



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HİPOTİROİDİLİ VE HİPERTİROİDİLİ
HASTALARDA CA I VE CA II
OTOANTİKORLARI İLE OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İNCELENMESİ**

Fazilet YALDUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. E. Edip KEHA

TRABZON-2012



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HİPOTİROİDİLİ VE HİPERTİROİDİLİ
HASTALARDA CA I VE CA II
OTOANTİKORLARI İLE OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
İNCELENMESİ**

Fazilet YALDUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. E. Edip KEHA

TRABZON-2012

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Asım ÖREM

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Fazilet YALDUZ' un hazırladığı "Hipotiroidili ve Hipertiroidili Hastalarda CA I ve CA II Otoantikorları ile Oksidatif Stres Parametreleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi" başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. E.Edip KEHA

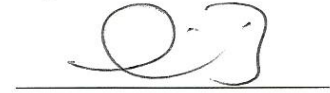


Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. E.Edip KEHA



Prof. Dr. Cihangir EREM



Doç. Dr. Ahmet ALVER



Tarih:/.../2012

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../2012 tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilim Enstitüsü tez yazım klavuzu 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 çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

25.05.2012

Fazilet YALDUZ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda değerli katkılarından dolayı danışman hocam Prof. Dr. E. Edip KEHA başta olmak üzere anabilim dalımızın saygıdeğer hocaları Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Doç. Dr. Ahmet ALVER, Doç. Dr. Birgül KURAL, Yrd. Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN ile İç hastalıkları anabilim dalından Prof. Dr. Cihangir EREM hocamıza ve Dr. Akile KARAÇİN'e; çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE, Arş. Gör. Müge KOPUZ, Arş. Gör. Diler US, Arş. Gör. Ayşegül UZUN SÜMER, Arş. Gör. Selim DEMİR ile Gümüşhane Üniversitesi Öğr. Gör. İbrahim TURAN ile İmran İNCE, Sema MISIR, Metehan AKÇA ve enstitüdeki tüm arkadaşlarıma ve maddi manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkürlerimi sunarım.

Fazilet YALDUZ

İÇİNDEKİLER

İç Kapak Sayfası	
KABUL ve ONAY	
TEZ BEYANNAMESİ	
TEŞEKKÜR.....	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR.....	xii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Karbonik Anhidraz	5
4.1.1. Karbonik Anhidraz Fizyolojik Fonksiyonları.....	5
4.1.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	5
4.2. Tiroid Bezi ile İlgili Genel Bilgiler.....	7
4.3. Tiroid Hastalıkları.....	7
4.3.1. Hipotiroidi.....	7
4.3.1.1. Hipotiroidide Metabolizmadaki Değişikler	8
4.3.1.2. Hipotiroidi Tanısı.....	8
4.3.2. Hipertiroidi.....	9
4.3.2.1. Hipertiroidide Metabolizmadaki Değişikler	9
4.3.2.2. Hipertiroidi Tanısı.....	9

4.4. Otoimmünite	9
4.4.1. Otoimmün Hastalılarda İmmünopatolojik Mekanizmalar	10
4.4.2. Otoimmün Hastalıklar.....	10
4.4.3. Otoimmün Hastalıkların Oluşumunda Etkin Olan Faktörler	11
4.4.3.1. Genetik Faktörler	11
4.4.3.2. İmmünolojik Faktörler	11
4.4.3.3. Hüморal İmmün Cevap	11
4.4.3.4. İmmün Kompleksler	11
4.4.3.5. Hücreşel İmmün Cevap	12
4.4.3.6. Viral Faktörler.....	12
4.4.4. Otoimmün Tiroid Hastalıklarının Patogenezi.....	12
4.4.5. CA I ve CA II'nin Otoimmün Hastalıklarla İlişkisi	13
4.5. Oksidatif Stres.....	14
4.6. Antioksidan Savunma Mekanizmaları.....	15
4.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	16
4.6.2. Katalaz	16
4.6.3. Total Antioksidan Seviye.....	16
4.6.4. Total Oksidan Seviye	17
4.6.5. Protein Karbonil Grubu	17
5. GEREÇ ve YÖNTEM	18
5.1. Gereçler.....	18
5.1.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	18
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
5.2. Yöntemler	20
5.2.1. Numunelerin Toplanması	20

