. * Saf CA II ile ilgili grup arasındaki $p < 0.05$ düzeyindeki farkı göstermektedir. ** Saf CA II ile ilgili grup arasındaki $p < 0.001$ düzeyindeki farkı göstermektedir.

HNE modifikasyonu CA II'nin antijenik özelliğini azaltırken PN modifikasyonu arttırmaktadır.

6.5. Bireylerdeki CA Otoantikor Titreleri

CA I ve II izoenzimleri ve HNE, MDA ve PN ile modifiye edilmiş formları ile mikroplyetler kaplandı. Çalışma grubundaki sağlıklı, ankilozan spondilitli, sjögren sendromlu ve romatoid artritli her bir bireyin serumundaki CA ve modifiye CA otoantikor titreleri Hosoda ve ark. geliştirdiği ELISA yöntemiyle belirlendi.

Ölçümün tekrarlanabilirliğini görmek için CA I ve CA II izoenzimleri için intra CV (intra assay coefficients of variability) ve inter CV (inter assay coefficients of variability) değerleri hesaplandı. İnter CV değeri, aynı örnek farklı günlerde altı kez ölçülerek belirlendi. İnter CV değeri aynı örnek aynı çalışmada sekiz kez tekrarlanarak hesaplandı. Buna göre CA I için inter CV değeri 9.1, intra CV değeri 8.5 bulundu. CA II için ise inter CV değeri 10.1, intra CV değeri 9.2 olarak belirlendi.

6.5.1. CA I Otoantikor Titreleeri

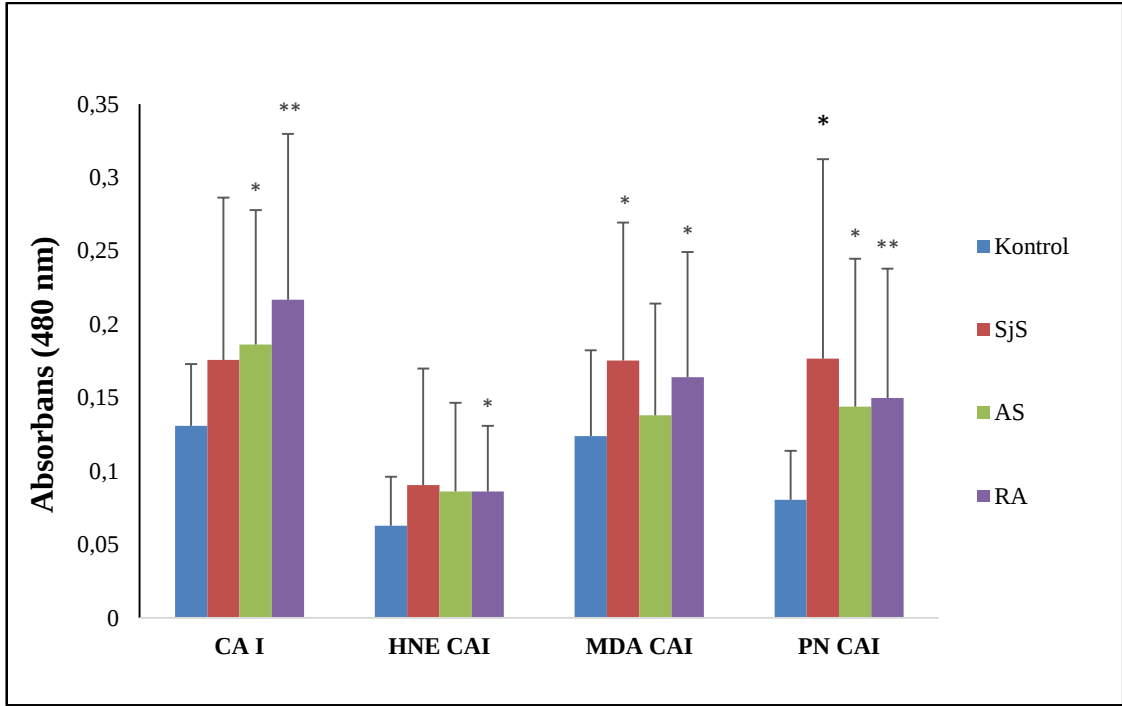
Bireylerdeki hem saf CA I hem de modifiye CA I'e karşı gelişen otoantikor titreleeri (Tablo 14) gösterildi. Saf CA I otoantikor titreleeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak AS hastalarında $p<0.05$ düzeyinde, RA hastalarında ise $p<0.001$ düzeyinde farklı bulundu (Şekil 20).

Tablo 14. Çalışma grubundaki bireylerin CA I otoantikor titreleeri

Antikor Titreleeri	Kontrol	SjS	p*	AS	p*	RA	p*
CA I	0.131 ± 0.042	0.175 ± 0.111	0.278	0.186 ± 0.092	0.015	0.217 ± 0.113	<0.001
HNE CAI	0.063 ± 0.033	0.091 ± 0.079	0.226	0.086 ± 0.061	0.088	0.086 ± 0.045	0.025
MDA CAI	0.124 ± 0.058	0.175 ± 0.094	0.007	0.138 ± 0.076	0.576	0.164 ± 0.085	0.041
PN CAI	0.081 ± 0.033	0.177 ± 0.136	<0.001	0.144 ± 0.101	0.007	0.150 ± 0.088	<0.001

*: p değerleri kontrol grubu ile ilgili grup arasındaki farkı göstermektedir.

HNE modifiye CAI otoantikor titreleeri kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak RA hastalarında $p<0.05$ düzeyinde farklı bulundu. MDA modifiye CA I otoantikor titreleeri SjS ve RA hastalarında istatistiksel olarak kontrol grubundan $p<0.05$ düzeyinde farklı bulundu. PN modifiye CAI otoantikor titreleeri bütün hasta gruplarında anlamlı derecede yüksektir. Bu fark SjS ve RA hastalarında $p<0.001$ düzeyinde iken AS hastalarında $p<0.05$ düzeyindedir.



Şekil 20. Bireylerdeki CA I formları otoantikor titreleri * Kontrol grubuna göre $p < 0.05$ düzeyindeki farkı göstermektedir. **Kontrol grubuna göre $p < 0.001$ düzeyindeki farkı göstermektedir.

RA ve SjS hastalarında saf CA I otoantikorları ile PN ve MDA modifiye CA I otoantikorları arasında pozitif korelasyon belirlendi (Tablo 15). AS hastalarında otoantikor titreleri arasında korelasyon bulunamadı.

Tablo 15. CA I ve modifiye CA I formları otoantikor titreleri arasındaki korelasyon tablosu

CA I Otoantikor Titreleleri	Modifiye CA I Otoantikor Titreleleri	
	MDA CAI	PN CA I
SjS	$r = 0.301$	$r = 0.299$
	$p = 0.047$	$p = 0.048$
RA	$r = 0.456$	$r = 0.326$
	$p = 0.004$	$p = 0.034$

6.5.2. CA II Otoantikor Titreleleri

Bireylerdeki hem saf CA II ve modifiye CA II otoantikor titreleri (Tablo 16) kendi kontrolleri ile karşılaştırılarak ifade edildi. CA II otoantikor titreleri kendi kontrol grubu

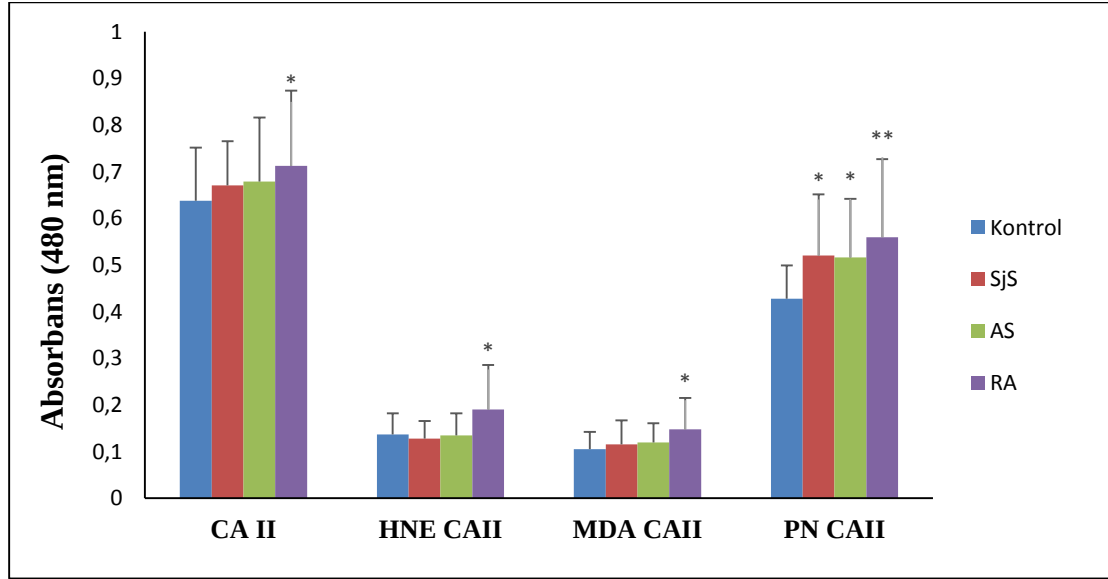
ile karşılaştırıldığında romatoid artritli hastalarda istatistiksel olarak ise $p<0.05$ düzeyinde farklı bulundu (Şekil 21).

Tablo 16. Çalışma gruplarındaki bireylerdeki CA II otoantikor titreleri.

Antikorlar	Kontrol	SjS	p*	AS	p*	RA	p*
CA II	0.638 ± 0.114	0.671 ± 0.094	0.071	0.678 ± 0.137	0.146	0.713 ± 0.161	0.027
HNE CAII	0.137 ± 0.046	0.128 ± 0.038	0.348	0.135 ± 0.047	0.863	0.190 ± 0.195	0.027
MDA CAII	0.105 ± 0.037	0.116 ± 0.052	0.461	0.120 ± 0.041	0.077	0.147 ± 0.067	0.008
PN CAII	0.428 ± 0.072	0.521 ± 0.130	0.001	0.516 ± 0.125	0.002	0.559 ± 0.167	<0.001

* :p değeri kontrol grubu ile ilgili grup arasındaki farkı göstermektedir.

PN modifiye CAII otoantikor titreleri bütün hasta gruplarında istatistiksel olarak kontrol grubundan farklı bulundu. Bu fark SjS ve AS hastalarında $p<0.05$ düzeyinde iken RA hastalarında $p<0.001$ düzeyindedir.



Şekil 21. Bireylerdeki CA II formları otoantikor titreleri. * Kontrol grubuna göre $p<0.05$ düzeyindeki farkı göstermektedir. **Kontrol grubuna göre $p<0.001$ düzeyindeki farkı göstermektedir.

Bireylerde saf CA II otoantikor titreleri ile modifiye CA II otoantikor titreleri arasındaki ilişki incelendi. AS hastalarında saf CA II otoantikor titreleri ile tüm modifiye CA II formları arasında pozitif korelasyon ($p=0.001$) bulundu RA hastalarında saf CA

II otoantikorları ile MDA ve PN modifiye CA II otoantikor titreleri arasında pozitif korelasyon belirlendi (Tablo 17).

Tablo 17. CA II ve modifiye CA II formları otoantikor titreleri arasındaki korelasyon tablosu

CA II Otoantikor Titreleeri	Modifiye CA II Otoantikor Titreleeri		
	HNE CA II	MDA CAII	PN CAII
AS	r=0.542	r=0.514	R=0.537
	p=0.001	p=0.001	p=0.001
RA		r=0.591	r=0.646
		p<0.001	p<0.001

6.6. Eritrosit Antioksidan Enzim Aktiviteleri

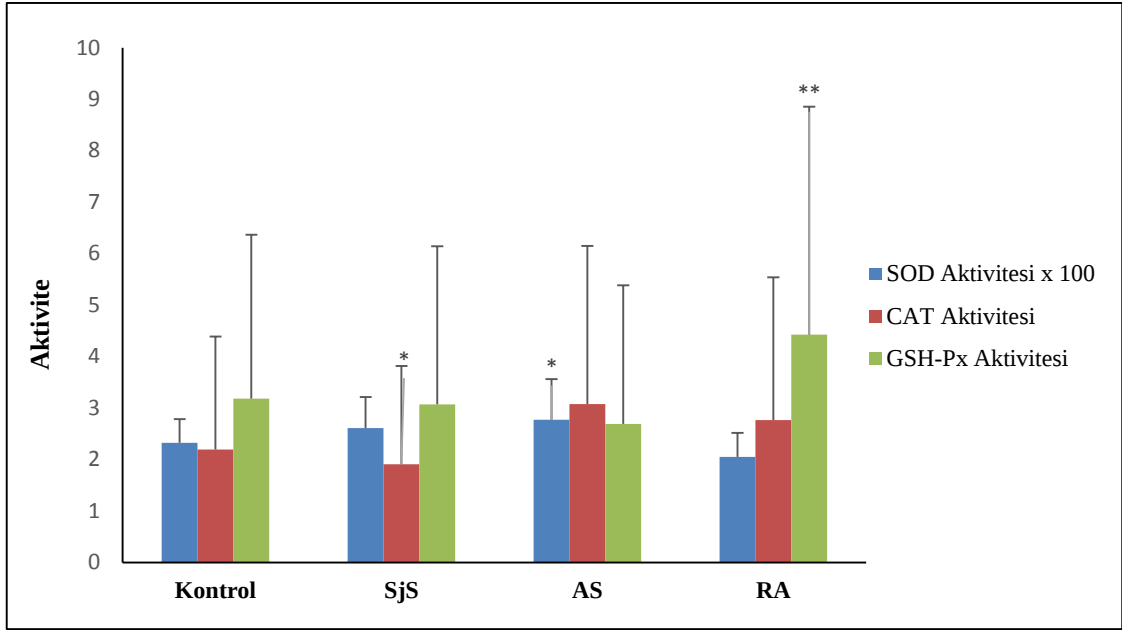
Antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri belirlendi. SOD aktivitesi, Sun ve Oberley metoduna, CAT aktivitesi Goth metoduna göre GSH-Px aktivitesi ise Cayman firmasına ait ticari kitle belirlendi. Elde edilen aktivite değerleri hemoglobin başına verildi (Tablo 18).

Tablo 18. SOD, CAT ve GSH-Px aktivite sonuçları

Gruplar	SOD Aktivitesi (U/g Hb)	p*	CAT (kU/g Hb)	p*	GSH-PX Aktivitesi (μmol/dak/g Hb)	p*
Kontrol	232.3 ± 46.1		4.85 ± 2.19		3.18 ± 0.72	
SjS	261.4 ± 60.2	0.182	3.26 ± 1.91	0.049	3.07 ± 1.22	0.984
AS	277.2 ± 79.0	0.011	5.05 ± 3.08	0.988	2.69 ± 1.32	0.376
RA	205.3 ± 46.6	0.22	4.01 ± 2.77	0.516	4.42 ± 1.62	<0.001

*: p değeri kontrol grubu ile ilgili grup arasındaki farkı göstermektedir.

AS hastalarında SOD aktivitesi kontrol grubundan $p<0.05$ düzeyinde, SjS hastalarında CAT aktivitesi kontrol grubundan aktivitesi $p<0.05$ düzeyinde ve RA hastalarında GSH-Px aktivitesi kontrol grubundan $p<0.001$ düzeyinde farklı bulundu (Şekil 22).



Şekil 22. Antioksidan enzim aktiviteleri.*Kontrol grubuna göre $p<0.05$ düzeyindeki farkı göstermektedir. **Kontrol grubuna göre $p<0.001$ düzeyindeki farkı göstermektedir.

6.7. Eritrosit MDA Seviyeleri

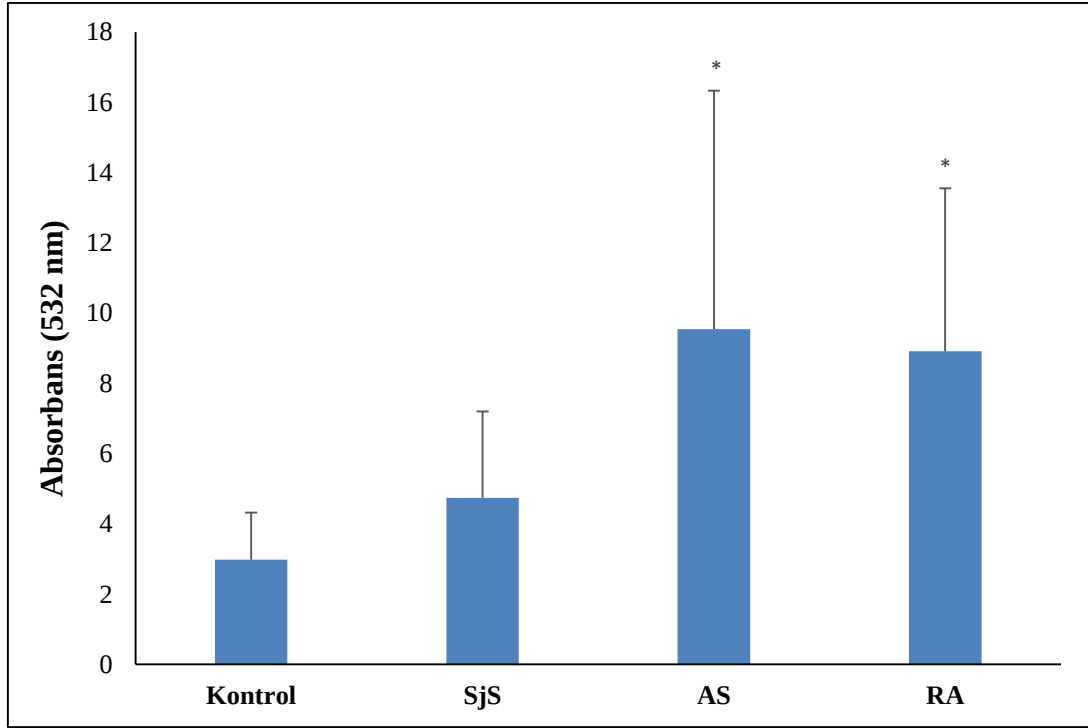
Eritrosit MDA seviyesi Stocks ve Dormandy metoduna gerçekleştirildi. Belirlenen MDA düzeyleri hemogloblin değerlerine bölünerek nmol/g Hb şeklinde ifade edildi. Sonuçlar Tablo 19’da ortalama ve standart sapma şeklinde verildi.

Tablo 19. Eritrosit MDA sonuçları

Grup	Eritrosit MDA (nmol/g Hb)	p*
Kontrol	2.99 ± 1.34	
SjS	4.74 ± 2.46	0.364
AS	9.55 ± 6.79	<0.001
RA	8.92 ± 4.64	<0.001

*: p değeri kontrol grubu ile ilgili grup arasındaki farkı göstermektedir.

Eritrosit MDA seviyesi AS ve RA hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$). SjS hastalarında MDA düzeyi yüksek olmasına karşın istatistiksel bir fark bulunamadı (Şekil 23)



Şekil 23. Eritrosit MDA sonuçları *Kontrol grubuna göre $p < 0.001$ düzeyindeki farkı göstermektedir.

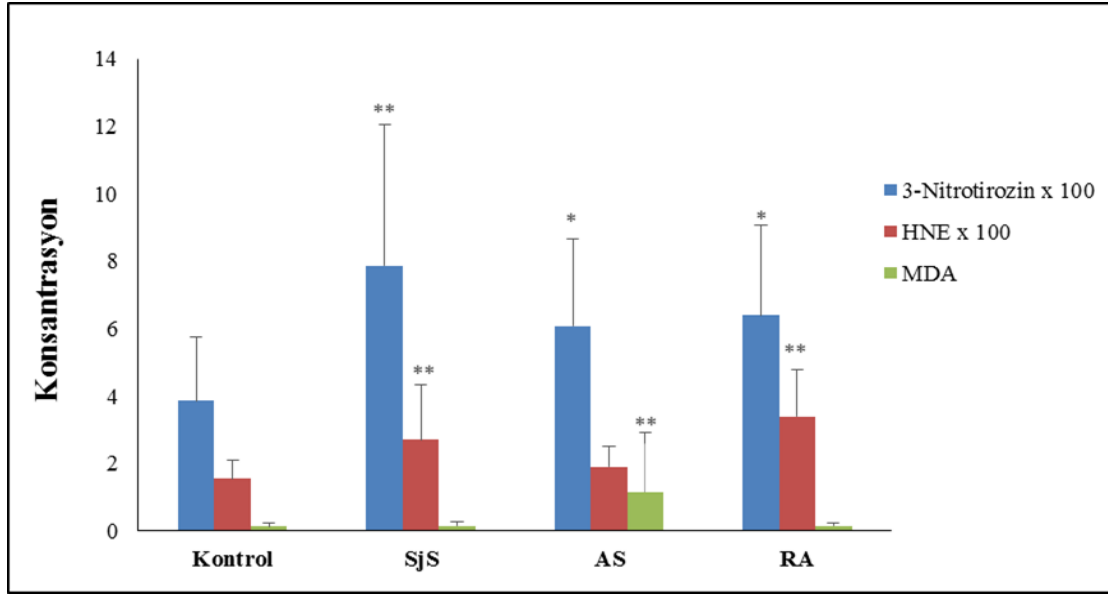
6.8. 3-Nitrotirozin, HNE ve Plazma MDA Seviyeleri

Plazma 3-nitrotirozin seviyesi E0738Hu katalog numaralı Bioassay Technology Laboratory firmasına ait ELİSA kiti, plazma 4-hidroksinonenal seviyesi 201-12-1979 katalog numaralı Sun Red firmasına ait ELİSA kiti ile belirlendi. Plazma Lipid peroksit seviyesi ölçümü Yagi yöntemiyle yapıldı.