5.2.2. CA Otoantikörlerinin ELISA Yöntemi ile Tayini	20
5.2.3. Eritrosit Antioksidan Enzimler	23
5.2.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	23
5.2.3.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini	25
5.2.4. Protein Karbonil Grubu Tayini	26
5.2.5. Total Antioksidan Seviye (TAS) Tayini	27
5.2.6. Total Oksidan Seviye (TOS) Tayini	28
5.2.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSI).....	29
5.3. İstatistiksel Analiz.....	29
6. BULGULAR.....	30
6.1. Hipotiroidi, Hipertiroidi ve Kontrol Grubunda Anti-CA I, Anti-CA II, SOD, Katalaz, TAS, TOS, OSI, Protein Karbonil Grubu Düzeyi Sonuçları.....	30
6.1.1. CA-I Otoantikör Sonuçları.....	31
6.1.2. CA- II Otoantikör Sonuçları	31
6.1.3. SOD Ölçüm Sonuçları.....	32
6.1.4. Katalaz Sonuçları.....	33
6.1.5. Total Oksidan Seviye (TOS) Sonuçları	33
6.1.6. Total Antioksidan Seviye (TAS) Sonuçları	34
6.1.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Sonuçları	34
6.1.8. Protein Karbonil Grubu Sonuçları	35
6.2. Hipotiroidili ve Hipertiroidili Hastaların Anti-CA I ve Anti-CA II Düzeyleri ile TAS, TOS, OSI, Protein Karbonil Grubu, SOD, Katalaz Düzeylerine İlişkin Korelasyon Sonuçları.....	35
6.2.1. Hipotiroidili Hasta Grubunda Anti-CA I ve CA II Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Sonuçları.....	36

6.2.2. Hipertiroidili Hasta Grubunda Anti-CA I ile CA II Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Sonuçları.....	36
6.2.3. Hipertiroidili Hasta Grubunda Anti-CA I Düzeyleri ile Protein Karbonil Grubu Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Sonuçları.....	37
6.2.4. Hipertiroidili Hasta Grubunda Anti-CA II Düzeyleri ile Protein Karbonil Grubu Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Sonuçları.....	38
6.3. ROC Analizi Sonuçları	38
6.3.1. Hipotiroidi Grubu ile Kontrol Grubu Arasında Anti-CA I Sonuçları.....	38
6.3.2. Hipertiroidi Grubu ile Kontrol Grubu Arasında Anti-CA I Sonuçları.....	39
6.3.3. Hipotiroidi Grubu ile Kontrol Grubu Arasında Anti-CA II Sonuçları	40
6.3.4. Hipertiroidi Grubu ile Kontrol Grubu Arasında Anti-CA II Sonuçları	40
6.3.5. Hipertiroidi Grubu ile Hipotiroidi Grubu Arasında Anti-CA I Sonuçları	41
6.3.6. Hipertiroidi Grubu ile Hipotiroidi Grubu Arasında Anti-CA II Sonuçları.....	41
7. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	42
8. KAYNAKLAR	46
9. ETİK KURUL ONAYI.....	53
10. ÖZGEÇMİŞ	54

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri	18
Tablo 2: Kullanılan kimyasal maddeler üretici firmalar ve ürün kodları	19
Tablo 3: Tiroid hastalığının tanısında kullanılan biyokimyasal parametreler ve demografik özellikler	20
Tablo 4: SOD aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı	24
Tablo 5: Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı.....	26
Tablo 6: TAS ölçümü için reaksiyon karışımı	28
Tablo 7: TOS ölçümü için reaksiyon karışımı	28
Tablo 8: Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda anti-CA I, anti-CA II, SOD, katalaz, TAS, TOS, OSI, protein karbonil grubu düzeyleri	30
Tablo 9: Hipotiroidili hastaların anti-CA I ve anti-CA II düzeyleri ile TAS, TOS, OSI, protein karbonil grubu, SOD, katalaz düzeylerine ilişkin korelasyon sonuçları.	35
Tablo 10: Hipertiroidili hastaların anti-CA I ve anti-CA II düzeyleri ile TAS, TOS, OSI, protein karbonil grubu, SOD, katalaz düzeylerine ilişkin korelasyon sonuçları	36