Tablo 20. 3-NT, HNE ve plazma MDA düzeyler

Gruplar	3-Nitrotirozin (nmol/mL)	p*	HNE (pg/mL)	p*	Plazma MDA (nmol/mL)	p*
Kontrol	190.0 ± 190.0		155.4 ± 55.8		0.13 ± 0.10	
SjS	786.8 ± 416.5	<0.001	270.8 ± 161.2	<0.001	0.15 ± 0.16	0.869
AS	608.3 ± 257.7	0.012	190.3 ± 59.2	0.572	1.16 ± 1.76	<0.001
RA	639.3 ± 265.7	0.003	339.7 ± 137.1	<0.001	0.14 ± 0.10	0.694

*: p değeri kontrol grubu ile ilgili grup arasındaki farkı göstermektedir.



Şekil 24. HNE, 3-NT ve plazma MDA düzeyleri *Kontrol grubuna göre $p<0.05$ düzeyindeki farkı göstermektedir. **Kontrol grubuna göre $p<0.001$ düzeyindeki farkı göstermektedir.

Tüm oksidan parametreler kendi kontrollerinden konsantrasyon olarak yüksek bulundu (Tablo 20). İstatistiksel olarak bakıldığında 3-NT SjS hastalarında kontrol grubundan $p<0.001$ düzeyinde, AS ve RA hastalarında ise kontrol grubuna göre $p<0.05$ düzeyinde farklı bulundu. 4-HNE seviyeleri SjS ve RA hastalarında kontrol grubundan $p<0.001$ düzeyinde AS hastalarında kontrol grubundan $p<0.05$ düzeyinde farklı bulundu. Ayrıca plazma MDA seviyesi AS hastalarında kontrol grubundan $p<0.001$ düzeyinde farklı bulundu (Şekil 24).

Tablo 21. Oksidatif stres parametreleri ile CA I otoantikör titreleri arasındaki korelasyon tablosu

Hasta Grupları ve Parametreleri		Otoantikör Titreleri			
		CA I	HNE CA I	MDA CA I	PN CA I
3-NT					$r=0.391$
					$p=0.015$
RA	HNE	$r=0.318$	$r=0.346$	$r=0.410$	
		$p=0.033$	$p=0.024$	$p=0.009$	
SjS	HNE			$r=0.379$	
				$p=0.02$	

Hasta gruplarındaki saf CA I ve modifiye CA I otoantikor titreleri ile oksidatif parametreler arasındaki ilişki değerlendirildi. RA hastalarında HNE konsantrasyonu ile saf CA I, HNE ve MDA modifiye CA I otoantikorları arasında pozitif korelasyon belirlendi. Ayrıca 3-NT konsantrasyonu ile PN modifiye CA I otoantikorları arasında da pozitif korelasyon bulundu. SjS hastalarında ise HNE konsantrasyonu ile MDA CA I otoantikorları arasında pozitif korelasyon belirlendi (Tablo 21).

Hasta gruplarında saf CA II ve modifiye CA II otoantikor titreleri ile oksidatif parametreler arasındaki ilişki değerlendirildi (Tablo 22) .

Tablo 22. Oksidatif stres parametreleri ile CA II otoantikor titreleri arasındaki korelasyon tablosu

RA Hastalarında	Otoantikorları Titreleri			
	CA II	HNE CAII	MDA II	PN CAII
3-NT				r=0.358 p=0.024
HNE	r=0.569 p<0.001	r=0.333 p=0.031	r=0.429 p=0.006	

RA hastalarında 3-NT düzeyi ile PN modifiye CA II otoantikorları arasında pozitif korelasyon belirlendi. Ayrıca HNE düzeyi saf CA II, HNE ve MDA modifiye CA II otoantikor titreleri arasında pozitif korelasyon bulundu (Tablo 22).

6.9. İnflamatuvar Sitokinler

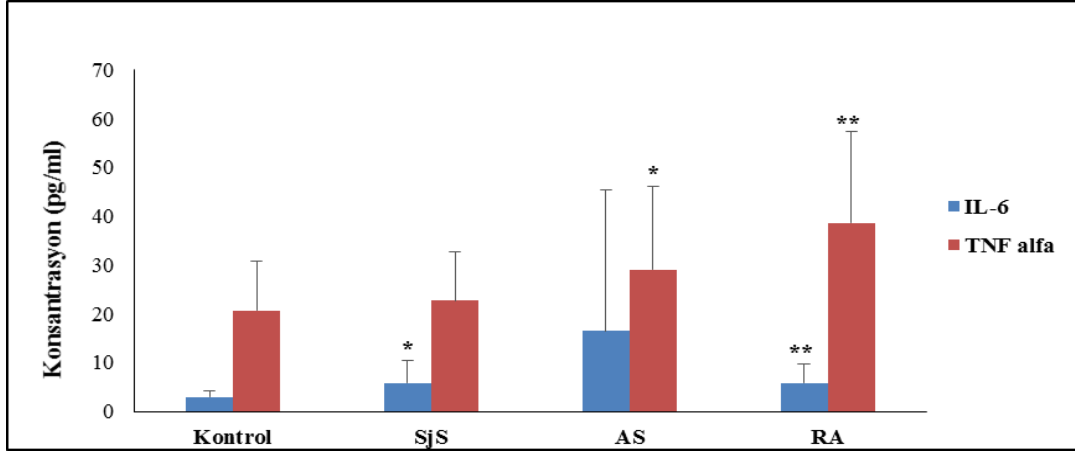
Plazma TNF- α seviyesi KAP1751 katalog numaralı Dia Source firmasına ait ELİSA kiti ile ölçüldü. Plazma IL-6 seviyesi BMS213/2 referans numaralı eBioscience firmasına ait ELİSA kiti ile ölçüldü. Sonuçlar Tablo 23’de ifade edildi.

Tablo 23. TNF- α ve IL-6 seviyeleri

Gruplar	IL-6 (pg/mL)	p*	TNF alfa (pg/mL)	p*
Kontrol	2.95 $\pm$ 1.18		20.66 $\pm$ 10.20	
SjS	5.78 $\pm$ 4.77	0.011	22.74 $\pm$ 10.04	0.250
AS	16.48 $\pm$ 28.84	0.101	29.04 $\pm$ 16.94	0.025
RA	5.83 $\pm$ 3.81	<0.001	38.59 $\pm$ 18.69	<0.001

*: p değeri kontrol grubu ile ilgili grup arasındaki farkı göstermektedir.

IL-6 seviyesi SjS hastalarında kontrol grubundan $p<0.05$ düzeyinde RA hastalarında ise kontrol grubuna göre $p<0.001$ düzeyinde farklıdır. TNF- α seviyeleri AS hastalarında kontrol grubundan $p<0.05$ düzeyinde RA hastalarında ise kontrol grubundan $p<0.001$ düzeyinde farklı bulunmuştur (Şekil 25).



Şekil 25. İnflamatuvar sitokinler.*Kontrol grubuna göre $p<0.05$ düzeyindeki farkı göstermektedir.**Kontrol grubuna göre $p<0.001$ düzeyindeki farkı göstermektedir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbonik anhidraz hemen hemen tüm organizmalarda bulunan, memelilerde oldukça geniş doku dağılımına sahip bir metaloenzimdir. CO₂'in hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizleyerek vücutta asit-baz dengesinin sağlanması, kardiyovasküler tonusun düzenlenmesi, kemik resorpsiyonu gibi birçok fizyolojik süreçte ve tümör oluşumu gibi patolojik süreçlerde rol almaktadır (2, 125).

16 izoformu bulunan karbonik anhidrazın üzerinde en fazla çalışma yapılan izoformları CA I ve CA II'dir. Bu izoformlar sitozolik proteinlerdir (Bkz. Tablo 1) ve eritrositler, böbrek, göz, salgı bezleri, kemik, karaciğer gibi çok geniş bir doku dağılımına sahiptir (18). Bu hücrel yerleşimi, üstlendiği görevler ve geniş doku dağılımından dolayı CA I ve CA II birçok molekülle etkileşmektedir dolayısıyla vücutta hedef bir molekül haline gelmektedir.

SLE, SjS, RA gibi birçok otoimmün ve idiyopatik hastalıkta da CA izoenzimlerine karşı otoantikor gelişmektedir (3, 5, 6, 52, 76, 81-88). Ayrıca hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda insan CA II immünizasyonu ile otoimmün sialoadenitis, immün aracılıklı kolongit ve pankreatit oluşturulmuştur (1, 4). Ancak bugüne kadar CA otoantikorlarının oluşumuna yönelik kesin bir mekanizma ortaya konulamamıştır. Bununla beraber Fuji ve ark. (10) 2007 yılında SOD geni çıkarılmış farelerde yaptıkları çalışmada, eritrositlerde artmış oksidatif strese bağlı olarak CA II'ye karşı antikor oluştuğunu ve bu antikor oluşumunun N-asetilsistein kullanımı ile azaldığını göstermişlerdir (108). Anabilim dalımızda da CA ve CA otoantikorları ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda endometriozis, Grave's, böbrek hastalıkları ve romatoid artrit gibi hastalıklarda CA otoantikorları belirlenmiştir (6, 7, 8, 126, 127). Yapılan çalışmada, RA hastalarında CA otoantikor titreleri ile SOD aktivitesi arasında negatif korelasyon ($r = -0.430$, $p = 0.006$) belirlenmiştir (6). Bu çalışmaların sonucunda antioksidan savunmanın zayıflaması ya da oksidan moleküllerin artışının CA'ya karşı otoantikor oluşumunu tetikleyebileceğini düşündürmektedir.

Serbest radikaller vücutta bazal seviyede üretilmekte ve antioksidanlar tarafından bir dengede tutulmaktadır. Serbest radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında düşme sonucunda oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Her iki durumda da ortamda radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi bir

dengelesizlik oluşmaktadır (37). Artan oksidanlar ya da ROS/RNS dokularda harabiyete, proteinler, nükleik asitler, yapısal karbohidratlar ve lipidler gibi birçok biyomolekülün hasarına sebep olabilmektedir. ROS'ının lipidlerle reaksiyonu bu moleküllerin oksidatif yıkımına sebep olmaktadır. Lipid peroksidasyonu denilen bu olay daima reaktif aldehit yan ürünlerinin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Bu aldehit ürünlerinin en önemlileri ve üzerinde çalışma yapılmış olanları MDA ve HNE'dir (128). Ayrıca oksidatif stres bir RNS olan peroksinitrit düzeyini de arttırmaktadır. Bu moleküller, hücreye oluşmalarına sebep olan radikallerden çok daha fazla zarar verebilmektedir. Radikal yapıda olmamalarına rağmen oldukça reaktif moleküllerdir. Radikallere göre daha uzun ömürlüdürler, membranlardan geçip daha uzak noktalarda da benzer hasarı oluşturabilmektedirler. ROS/RNS doğrudan ya da HNE, MDA, PN gibi moleküllerle dolaylı olarak biyomoleküllerle etkileşerek onların oksidatif modifikasyonlarına sebep olmaktadır (62, 128, 129).

Oksidatif modifikasyonlardan proteinler değişik şekillerde etkilenmektedir. Polipeptit zincirlerinin fragmentasyonu ile düşük molekül ağırlıklı ürünler oluşturabilmekte veya protein-protein çapraz bağları ile yüksek molekül ağırlıklı ürünlere dönüşebilmektedir. Meydana gelen oksidatif değişiklikler proteinlerin üç boyutlu yapısını değiştirerek hücrede önemli roller üstlenen proteinlerin fonksiyonlarını etkileyebilmektedir. Bunun sonucunda protein agregasyon ve fragmentasyon hızında artış, enzim aktivitesinde azalma, protein fonksiyonlarında azalma, proteaz inhibitör aktivitesinde kayıp, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozda bozulma, gen transkripsiyonunda değişiklik, immünojenik aktivitede artış görülebilmektedir (42-46, 128).

Oksidatif stres sonucu ROS/RNS doğrudan kendisi proteinler üzerinde oksidatif modifikasyona sebep olabileceği gibi glikozilasyon ve ileri glikozilasyon son ürünleri (AGE) ile de modifikasyon gerçekleştirebilmektedir. Ayrıca HNE, MDA, akrolein gibi ileri peroksidasyon son ürünleri (ALE) ile de proteinler üzerinde modifikasyonlar gerçekleştirebilmektedir (130, 131). Bu modifikasyonlar proteinlerin yapılarını, fonksiyonlarını ve antijenik özelliklerini değiştirebildiği bilinmektedir (128). HNE, MDA ve PN oksidatif stres sonucu oluşan en baskın yan ürünlerdir. Aynı zamanda oksidatif stresin belirteçleri olarak ölçülmektedir. Bu yan ürünler protein zincirlerindeki farklı amino asitlerle etkileşmektedir. HNE ve MDA başlıca sistein, lizin ve histidin amino

asitlerine kovalent olarak bağlanmaktadır (48). Protein zincirindeki bu aminoasitler genellikle katalizle ilgili olaylarda görev aldıklarından proteinlerin bu gruplar üzerinden modifikasyonu büyük oranda enzimin inaktivasyonu ve çeşitli hastalıkların gelişimi ile ilişkilidir. Örneğin, beyinde lipid peroksidasyon ürünü reaktif aldehytlerle Na⁺-K⁺ ATPaz ve glukoz tranportırlarının (GLUT3) inaktivasyonu nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Adipositlerdeki FABP'nin sistein rezidüsü (Cys117) üzerinden 4-HNE ile modifikasyonu (epitel hücrelerindeki izoformu gibi) proteinin yağ asitlerine olan ilgisini azaltır ve insülin direnci ilişkili obeziteye sebep olabilmektedir. Taşıyıcı molekülleri özellikle albümini sistein ve histidin rezidüleri üzerinden modifiye edebilmektedir. Eritrositlerdeki spektrin, karbonik anhidraz gibi birçok molekülde HNE'nin kovalent modifikasyonuna maruz kalmaktadır (128, 132-134).

HNE ve MDA'dan farklı olarak PN protein zincirinde başta tirozin olmak üzere metiyonin, sistein ve triptofan rezidüleri etkileşebilmektedir (135). Bu hedef moleküller CA üzerinde daha çok enzimin dış etkileşime açık bölgelerinde yerleşmişlerdir ve aktif bölgeye yakın olanları da bulunmaktadır (136). Enzimlerin genellikle inaktivasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir. Nitrik oksit sentetaz, akonitaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, ornitin karboksilaz, tirozin hidroksilaz, Mn-süperoksit dismutaz, kreatin kinaz, ksantin oksidaz, karbonik anhidraz bunlara örnek olarak verilebilir (137-145).

Maggi ve ark. (146) yaptıkları çalışmada, tavşan ve farelerin okside LDL partikülleri ile immünizasyonu sonucunda MDA ve 4-HNE modifiye LDL epitoplarına karşı antikor geliştiği belirlenmiştir. Başka bir çalışmada Ox-LDL ve MDA-LDL antikorlarının ateroskleroz gelişimini hızlandırdığı ifade edilmiştir (147). Ayrıca alkolik karaciğer hastalığında oksidatif ürünlerce modifiye edilmiş antijenlerin immün cevap oluşumunu uyarmaktadır (148). Scofield ve ark.(149) yapmış oldukları çalışmada HNE-modifiye lupus ilişkili 60 kDa-Ro proteini ile tavşanların immünizasyonu sonucunda HNE'nin bu moleküle antijenik özellik kazandırdığı fakat anti-HNE antikorlarının non-spesifik olarak bu moleküllere bağlandığı gösterilmiştir. Khan ve ark. (150) yapmış oldukları çalışmada tavşanları peroksinitrit modifiye-H2A (histon proteinlerinin) ile immünize ettiklerinde otantikor titrelerinin yükseldiğini ve bunun protein nitrotirozin seviyesi ile orantılı olduğunu belirlemişlerdir. Histon proteinlerinin (H2A) peroksinitritle muamelesinin protein üzerindeki tirozin moleküllerinin nitratlanmasına, protein karbonil gruplarının ditirozin ve çapraz bağların oluşmasına sebep olduğunu göstermişlerdir. Bu

şekilde proteinlerin nitratlanması moleküllerin çapraz bağlanmalarına ve agregasyonuna sebep olmaktadır. Doğal yapının bu şekilde kaybedilmesi immün cevabı tetiklemektedir.

Oksidatif stresin CA'ya karşı otoantikor oluşumunu tetiklendiğini ifade eden çalışmalar bulunmaktadır (10). Fakat CA otoantikorlarının oluşumunda oksidatif stres sonucu oluşan yan ürünlerin etkisine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Buradan hareketle ilk olarak bu çalışmada HNE, MDA ve PN 'in CA antijenitesine etkisinin incelenmesi amaçlandı. Çalışmamızda CA izoenzimleri arasında CA otoantikorlarıyla ilgili üzerinde en fazla çalışma yapılmış olan CA I ve CA II izoenzimleri kullanıldı. Bu izoenzimlerin eritrositlerden izolasyonu CA inhibitörü olan sülfanilamidin kullanıldığı afinite kromatografisi ile gerçekleştirildi. İzole edilen CA I ve CA II izoenzimlerinin saflığı SDS-PAGE ile teyit edildi (Bkz. Resim 2). Elde edilen görüntüdeki 30 kDa civarındaki tek bant elde edilen maddenin molekül ağırlığı yaklaşık 30 kDa CA enzimi olduğunu göstermektedir. Bu izoenzimlerin hidrataz aktiviteleri ölçüldüğünde CA I ile aynı konsantrasyondaki CA II izoenziminin aktivitesinin yaklaşık 9 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Bu veriler CA izoenzimlerinin saf ve doğru bir şekilde elde edildiğini göstermektedir.

İkinci olarak oksidatif stres sonucu oluşan ve oksidatif stresin belirteci olarak da kullanılan HNE, MDA ve PN'nin CA antijenitesine etkisini incelemek için öncelikle izole edilen CA I ve CA II izoenzimleri HNE, MDA ve PN ile modifiye edildi. Bu modifikasyonların gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için HNE-protein, MDA-protein ve 3-NT gruplarına spesifik antikorları kullanarak hazırlanan modifiye ve saf CA izoenzimlerine western blot uygulandı. Elde edilen görüntülerden (Bkz. Resim 3, Resim 4, Resim 5) modifikasyonların gerçekleştiği ve oksidatif sekonder ürünlerin konsantrasyonuna bağlı olarak modifikasyonun arttığı belirlendi. Elde edilen bu maddelerden modifikasyonun en fazla olduğu formlarla Balb-c fareler immünize edildiğinde bütün formların antijenik özelliğe sahip olduğu ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında antikor titreleri arasında ($p < 0.001$) istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi (Bkz. Tablo 12, Tablo 13). Bu veriler Balb-c türü farelerde CA I ve CA II izoenzimleri ile bunların HNE, MDA ve PN modifiye formlarının antikor oluşumuna sebep olduğunu göstermektedir. Bu nedenle hem CA izoenzimleri hem de modifiye CA formları antijenik özelliğe sahiptir. Modifikasyonun antijenik özelliğe etkisi

değerlendirildiğinde PN modifikasyonları hem CA I hem de CA II izoenzimlerinin antijenitesini arttırırken HNE ve MDA modifikasyonları azaltmıştır.

CA I 260 aminoasitlik bir proteindir, yapısında 18 Lys, 11 His, 1 Cys, 8 Tyr, 11 Phe, 6 Trp ve 2 Met bulunmaktadır. CA II de 260 aminoasitlik bir proteindir yapısında 24 Lys, 12 His, 2 Cys, 8 Tyr, 12 Phe, 7 Trp ve 2 Met bulundurmaktadır (151, 152). Yapıda hedef amino asitlerin bulunması ve sayısı kadar bunların yerleşimi de çok önemlidir. CA üzerinde PN için hedef amino asitler olan tirozin, triptofan, metiyonin gibi aminoasit rezidüleri sayıca fazla olmasa da daha çok yüzeyde yerleşmişlerdir (136). Bu nedenle PN modifikasyonu antijeniteyi arttırmıştır. Histidin sistein ve lizin daha çok enzimlerde katalitik aktiviteden sorumlu aktif bölgelerde bulunmaktadır (153). Bu amino asitlerden CA I'de His^{65, 68, 95, 97, 120, 201} aktif bölgede katalitik aktivitede görev alırken, CA II'de His^{64, 94, 96 119} ve Lys¹²⁷ aktif bölgede katalitik aktiviteden sorumludur (151, 152). Bu nedenle HNE ve MDA modifikasyonu antijeniteden çok aktiviteyi etkilemiş olabilir.

Oksidatif stres ve oksidatif stres sonucu oluşan ürünlerle ateroskleroz, diyabet, yaşlanma, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok olayın patofizyolojisi arasında ilişki olduğu bilinmektedir (128). Etiyolojileri tam bilinmemesine rağmen oksidatif stresin SjS, RA ve AS hastalıklarının patolojisinde de etkili olduğu düşünülmektedir. Bu hastalıklar immün aracılıklı inflamatuvar romatoid hastalıklardır (15). Ayrıca birçok antijene karşı gelişmiş antikorlar bu hastalıklarda belirlenmiştir (154-156). SjS'de organ spesifik ve organ spesifik olmayan çok sayıda otoantikor varlığı ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Anti SSA/Ro ve anti SSB/La antikorları, romatoid faktör, karbonik anhidraz antikorları, antinükleer antikorlar gibi organ spesifik olmayan, nükleer veya sitoplazmik antijene karşı gelişmiş bir dizi otoantikor SjS hastalarının serumlarında belirlenmiştir (5, 157).