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği	24
Şekil 2. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği.....	25
Şekil 3. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda anti-CA I düzeyleri.....	31
Şekil 4. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda anti-CA II düzeyleri	32
Şekil 5. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda SOD düzeyleri.....	32
Şekil 6. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda katalaz düzeyleri.....	33
Şekil 7. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda TOS düzeyleri	33
Şekil 8. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda TAS düzeyleri	34
Şekil 9. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda OSI düzeyleri	34
Şekil 10. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda protein karbonil grubu düzeyleri ..	35
Şekil 11. Hipotiroidi grubunda anti-CA I ve CA II düzeyleri arasındaki korelasyon	36
Şekil 12. Hipertiroidi grubunda anti-CA I ve CA II düzeyleri arasındaki korelasyon	35
Şekil 13. Hipertiroidi grubunda anti-CA I düzeyleri ve protein karbonil grubu düzeyleri arasındaki korelasyon	37
Şekil 14. Hipertiroidi grubunda anti-CA II düzeyleri ve protein karbonil grubu düzeyleri arasındaki korelasyon	38
Şekil 15. Hipotiroidi grubu ile kontrol grubu arasında anti-CA I sonuçları.....	39
Şekil 16. Hipertiroidi grubu ile kontrol grubu arasında anti-CA I sonuçları.....	39
Şekil 17. Hipotiroidi grubu ile kontrol grubu arasında anti-CA II sonuçları	40
Şekil 18. Hipertiroidi grubu ile kontrol grubu arasında anti-CA II sonuçları	40
Şekil 19. Hipertiroidi grubu ile hipotiroidi grubu arasında anti-CA I sonuçları	41
Şekil 20. Hipertiroidi grubu ile hipotiroidi grubu arasında anti-CA II sonuçları	41

KISALTMA DİZİNİ

CA	Karbonik Anhidraz
TAS	Total Antioksidan Seviye
TOS	Total Oksidan Seviye
OSI	Oksidatif Stres İndeks
SOD	Süperoksit Dismutaz
CAT	Katalaz
TSH	Tiroid Uyarıcı Hormon
TRH	Tirotropin Salıcı Hormon
TH	Tiroid Hormon
T4	Tiroidin
T3	Triyodotironin
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
TG	Tioglobulin
TPO	Tiroid Peroksidaz
TSH-R	Tiroid Uyarıcı Hormon Reseptörü
TSH-R Ab	Tiroid Uyarıcı Hormon Reseptör Antikoru
Ia	I region associated

ÖZET

HİPOTİROİDİLİ ve HİPERTİROİDİLİ HASTALARDA CA I ve CA II OTOANTİKORLARI ile OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ

Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya otoimmünite, otoimmünizasyonun rol oynadığı hastalıklara otoimmün hastalıklar denilmektedir. Oluş mekanizması kesin olarak bilinmeyen bu tür hastalıkların tanısında organizmanın kendi dokularına karşı oluşan otoantikorların belirlenmesinden yararlanılmaktadır. Karbonik anhidraz, CA, (E.C.4.2.1.1) organizmalarda yaygın olarak bulunan, aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir. CA otoantikorlarının varlığı birçok otoimmün temelli hastalıkta ortaya çıkarılmıştır. Reaktif oksijen türlerinin biyomoleküllerle reaksiyonu sonucunda oluşan patolojik duruma oksidatif stres denir. Oksidatif stres ile otoimmün hastalıklar arasında önemli bir ilişki vardır.

Çalışmamızda tiroid hastalarında oksidatif stres belirteçleri ile anti-CA I ve anti-CA II düzeylerini ölçüp, bu parametreler arasında bir korelasyon olup olmadığının ve bu parametrelerden tiroid hastalığının tanısında kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmaya 39 hipotiroidili ve 69 hipertiroidili toplam 108 hasta ile 52 sağlıklı kişi alındı. Gruplara ait serum örneklerinde anti-CA I, anti-CA II, total antioksidan seviye (TAS), total oksidan seviye (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI), protein karbonil grubu ve eritrosit paketlerinde SOD, katalaz düzeyleri ölçüldü.

Hipotiroidi ve hipertiroidili hastalarda anti-CA I, anti-CA II, TOS, OSI, SOD kontrol grubuna göre yüksek düzeyde tespit edildi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$). Ayrıca, hem hipotiroidili hem de hipertiroidili hasta grubunda anti-CA I ve anti-CA II arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir korelasyon bulundu ($p=0.0001$). Hipertiroidili hasta grubunda ise anti-CA I ve anti-CA II ile protein karbonil grubu düzeyleri arasında negatif bir korelasyon görüldü. Sonuç olarak anti-CA I ve anti-CA II değerleri tiroid hastalığının erken teşhisinde belirteç olarak kullanılabileceği, ancak oksidatif stres parametrelerinin bu amaçla kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Karbonik anhidraz, karbonik anhidraz otoantikorları, otoimmünite, oksidatif stres belirteçleri, tiroid hastalığı.

SUMMARY

THE INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE CARBONIC ANHYDRASE I AND II AUTOANTIBODIES AND THE OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN THE PATIENTS WITH HYPOTHYROIDISM AND HYPERTHYROIDISM

Autoimmunity is the immune response of an organism against its own tissue antigens and the disease that results from such an aberrant immune response is termed as an autoimmune disease. The mechanisms of these diseases are not well known and, determination of autoantibodies towards their own tissues are used for their diagnosis.