RA, hastalarının büyük bir kısmında posttranslasyonel modifikasyona uğramış proteinlere karşı otoantikorlarının varlığı ile karakterizedir. Anti-sitruline protein antikorları, antiperinükleer faktör (APF), antikeratin antikorları (AKA), antifilagrin bunların bazılarıdır. Ayrıca RA hastalarında CA I, II, III ve IV izoenzimlerine karşı gelişmiş otoantikorlar belirlenmiştir (6, 13, 81, 100) AS immün aracılıklı bir hastalık olmasına karşın otoantikor oluşumu zayıftır. Yine de bu hastalığa sahip kişilerde anti-nötrofil sitoplazmik antikorları (ANCA), anti-lökosit antikorları ve kollajen I, II, III, IV

ve V proteinleri gibi ekstraselüler matriks bileşenlerine karşı gelişmiş antikorlar belirlenmiştir fakat hastalığın şiddeti ile korelasyon göstermemektedir (11, 158-160).

Bu çalışmada ikinci olarak otoantikor oluşumunun yaygın olduğu SjS, orta düzeyde olduğu RA ve zayıf olduğu AS hastalarında CA I, CA II ve modifiye CA otoantikor düzeyleri, oksidan-antioksidan durum ve bu parametreler arasındaki ilişki incelendi. AS, RA ve SjS hastalarında CA ve modifiye CA otoantikor titreleri ELİSA yöntemiyle belirlendi. PN modifiye CA I ve CA II otoantikor titreleri her üç hastalıkta da kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Ayrıca RA hastalarında kontrol grubuna göre CA I ve CA II otoantikor titreleri ve modifiye CA otoantikor titreleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi (Bkz. Tablo14, Tablo 16). RA ve SjS hastalarında CA II'ye karşı otoantikor varlığı gösteren çalışmalar bulunmaktadır ve yaptığımız çalışmada bu verileri desteklemektedir (6, 80). Fakat literatürde SjS, RA ve AS hastalarında modifiye CA otoantikorlarının varlığı ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Hastalarda oksidan-antioksidan durumun değerlendirilebilmesi için eritrosit SOD, CAT, GSH-Px aktiviteleri ve MDA seviyesi ile plazmada HNE, 3-NT ve MDA seviyeleri ölçüldü. RA ve AS hastalarında eritrosit MDA seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($p<0.001$) bulundu (Bkz. Tablo 19). RA da GSH-Px, AS'de SOD aktiviteleri anlamlı derecede yüksekken SjS de CAT aktivitesi anlamlı derecede düşüktür (Bkz. Tablo 18, Şekil 22). Bu parametrelerle otoantikor titreleri arasında korelasyon bulunmamaktadır.

Özellikle RA gibi romatizmal hastalıklarda inflamatuvar artritlerde oksidatif stresin büyük rolü bulunmaktadır. Bu tür hastalarda antioksidan sistem zayıflarken oksidan parametrelerin düzeyinde artış olmaktadır (154). AS hastalarında oksidan antioksidan parametrelerde belirgin değişim olmadığı yalnızca serum CAT aktivitesi ile hastalık arasında sıkı bir ilişki olduğu ifade eden çalışmalar yanında oksidan moleküllerin arttığını gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (155, 161). Bu çalışmada da AS hastalarında benzer şekilde antioksidan enzim aktivitesinde çok zayıf bir değişim bulundu RA hastaların yapılan çalışmaların çoğu özellikle SOD aktivitesinin de düşüş olduğunu bazıları ise değişim bulunmadığını göstermiştir (6, 154, 162, 163). Bu çalışmada da SOD aktivitesinin de bir değişim bulunamadı.

Bu çalışmada da PN düzeyinin göstergesi olarak 3-NT seviyesi ELİSA metoduyla belirlendi. 3-NT konsantrasyonu hasta gruplarının üçünde de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (SjS için $p<0.001$, AS ve RA için $p<0.05$). Ayrıca RA hastalarına 3-NT konsantrasyonu ile PN CA I ve PN CA II otoantikor titreleri arasında pozitif korelasyon belirlendi (sırasıyla $r=0.391$, $p=0.015$; $r=0.358$, $p=0.024$). HNE seviyesi SjS ve RA hastalarında anlamlı derecede yüksek ($p<0.001$), plazma MDA seviyesi ise AS hastalarında anlamlı derecede yüksektir (Tablo 20, Şekil 24). Hasta gruplarında özellikle RA da oksidan parametrelerle otoantikor düzeyleri arasında korelasyon bulundu (Bkz. Tablo 21, Tablo 22). Hasta grupları kontrolle karşılaştırıldığında antioksidan seviyede belirgin bir fark bulunmazken oksidan seviye yüksek bulundu. Yapılan çalışmalarda RA'lı hastaların sinovyal sıvılarında hastalığın ilerleyişine bağlı olarak 3-NT düzeyi de artmaktadır ayrıca benzer çalışmalar RA gibi inflamatuvar hastalıklarda nitratlanmış proteinlerin bulunduğu ifade etmektedir (128, 164, 165). Ayrıca anabilim dalımızda da yapılan bir çalışmada CA enzimine peroksinitrit muamelesinin CA aktivitesini etkilediği ifade edilmiştir (37, 136). Bizde çalışmamızda RA hastalarının plazmalarında 3-NT seviyesinin arttığı ve bunların PN CA otoantikorları ile korelasyon gösterdiğini belirledik..

SjS'de oksidatif stresin arttığı DNA hasarının görüldüğü, protein oksidasyonunun da 3-NT ve GSH seviyelerinde önemli değişikliklerin olduğu belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonuna bağlı membran hasarının arttığı ve lipid peroksidasyon ürünlerinde de artış olduğu ifade edilmektedir (156, 166).

Yapılan çalışmalarda 3-nitrotirozin seviyesi peroksinitritin organizmada ve proteinlerde meydana getirdiği hasarın belirteci olarak kullanılmıştır ve kullanılmaya devam etmektedir (167-172).

SjS, RA ve AS inflamatuvar hastalıklardır. Bu hastalıkların gelişimin de inflamatuvar sitokinlerin etkisi olduğu ifade edilmektedir (108) . Bu nedenle bu çalışmada hasta gruplarında inflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve TNF- α düzeyi belirlendi. RA'da kontrol grubuna göre her iki sitokinde istatistiksel olarak yüksek bulunurken ($p<0.001$) AS de TNF- α , SjS de ise IL-6 ($p<0.05$) yüksektir (Bkz. Tablo 23 Şekil 25). Bireylerdeki otoantikor titreleri ile sitokinler arasında belirgin korelasyon bulunamadı.

Sonuç olarak CA nın HNE MDA PN modifikasyonları CA ya karşı oluşan immün cevabı etkilemektedir. Bu modifikasyonlar içerisinde özellikle PN modifikasyonu hem deney hayvanlarında hem de çalışmamızdaki hasta gruplarındaki bireylerde en yüksek immün cevaba sahiptir. Bu yükseklik moleküllerin etkileştiği aminoasitlerin farklılığından ve bu hedef amino asitlerin CA zerindeki yerleşim farkından kaynaklanabileceği kanaatine varılmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Sly SW, Hu YP (1995). Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual Reviews of Biochemistry*. 64: 375-401.
2. Pastarekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran TC (2004). Carbonic anhydrases: Current State of the art, therapeutic applications and future prospects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 19: 199-229.
3. Nishimori I, Brattonova T, Toshkov I, Caffrey T, Mogani Y, Shibata Y (1995). Induction experimental autoimmune sialoadenitis by immunization of PL/J mice with carbonic anhydrase II. *Journal of Immunology*. 154: 4865-4873.
4. Ueno Y, Ishii M, Takahashi T, Toyota T, Larusso NF (1995). Different susceptibility of mice to immune-mediated cholangitis induced by immunization with carbonic anhydrase II. *Laboratory Investigation*. 78: 629-637.
5. Inagaki Y, Jinno-Yoshida Y, Ueki H (1991). A novel autoantibody reactive with carbonic anhydrase in sera from patients systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Journal of Dermatological Science*. 2: 147-54.
6. Alver A, Şentürk A, Çakırbay H, Menteşe M, Gökmen F, Keha EE, Uçar F (2012). Carbonic anhydrase II autoantibody and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*. 44: 1385-1389.
7. Alver A, Menteşe A, Karahan SC, Erem C, Keha EE, Arıkan MK, Eminağaoğlu MS, Deger O (2007). Increased serum anti-carbonic anhydrase II antibodies in patients with Graves' disease. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 115: 287-291.
8. Alver A, Menteşe A, Menteşe Ü, Sümer A, Uçar F, Altay DU (2014). Anti-Carbonic Anhydrase II Antibodies in End-Stage Renal Disease Patients. *Medical Principles and Practice*. 23: 331-335.
9. Caia Z, Yanb LJ (2013). Protein oxidative modifications: Beneficial roles in disease and health. *Journal of Biochemical Pharmacology Research*. 1: 15-26.
10. Fujii J, Iuchi Y, Okada F, Onuma K, Onoda T, Asao H, Kobayashi M (2007). Elevated oxidative stress in erythrocytes due to a SOD1 deficiency causes anaemia and triggers autoantibody production. *Biochemical Journal*. 402: 219-227.

11. Chiappelli F (2011). Osteoimmunopathology: Evidence-Based Perspectives from Molecular Biology to Systems Biology. Springer Newyork Dordrecht Heiderberg London. Doi:10.1007/978-1-4419-9495-0.
12. Routsias JG, Tzioufas AG (2007). Sjögren's Syndrome - Study of Autoantigens and Autoantibodies: Clinical Reviews in Allergy & Immunology. 32: 238–251.
13. Trouw LA, Huizinga TWJ, Toes REM (2012). Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens—common principles. Clinical and epidemiological research Supplement. Annals of the Rheumatic Diseases. 72: 132-136.
14. Fox R (2005). Sjögren's syndrome. Lancet. 366: 321–31.
15. Soy M (Edt.) (2007). Otoimmünite ve otoimmün hastalıklar. Harrison Romatoloji. Nobel Tıp Kitabevleri. 16. Baskı. 59-66.
16. Krane SM, Simon L (1986). Rheumatoid arthritis: clinical features and pathogenic mechanism. The Medical Clinics of North America. 30: 263-283.
17. Pocker Y (1991). Molecular control of carbonic anhydrase activity: ionic effectors, differential modifiers and novel inhibitors. In the carbonic anhydrase from biochemistry and physiology and Clinical medicine. Botre F, Storey BT, Gros G (Eds.) Wienheim, VCH Publishers.75-85.
18. Supuran CT (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. Nature Reviews, Drug Discovery. 7: 1-12.
19. Supuran CT, Scozzafava A (2007). Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry: Bioorganic & Medicinal Chemistry. 15: 4336–4350.
20. Simone GD, Scozzafava A, Supuran CT (2009). Which carbonic anhydrases are targeted by the antiepileptic sulfonamides and sulfamates? Chemical Biology & Drug Design. 274: 317-32.
21. Supuran CT (2008). Carbonic anhydrases-an overview. Current Pharmaceutical Design. 14: 603-614.
22. Robyt JF, White BJ (1990). Biochemical techniques Theory and Practise. Press Inc. 95.
23. Maren TH, Jankowska I, Sanyal G, Edelhauser HF (1983). The transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion. Experimental Eye Research. 33: 457.

24. Epstein DL, Grant WM (1977). Carbonic anhydrase inhibitors side effects; serum chemical analysis. Archives of Ophthalmology, 85: 1387.
25. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA (2010) Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. Toxicologic Pathology. 38: 96-109.
26. Sies H (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. Wiener klinische Wochenschrift. 69: 965-968.
27. Benzer FOST (2003). Fasciola Hepaticale Enfekte Koyunlarda Lipit Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science. 27: 657-661.
28. Harris ED (1992). Regulation of antioxidant enzymes. The FASEB Journal 6: 2675-2683.
29. Barbor DA, Harris SR (1994). Oxygen free radicals and antioxidants: a review. Journal of the American Pharmaceutical Association. 34: 26-35.
30. Eu JP, Liu L, Zeng M, Stamler JS (2000). An apoptotic model for nitrosative stress. Biochemistry. 39: 1040-1047.
31. Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA (2005). Extracellular superoxide dismutase. International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 37: 2466-2471.
32. McCord JM, Edeas MA (2005). SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. Biomedicine & Pharmacotherapy. 59: 139-142.
33. Akkuş İ (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Birinci baskı. Mimoza Yayınları. 17.
34. Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulletin. 49: 481-93.
35. Halliwell B (1996). Cellular stress and protection mechanisms. Biochemical Society Transactions. 24: 1023-1027.
36. Yalçın AS (1998). Antioksidanlar. Klinik Gelişim II. 342-346.
37. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2003). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics Mass Spectrometry Reviews. 24: 55- 99.
38. Azzi A (2007). Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 362: 230-232.

39. Catala A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*. 157: 1-11.
40. Halliwell B, Aruoma OI (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*. 281:289.
41. Akpoyraz M, Durak İ (1995). Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası*. 48: 253-261.
42. Gülbahar Ö (2007). Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişkisi. *Turkish Journal of Geriatrics*. 10: 43-48.
43. Kayalı R, Çakatay U (2004). Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 35: 83-89.
44. Büyükgüzel E (2013). Protein oksidasyonun biyokimyasal ve moleküler mekanizması. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*. 3: 40-51.
45. Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R (2008). Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology*. 153: 6-20.
46. Baykal Y, Kocabalkan F (2000). Serbest radikaller ve hücre hasarı. *Sendrom*. 9:319.
47. Kavas G.(1989)Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*. 9: 1-8.
48. Delibaş N, Özcankaya R (1995). Serbest radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2: 11-17.
49. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A (1992). Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *The Journal of Biochemistry*. 286: 607-11.
50. Uchida K (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*. 42: 318-343.
51. Ayala A, Munoz MF, Argüelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism and signalling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. ID:360438: 31.

52. Schaur RJ (2003). Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine*. 24: 149-159.
53. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G (2008). 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of Medical interest. *Medical Research Reviews*. 28: 569-631.
54. Dubinina EE, Dadali VA (2010). Role of 4-hydroxy-trans-2-nonenal in cell function. *Biochemistry (Moscow)*. 75: 1069-1087.
55. Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L (2013). Cell death and diseases related to oxidative stress:4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death and Differentiation*. 20: 1615-1630.
56. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N, (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 15: 316-328.
57. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 327: 593-615.
58. Colasanti M, Suzuki H (2002). The dual personality of NO. *Trends in Pharmacological Sciences*. 21: 249-252.
59. Beckman JS & Koppenal WH (1996). Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite, the good, the bad and the ugly. *American Journal of Physiology*. 271: 1424-1437.
60. Beckman JS (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chemical Research in Toxicology*. 836-844.
61. Richeson CE, Mulder P, Bowry VW, Ingold KU (1998). The complex chemistry of peroxynitrite decomposition: new insights. *Journal of the American Chemical Society*. 120: 7211-7219.
62. Kamat JP (2006). Peroxynitrite: a potent oxidizing and nitrating agent. *Indian journal of experimental biology*. 44: 426-447.
63. Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG (1994). Extensive nitration of protein tyrosine in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Journal of Biological Chemistry*. 375: 81-88.
64. Haddad IY, Pataki G, Hu P, Beckman JS, Matalon S (1994). Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *The Journal of Clinical Investigation*. 94: 2407-2413.

65. Nava E, Noll G, Luscher TF (1995). Nitric oxide in cardiovascular disease. *Ann Med.* 27: 343-351.
66. Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H (1995). Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo. *FEBS Lett.* 363: 235-8.
67. Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW (1998). Protein nitration in Parkinson's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 57: 338-342.
68. Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF (1999). Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathology.* 9: 147-163.
69. Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G (1997). Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience.* 17: 2653-2657.
70. Basarga O, Michaels FH, Zheng YM (1995). Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *The Proceedings of the National Academy of Sciences (USA).* 92: 12041-12045.
71. Bachmaier K, Nikolaus N, Pommerer C (1996). iNOS expression and nitrotyrosine formation in the myocardium in response to inflammation is controlled by the interferon transcription factor 1. *Circulation.* 96: 585-591.
72. Oates JC, Christensen EF, Reilly CM, Self SE, Gilkeson GS (1995). Prospective measure of serum 3-nitrotyrosine levels in systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. *Proceedings of the Association of American Physicians.* 111: 611-621.
73. Kaur H, Halliwell B (1994). Evidence for nitric oxide mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett.* 350: 9-12.
74. Kahraman A, Çakar H, Vurmaz A, Gürsoy F, Koçak S, Serteser M (2003). Ağır egzersizin oksidatif stres üzerindeki etkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi.* 2: 33-38.
75. Ring GH, Lakkis FG (1999). Breakdown of self-tolerance and the pathogenesis of autoimmunity. *Seminars in Nephrology.* 19: 25-33.
76. Ian R, Mackay MD, Fred S, Rosen MD (2001). Autoimmun diseases. *New England Journal of Medicine.* 345: 340-350.

77. Lleo A, Invenizzi P, Gao B, Podda M, Gershwin ME (2010). Definition of human autoimmunity- autoantibodies versus autoimmune Disease. *Autoimmunity Reviews*. 9: 259-266.
78. Racanelli V, Prete M, Musaraj G, Dammacco F, Perosa F (2011). Autoantibodies to intracellular antigens: generation and pathogenetic role. *Autoimmunity Reviews*. 10: 503-508.
79. Jury EC, D'Cruz D, Morrow WJW (2001). Autoantibodies and overlap syndromes in autoimmune rheumatic disease. *Journal of Clinical Pathology*. 54: 340-347.
80. Nishimori I, Okazaki K, Yamamoto Y, Morita M, Tamura S, Yamamoto Y (1993). Identification of autoantibodies to a pancreatic antigen in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *Journal of Clinical Immunology*. 13: 265.
81. Gordon SC, Quattrocioni-Longe TM, Khan BA, Kodali VP, Chen J, Silverman AL, Kiechle FL (1995). Antibodies to carbonic anhydrase in patients with immune cholangiopathies. *Gastroenterology* . 108: 1802-1809.
82. Liu C, Wei Y, Wang J, Pi L, Huang J, Wang P (2012). Carbonic Anhydrases III and IV Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus, Diabetes, Hypertensive Renal Disease, and Heart Failure. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012: 6.
83. Hosoda H, Okawa-Takatsuji M, Shinmura W, Hasimoto N, Ozaki Y, Ikeda Y (2008). Potential for differential diagnosis of autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer using carbonic anhydrase II antibody. *Pancreas*. 37: 1-7.
84. Kiechle FL, Quattrocioni-Longe TM, Brinton DA (1994). Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *American Journal of Clinical Pathology*. 101: 611-615.
85. Brinton DA, Quattrocioni-Longe TM, Kiechle FL (1996). Endometriosis: identification by carbonic anhydrase autoantibodies and clinical features. *Annals Clinical Laboratory Science*. 26: 409-420.
86. Kino-Ohsaki J, Nishimori I, Momarita M (1996). Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and sjögren syndrome. *Gastroenterology*. 110: 1579-1586.

87. Frederick L, Kiechle MD, Therese M, Quattrociochi-Longe MS, David A, Brinton MD (1994). Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *American Journal of Clinical Pathology*. 101: 611-615.
88. Kiechle FL, Quattrociochi-Longe TM, Brinton DA, Gordon SC, Sykes E, Elkhalfi MY (1996). Autoantibodies to specific enzymes, a review. *Annals Clinical Laboratory Science*. 26: 195-207.
89. Kita H (2004). Are antibodies to carbonic anhydrase disease specific marker? (Editorial). *Hepatology Research*. 30: 238-239.
90. Iuchi Y, Okada F, Takamiya R, Kibe N, Tsunoda S, Nakajima O, Toyoda K, Nagae R, Suematsu M, Soga T, Uchida K, Fuji J (2009). Rescue of anemia and autoimmune responses in SOD1-deficient mice by transgenic expression of human SOD1 in erythrocytes. *Biochemical Journal*. 422: 313-320.
91. Sokka T, Pincus T (2005). Quantitative joint assessment in rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 23: 58-62.
92. Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ (2000). The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing anti-cyclic citrullinated peptide. *Arthritis & Rheumatology*. 43:155-163.
93. Mewar D, Wilson AG (2006). Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 60: 648-655.
94. Fox PC (2007). *Autoimmune Disease and Sjögren's Syndrome*. The New York Academy of Sciences. 1098: 15-21.
95. Patel R, Shahane A (2014). The epidemiology of Sjögren's syndrome. *The Journal of Clinical Epidemiology*. 6: 247-255.
96. Venables JWP (2004). Sjögren's syndrome. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 18: 313-329.
97. Özgöçmen S (Ed) (2011). *Ankilozan Spondilit Özel Sayısı; Türkiye Klinikleri İmmunoloji Romatoloji*. 4.
98. Brown MA (2008). Breakthrough in genetic studies of ankylosing spondylitis. *Rheumatology*. 47: 132-137.

99. Bal A, Unlu E, Bhar G, Aydog E, Eksioglu E, Yorgancioglu R (2007). Comparison of serum IL-1 beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clinical Rheumatology*. 26: 211-215.
100. Reed MR, Taylor AL (2008). Tumour necrosis factor inhibitors in ankylosing spondylitis. *Internal Medicine Journal*. 38: 781-789.
101. Abbas AK, Lichtman AH. (2005). *Cellular and Molecular Immunology*, 5th. Edition. WB Saunders Company, Philadelphia.
102. Mocellin S, Rossi CD, Pilati P, Nitti D (2005). Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 16: 35-53.
103. Pay S. (2006). The use of anti-TNF drugs rheumatic disorders. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 26: 430-440.
104. Idriss HT, Naismith JH (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique* 50: 184-195.
105. Işık G, Demirezen Ş, Beksaç MS (2008). Tümör Nekroz Faktör ve Servikal Kanser Bağlantısı, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. 1: 55-61.
106. Güner İ, Özmen D ve Bayındır D (1997). Cytokines. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 17: 65-74.
107. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rosr-John S (2011). Pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1813: 878–888.
108. Gabay C (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*. 8: 3.
109. Arslan O, Nalbantoğlu B, Demir N, Özdemir H, Küfrevioğlu Öİ (1996). A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 26: 163-166.
110. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
111. Wilbur KM, Anderson NG (1948). Carbonic Anhydrase Colorimetric Determination. *Electrometric And Journal of biological chemistry*. 176: 147-154.