Carbonic anhydrase, CA, (E.C.4.2.1.1) is a zinc containing metalloenzyme which is widely distributed among all types of organisms and has the physiological function of hydration of CO₂ and dehydration of H₂CO₃. CA autoantibodies have been shown in many autoimmune based diseases.

Oxidative stress is the pathological situation which appears as the result of the reactions of the reactive oxygen species with biomolecules. The correlation between oxidative stress and autoimmune diseases is very important.

In this study, it was aimed to determine the presence of any correlation between anti-CA I and anti-CA II levels and oxidative stress markers after determining their levels in thyroid diseases and also to see if these parameters could be used for diagnosis of this disease.

Total 108 patients of which 39 with hypothyroid and 69 with hyperthyroid were included to this study. Our control group consisted 52 healthy persons. In the sera of these groups the levels of anti-CA I, anti-CA II, total antioxidant, total oxidant status (TAS, TOS) oxidative stress index (OSI), protein carbonyl group and for erythrocyte hemolysates superoxide dismutase and catalase were measured.

The anti-CA I, anti-CA II, TOS, OSI, SOD levels of the both groups with hypothyroid and hyperthyroid were found to be higher than the control group. The difference between these groups were statistically significant ($p < 0.001$). In addition, for both hypothyroid and hyperthyroid groups an important positive correlation between anti-CA I and CA II values ($p = 0.0001$) were found. In the hypothyroid group a negative correlation between protein carbonyl group levels and anti-CA I and anti-CA II values were seen.

In conclusion, in early diagnosis of thyroid diseases, anti-CA I and anti-CA II values could be used as a marker, whereas, oxidative stress parameters could not be used for this purpose.

Key words: Carbonic anhydrase, carbonic anhydrase autoantibodies, autoimmunity, oxidative stress markers, thyroid disease.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Karbonik anhidrazlar (CA, EC 4.2.1.1., karbonat hidrolizaz), aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu ihtiva eden ve karbondioksitin hidratasyonu ile bikarbonatın dehidratasyonunu kapsayan iki fizyolojik reaksiyonu katalizleyen monomerik proteinlerdir. Solunum, doku ve akciğerlerdeki CO_2 /bikarbonat transportu, pH ve CO_2 homeostazisi, tümörleşme ve daha birçok fizyolojik, patolojik olaylarla bu enzim ilişkilidir (1).

Yapılan araştırmalarda, çeşitli otoimmün tiroid hastalıklı kişilerden alınan serum numunelerinde CA I ve CA II'ye karşı otoantikörlerin geliştiği görülmüş, ancak, antikör oluşum mekanizmaları açıklanamamıştır. Fuji ve arkadaşlarının 2007 yılında SOD geni çıkarılmış farelerde yaptıkları bir çalışmada, eritrositlerde artmış oksidatif strese bağlı olarak CA II'ye karşı antikör oluştuğunu ve bu antikör oluşumunu N-asetilsistein kullanımı ile azaldığını göstermişlerdir (2). Anti-CA II'ye nispeten çok daha az sayıda olmakla beraber, otoimmün pankreatit, kronik pankreatit ve Sjögren's sendromu gibi hastaların serumlarında CA I antikörlerinin de varlığı bildirilmiştir (3,4,5).

Tiroid hastalıkları tiroid hormonlarının aşırı salınımı (hipertiroidi) ve tiroid hormonlarının eksikliği (hipotiroidi) ile ilgili durumları ve tiroidin kitle lezyonlarını içerir (6,7). Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya otoimmünite, otoimmünizasyonun rol oynadığı hastalıklara da otoimmün hastalıklar denilmektedir. Oluş mekanizması kesin olarak bilinmeyen bu tür hastalıkların tanısında organizmanın kendi dokularına karşı oluşan hücresel tip immün cevap ve otoantikörlerin belirlenmesinden yararlanılmaktadır (8).

Tiroid hormonları birçok memeli türünde enerji metabolizmasını hızlandırmaktadır. Tiroid hormonlarının enerji metabolizması üzerindeki etkisinin oksijen tüketiminde, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda ve bazı mitokondriyal solunum zinciri bileşenlerinin aktivite ve sayısında değişikliklere sebep olarak, mitokondriyal solunumu artırma şeklinde olduğu bilinmektedir. Tiroid hormonu ile indüklenen hipermetabolik durumun sebep olduğu hızlanmış mitokondriyal elektron transportu ubiquinon bölgesindeki süperoksit oluşumunu artırır. Oluşan süperoksit radikalleri çeşitli enzimler vasıtasıyla hidroksil radikallerini de içeren birçok reaktif türlerin oluşumuna öncülük eder (9,10,11,12).