112. Vinood BP, Worrall S, Emery PW, Preedy VR (2005). Protein adduct species in muscle and liver rats following acute ethanol administration. *Alcohol & Alcoholism*. 40: 485-493.
113. Wu Wei, Lin Q, Hua Y, Wu Y, Liang Y, Fu X, Xiao H (2013). Study on mechanism of soy protein oxidation induced by lipid peroxidation products. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 5: 46-53.
114. Toyoda K, Nagae R, Akagawa M, Ishino K, Shibata T, Ito S, Shibata N, Yamamoto T, Kobayashi M, Takasaki Y, Matsufu T, Uchida K (2007). Protein-bound 4-hydroxy-2-nonenal an endogenous triggering antigen of anti-DNA response. *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 25769-25778.
115. Saha A, Goldstein S, Cabelli D, Czapski G (1998). Determination of optimal conditions for synthesis of peroxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite. *Free Radical Biology & Medicine*. 24: 653-659.
116. Mascio PD, Dewez B, Garcia CRS (2000). Ghost protein damage by peroxynitrite and its protection by melatonin, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33: 11-17.
117. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
118. Uchida K, Okazaki K, Nishi T, Oose S, Nakase H, Ohana M, Matsushima Y, Omori K, Chiba T (2002). Experimental Immune-Mediated in Neonatally Thymectomized Mice Immunized with Carbonic Anhydrase II and Lactoferrin. *Laboratory Investigations*. 82: 411-424.
119. Hosoda H, Okawa-Takatsuji M, Tanaka A, Uwatoko S, Aotsuka S, Hasimoto N (2004). Detection of autoantibody against carbonic anhydrase II in various liver diseases by enzyme-linked immunosorbent assay using appropriate conditions. *Clinica Chimica Acta*. 342: 71-81.
120. Yagi K (1994). Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine free radicals in diagnostic medicine. Plenum Press New York. 1-15.
121. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*. 34: 497-500.
122. Goth L (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*. 196: 143-151.

123. Stocks J, Dormandy TL (1971). The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Journal of British Society of Haematology*. 20: 95-111.
124. Barbara J. Bain, Imelda Bates, Mike a Laffan, S. Mitchell Lewis (2011). Haemiglobincyanide (Cyanmethaemoglobin) Method. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 11ThEdition. Elsevier Health Sciences. 25-56.
125. Frost SC, McKenna R (2014). Carbonic anhydrase: mechanism, regülation, link to disease, and industrial applications. Springer Dordrecht Heidelberg New York London.
126. Menteşe A (2005). Otoimmün hastalıklarda CA otoantikorlarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstistitüsü. Trabzon.
127. Yalduz F (2012).Hipotiroid ve hipertiroidli hastalarda CA I ve CA II otoantikorları ile oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstistitüsü. Trabzon.
128. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 52: 601-623.
129. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39: 44-84.
130. Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R (2008). Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology*. 153: 6-20.
131. Yan LJ, Forster MJ (2011). Chemical probes for analysis of carbonylated proteins: a review. *Journal of Chromatography B*. 879: 1308-1315.
132. Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA (2008). Oxidative Stres and covalent modification with bioactive aldehydes. *The Journal of Biological Chemistry*. 283: 21837-21841.
133. Arashiki N, Otsuka Y, Ito D, Yang M, Komatsu T, Sato K, Inaba M (2010). The covalent modification of spectrin in red cell membranes by lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 391: 1543-1547.

134. Uchida K, Hasui Y, Osawa T (1997). Covalent attachment of 4-hydroxy-2-nonenal to erythrocyte proteins. *The Journal of Biochemistry*. 122: 1246-1251.
135. Alvarez B, Radi R (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids*. 25: 295-311.
136. Küçük M (2002). Saflaştırılmış farklı orijinli karbonik anhidraz enzimleri üzerine in vitro peroksinitrit muamelesinin etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Trabzon.
137. Souza JM, Radi R (1998). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 360: 187-194.
138. Puscas I, Coltau M, Domuta G, Baican M, Puscas C, Pasca R (2000). Carbonic anhydrase I inhibition by nitric oxide: Implication for mediation of hypercapnia-induced vasodilator response. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 27: 95-99.
139. Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Freeman BA, Radi R (1999). Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 842-848.
140. Castro L, Rodriguez M, Radi R (1994). Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not its precursor, nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 29409-29415.
141. Seidel ER, Ragan V, Liu L (2001). Peroxynitrite inhibits the activity of ornithine decarboxylase. *Life Sciences*. 68: 1477-1483.
142. Kuhn DM, Sadidi M, Liu X, Kreipke C, Geddes T, Borges C, Watson JT (2002). Peroxynitrite-induced nitration of tyrosine hydroxylase. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 14336-14342.
143. Takakura K, Beckman JS, Macmillan-Crow LA, Crow JP (1999). Rapid and irreversible inactivation of protein tyrosine phosphatases PTP1B, CD45 and LAR by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 368: 197-207.
144. Quijano C, Hernandez-Saavedra D, Castro L, McCord JM, Freeman BA, Radi R (2001). Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase-role of the metal center in decomposition kinetics and nitration. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 11631-11638.

145. Lee C, Liu, X, Zweier JL (2000). Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite. *The Journal of Biological Chemistry*. 275: 9369-9376.
146. Maggi E, Chiesa R, Melisano G, Astore G, Grossi A (1995). LDL oxidation in patients with atherosclerosis: a study of in vivo and in vitro oxidation markers. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 14: 1892-1899.
147. Lehtimäki T, Lehtinen S, Solakivi T, Nikkila M, Jaakkola O, Jokela H (1999). Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 19: 23-27.
148. Willis MS, Klassen LW, Tuma DJ, Sorrell MF, Thiele GM (2002). Adduction of soluble proteins with malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) induces antibody production and enhances the T-cell proliferation. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*. 26: 94-106.
149. Scofield RH, Kurien BT, Ganick S, McClain MT, Pye Q, James JA, Schneider RI, Broyles RH, Bachmann M, Hensley K (2005). Modification of lupus-associated 60-kDa Ro protein with the lipid oxidation product 4-hydroxy-2-nonenal increases antigenicity and facilitates epitope spreading. *Free Radical Biology & Medicine*. 38: 719-728.
150. Khan MA, Dixit K, Jabeen S, Alam MK (2008). Impact of peroxynitrite modification on structure and immunicity of H2A histone. *Scandinavian Journal of Immunology*. 69: 99-109.
151. Electronic resources [online]. Available from <http://www.uniprot.org/uniprot/P00915>. [Accessed 12 October 2015].
152. Electronic resources [online]. Available from <http://www.uniprot.org/uniprot/P00918>. [Accessed 12 October 2015].
153. Kurien BT, Hensley K, Bachmann M, Scofield RH (2006). Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radical Biology & Medicine*. 41: 549-556.
154. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE (2005) Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical Biochemistry*. 38: 981-986.

155. Kocabaş Volkan, Kocabaş H, Başaralı MK, Sezer İ, Kaçar C, Büyükbaş S (2010). Ankilozan spondilit hastalarının serum oksidan- antioksidan seviyeleri. Selçuk Üniversitesi Tıp Dergisi. 26: 79-83.
156. Wakamatsu TH, Doğru M, Matsumoto Y, Kojima T, Kaido M, Ibrahim OMA, Sato EA, Igarashi A, Ichihashi Y, Satake Y, Shimazaki J, Tsubota K (2013). Evaluation of Lipid Oxidative Stress Status in Sjögren Syndrome Patients. Investigative Ophthalmology & Visual science. 54: 201-210.
157. Routsias JG, Tzioufas AG (2007). Sjögren's syndrome - study of autoantigens and autoantibodies. Clinical Reviews in Allergy & Immunology. 32: 238-251.
158. Rosenberg JN, Johnson GD, Holborow EJ (1979). Antinuclear antibodies in ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, and psoriasis. Annals of the Rheumatic Diseases. 38: 526-528.
159. Loch H, Skogh T, Kihlstrom ME (1999). Anti-lactoferrin antibodies and other types of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in reactive arthritis and ankylosing spondylitis. Clinical & Experimental Immunology. 117: 568 -573.
160. Tani Y, Sato H, Hukuda S (1997). Autoantibodies to collagens in Japanese patients with ankylosing spondylitis. Clinical and experimental rheumatology. 15: 295-297.
161. Özgöçmen S, Sogut S, Ardicoglu O, Fadillioglu E, Pekkutucu I, Akyol O (2004). Serum nitric oxide, catalase, superoxide dismutase, and malondialdehyde status in patients with ankylosing spondylitis. Rheumatology International. 24: 80-83
162. Seven A, Güzel S, Aslan M, Hamuryudan V (2008). Lipid, protein DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. Clinical Biochemistry. 41: 538-543.
163. Vijayakumar D, Suresh K, Manoharan S (2006). Lipid peroxidation and antioxidant status in blood in rheumatoid arthritis. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 21: 104-108.
164. Özgöçmen S (2007). Romatizmal hastalıklarda oksidatif stres. Türk Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi. 53: 33-35.
165. Kaur H, Halliwell B (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. FEBS letter. 350: 9-12.

- 166.** Pagano G, Castello G, Pallardo FV (2013). Sjögren's syndrome-associated oxidative stress and mitochondrial dysfunction: prospects for chemoprevention trials. *Free Radical Research*. 47: 71-3.
- 167.** Miskoy TP, Radabaugh MR, Highkin M, Abrams M, Friese O, Gallavan R, Bramson C, Hellio Le Graverand MP, Lohmander LS, Roman D (2013). Characterization of nitrotyrosine as a biomarker for arthritis and joint injury. *Osteoarthritis and Cartilage* 21: 151-156.
- 168.** Ahsan H (2013). 3-Nitrotyrosine: a biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Human immunology*. 74: 1392-1399.
- 169.** Ischiropoulos H (2009). Protein tyrosine nitration-An update. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 484: 117–121.
- 170.** Souza JM, Peluffo G, Radi R (2008). Protein tyrosine nitration-Functional alteration or just a biomarker. *Free Radical Biology & Medicine*. 45: 357-366.
- 171.** Peluffo G, Radi R (2007). Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovascular Research*. 75: 291-302.
- 172.** Freeman BA, Baker PRS, Schopfer FJ (2003). NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response. *Trends in Biochemical Sciences*. 28: 646-654.

9. EKLER

9.1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Araştırmanın Adı : Oksidatif olarak modifiye edilmiş Karbonik Anhidraz'a karşı otoantikor oluşumunun ve bu antikorların bazı romatoid hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Çalışmamızın amacı, 4-HNE, MDA ve peroksinitrit ile in vitro olarak modifiye edilen Karbonik Anhidraz enzimine karşı antikor oluşumunun ve bu antikorların romatoid artrit, ankilozan spondilit ve sjögren sendromu hastalıkları ile ilişkisinin belirlenmesi, oksidan-antioksidan düzeyle arasındaki ilişkilerin incelenmesidir.

KATILMA KOŞULLARI NEDİR?

Bu çalışmaya dahil edilebilmeniz için romatoid artrit, sjögren sendromu veya ankilozan spondilit tanısı almış olmanız gerekir. Diyabet ve ifade edilen hastalıklar dışında bir otoimmün hastalığının olmaması gerekmektedir.

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

Çalışma için bir defaya mahsus bir adet biyokimya ve CBC kanı alınacaktır. Farklı olarak herhangi bir işlem uygulanmayacaktır.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı her bir hastalık için ve sağlıklı kişilerden en az 30 ar kişi olacak şekilde toplamda 120'dir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Bu araştırmada tıbbi olarak şu aşamada bir yarar beklenmemektedir. Fakat çalışmadan elde edilecek sonuçlar oksidatif stres sonucu oluşan bu ürünlerin otoantikor oluşumuna etkisini göstererek mevcut literatüre katkı sağlanmış olacaktır. Aynı zamanda bu ürünler ve antikorlar birçok proteinin aktivitesini değiştirmektedir. Çalışmamız sonucunda hangi molekülün daha fazla antikor gelişimine sebep olduğunun belirlenmesi ile bu yönde yapılacak olan çalışmalara ışık tutacaktır. Ayrıca otoantikorlar birçok hastalıkta tanı koydurucu olarak kullanılabilmektedir. Erken tanı ve tedavi süreci için yeni yaklaşımların geliştirilmesine yardımcı olabilecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Size bu araştırmada bir defaya mahsus kan alma işlemi uygulanacaktır. Bu uygulama ile ilgili gözlenebilecek istenmeyen etkiler arasında kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir sayılabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

ARAŞTIRMA SÜRECİNDE BİRLİKTE KULLANILMASININ SAKINCALI OLDUĞU BİLİLEN İLAÇLAR/BESİNLER NELERDİR?

Çalışma süresince birlikte kullanımının sakıncalı olduğu ilaç ve besinler dir.

HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK/SORUMLULUK KİMDEDİR VE NE YAPILACAKTIR?

Araştırmaya bağlı bir zarar söz konusu olduğunda, bu durumun tedavisi sorumlu araştırmacı tarafından yapılacak, ortaya çıkan masraflar tarafından karşılanacaktır. Uygulama sırasında gelişebilecek herhangi bir hasara karşı (ölüm/sakatlanma dahil) güvence altına alınmaktasınız, oluşabilecek hasar size tarafımızdan yapılan sigorta ile tazmin edilecektir (Sağlık Bakanlığı'ndan izin alınması gerekli olmayan araştırmalar için sorumlu değildir).

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?

Tarih/ Versiyon: **BELGE TARİHİ YAZINIZ**

İlaç Deği Çalışmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	Belge Kodu Form 05	Rev. Tarihi / No.su: 01.02.2011/05	Sayfa 1/3
---	-----------------------	---------------------------------------	--------------

Araştırmanın Adı : Oksidatif olarak modifiye edilmiş Karbonik Anhidraz'a karşı otoantikor oluşumunun ve bu antikorların bazı romatoid hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi

Uygulama süresi boyunca, zorunlu olarak araştırma dışı ilaç almak durumunda kaldığınızda Sorumlu Araştırmacıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için no.lu telefondan Dr.....'e başvurabilirsiniz.

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; reddetme veya vazgeçme durumunda bile sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır. Araştırmacı, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle isteğiniz dışında ancak bilginiz dahilinde sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu durumda da sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MİDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlanırsa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlamadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 3 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülükle içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
TANISI		
YAŞI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN	İMZASI
--	--------

Tarih/ Versiyon: **BELGE TARİHİ YAZINIZ**

İlaç Dışı Çalışmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	Belge Kodu Form 05	Rev. Tarihi / No.su: 01.02.2011/05	Sayfa 2/3
---	-----------------------	---------------------------------------	--------------

Araştırmanın Adı : Oksidatif olarak modifiye edilmiş Karbonik Anhidraz'a karşı otoantikor oluşumunun ve bu antikorların bazı romatoid hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi

ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİ DIŞINDAN YETKİN BİR HEKİM		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		

GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

Tarih/ Versiyon: **BELGE TARİHİ YAZINIZ**

İlaç Dışı Çalışmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	Belge Kodu Form 05	Rev. Tarihi / No.su: 01.02.2011/05	Sayfa 3/3
---	-----------------------	---------------------------------------	--------------

10. ETİK KURUL ONAY BELGELERİ

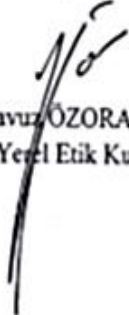
10.1. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onay Belgesi

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı : "Oksidatif Olarak Modifiye Edilmiş Karbonik Anhidraz'a Karşı Otoantikor Oluşumunun İncelenmesi"			
Çalışmacılar : Arş.Gör.Ayşe ŞENTÜRK, Doç.Dr.Ahmet ALVER			
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya ABD.			
Etik Kurul Dosya No 2011/29	Etik Kurul Toplantı Tarihi 07.06.2011	Etik Kurul Toplantı No 2011/15	Etik Kurul Karar No 4
Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN'ın başkanlığında "Oksidatif Olarak Modifiye Edilmiş Karbonik Anhidraz'a Karşı Otoantikor Oluşumunun İncelenmesi" başlığını taşıyan tez çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (07.06.2011)  Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı			

10.2. Etik Kurul Onay Belgesi

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ YEREL
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
ETHIC COUNCIL

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı: "Oksidatif Olarak Modifiye Edilmiş Karbonik Anhidraz'a Karşı Otoantikör Oluşumunun ve Bu Antikorların Bazı Romatoid Hastalıklarla İlişkisinin İncelenmesi"

Çalışmacılar: Arş.Gör.Ayşe ŞENTÜRK, Doç.Dr.Ahmet ALVER, Y.Doç.Dr.Murat KARKUCAK, Y.Doç.Dr.Adem TÖRK

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyokimya ABD.

Etik Kurul Dosya No 2011/90	Etik Kurul Toplantı Tarihi 04.07.2011	Etik Kurul Toplantı No 2011/17	Etik Kurul Karar No 1
---	---	--	-------------------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Faruk AYDIN'ın başkanlığında "Oksidatif Olarak Modifiye Edilmiş Karbonik Anhidraz'a Karşı Otoantikör Oluşumunun ve Bu Antikorların Bazı Romatoid Hastalıklarla İlişkisinin İncelenmesi" başlığını taşıyan tez çalışmasının, araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Etik Kurul üyelerinin oybirliğiyle karar verilmiştir. (04.07.2011)

Prof.Dr. Faruk AYDIN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanı
Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe ŞENTÜRK

Doğum Tarihi : 15.07.1984

Telefon : (0462) 377 7889

Medeni Hali : Evli

İletişim : ayseakyuz.senturk@gmail.com

Adres : Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya ABD, Trabzon

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Bölüm /Program	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Kimya Öğretmenliği	KTÜ	2006
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	2008
Doktora	Tıbbi Biyokimya	KTÜ	

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurumu	Süre
Araştırma Görevlisi	KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya ABD, Trabzona	2007-2015

YABANCI DİLİ: İngilizce

UZMANLIK ALANI :

Oksidatif modifikasyonlar, CA Otoantikorları, Oksidatif Stres, Antioksidan Moleküller

YAYINLAR

1. Karkucak M, Çapkın E, Alver A, **Akyüz A**, Türkyılmaz AK, Nuhoğlu İ, Civan N (2010). Ankilozan Spondilitli Hastalarda Plazma Osteopontin Düzeyleri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi. 24(3):161-165
2. Karkucak M, Çapkın E, Alver A, **Akyüz A**, Kiris A, Ak E, Topbaş M, Tosun M (2010). The Effect Of anti-TNF agent on oxidation status in patients with ankylosing spondylitis. Clinical Rheumatology. 29: 303-307,2010.
3. Karkucak M, Çapkın E, Çakırbay H, Alver A, **Akyüz A**, Demirok CD, Tosun M (2011). Serum Levels of Anti-Citrullinated Protein Antibody (ACPA) and TWEAK in Patients with Rheumatoid Arthritis: Association with Disease Activity And Treatment Modalities. Turk Journal of Rheumatology. 26(3): 204-209.
4. Alver A, **Şentürk A**, Çakırbay H, Menteşe M, Gökmen F, Keha EE, Uçar F (2012). Carbonic anhydrase II autoantibody and oxidative stress in rheumatoid arthritis. Clinical Biochemistry. 44(17-18): 1385-1389.
5. Karkucak M, Çapkın E, Alver A, **Akyüz A**, Turkyilmaz AK, Zengin E (2012). The relationship between plasma homocysteine level and different treatment modalities in patients with ankylosing spondylitis. Rheumatology International. 32(8):234953.
6. Alver A, İmamoğlu M, Menteşe A, **Şentürk A**, Bulbul SS, Kahraman SC, Sumer A (2014). Malondialdehyde And Ca II Autoantibody Levels Are Elevated In Children With Undescended Testes. World Journal of Urology. 32:209-213.

BİLDİRİLER

1. **Akyüz A**, Okur, Menteşe A, Çakırbay H, Gökmen F, Alver A (2008). Romatoid Artritli Hastalarda Karbonik Anhidra II Otoantikorları ile Eritrosit Antioksidan Enzimler arasındaki ilişki. P065, 152-153. 20th National Biochemistry Congress, Nevşehir, Türkiye, 29 October-1 November 2008.
2. Menteşe A, Yiğit S, Keha EE, Kaklıkkaya N, Alver A, Turan İ, Uzun A, **Akyüz A**(2008). Helikobacter Pylori Enfeksiyonlu Hastaların Serumlarında CA II Otoantikorlarının belirlenmesi. P075, pp:160. 20th National Biochemistry Congress, Nevşehir, Türkiye, 29 October-1 November 2008.

3. apkın E, Karkucak M, Alver A, **Akyüz A**, Turkyilmaz AK, Zengin E. (2011) The Relationship between Plasma Homocysteine Level and Different Treatment Modalities in Patients with Ankylosing Spondylitis. PP71. Rheumatology 50 (2): ii21-ii28.
4. apkın E, Karkucak M, Alver A, **Akyüz A**, Ulusoy H, Karaca A (2011). Plasma Leptin Status and the Relationship between Different Medical Treatments used in Ankylosing Spondylitis. PP72. Rheumatology 50 (2): ii21-ii28.
5. Kahraman C, Alver A, **Şentürk A**. (2013) Diyetle indüklenmiş obezitede n-asetilsistein uygulamasının rezistin sentezi ve gen ekspresyonu üzerine etkisi . Biyokimya Kongresi 2013