Hipertiroidili ve hipotiroidili hastalarda oksidatif stres parametreleri değişik çalışmalarda incelenmiştir (13,14,15). Hipertiroidide oluşan hipermetabolik durum lipid peroksidasyonuna zemin hazırlamaktadır ve oksidatif metabolizmada artış olmaktadır. Hipotiroidide metabolik baskılanma sonucu serbest radikal oluşumunun azaldığı ve dokuların lipid peroksidasyonuna karşı korunduğu rapor edilmiştir (7,16,17).

Literatürde otoimmün tiroid hastalıklarında anti-CA I ve anti-CA II'nin araştırıldığı sadece bir çalışma mevcuttur. Bu alışmada Graves hastalarının %25'inde anti-CA II otoantikoru pozitif olarak bulunmuş ve bu antikorların Graves hastalığı patogenezinde rol alabileceği ileri sürölmüştür (18). Bununla birlikte literatürde otoimmün tiroid hastalıklarında karbonik anhidraz otoantikoru ile oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma mevcut değildir. Bu alışma bu ynyyle orijinal bir çalışmadır.

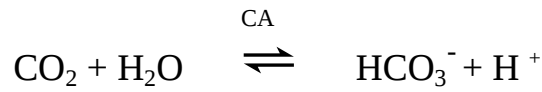
Bu tez çalışmasında, tiroid hastalıklarında oksidatif stres belirteçleri (TAS, TOS, CAT, SOD, protein karbonil grubu) ile CA I ve CA II otoantikoru düzeylerinin öłölüp, bu parametreler arasında bir ilişkinin olup olmadığının ve bu parametrelerden tiroid hastalığının tanısında yararlanılıp, yararlanılamayacağının belirlenmesi amaçlanmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.Karbonik Anhidraz

4.1.1. Karbonik Anhidraz Fizyolojik Fonksiyonları

Karbonik anhidraz (karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1) bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir. İlk defa sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz, canlılarda CO_2 'nin hidratasyonu ve HCO_3^- 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir (1).



CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir; daha sonraki yıllarda, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükrüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, sığır kemik iliği, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Son olarak enzimin memelilerdeki molekül kütlesinin 30 000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (19).

CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku/organlar ile akciğer arasındaki CO_2 /bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO_2 homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (1).

4.1.2.Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Canlılarda beş farklı bilinen yapısal CA ailesi vardır. 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), δ -CA (bazı deniz diatomlarında) ve yakın zamanda bulunan ϵ türleridir. Bunlardan en fazla bilineni alfa ailesidir. Memelilerde bulunan alfa tipi CA'ların doku dağılımı, hücre içi yerleşimleri ve kinetik özellikleri farklı on altı ayrı (CA I-XVI) izoenzimi tarif edilmiştir. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi

membrana bağılı (CA IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI). CA XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izozimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir (20,21).

Genelde, insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu izoenzimler ortaya çıkarılmıştır. CA-I, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir izoenzimdir ve insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır (22,23). İnsan eritrositlerinde CA II'den yaklaşık 6 kat daha bol bulunan, fakat aktivitesi CA II'nin %15'i kadar olan bir izoenzimdir ($K_{cat} = 2.10^5 s^{-1}$). Sağlam yetişkin eritrositlerinde CA I, toplam CA aktivitesinin yaklaşık % 50 'sini oluşturmaktadır. CA I, kalın barsağın epitelinde, kornea epitelinde, lenste, ter bezlerinde ve yağ dokusunda bulunur. CA I insan fetal eritrositlerinde bulunmaz. Kırmızı kan hücrelerinde hemoglobinden sonra en bol bulunan protein olmasına rağmen hiçbir hematolojik anormallikler onun eksikliği sonucu ortaya çıkmaz. CA I izoenziminin fizyolojik önemi belli değildir. Diğer CA izoenzimlerinin ve başka mekanizmaların CA I eksikliğini telafi edebildiği tahmin edilmektedir (24). Eritrositlerde CA-I izoenzimi yanında CA-II izoenzimi de bulunmaktadır. CA-I izoenziminin fizyolojik fonksiyonu CA-II kadar açık değildir. CA-I eksikliği sendromu belirlenmiş, fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (23,24). CA-II izoenzimi karbonik anhidrazın en çok çalışılan formudur. CA II, alfa sınıfı CA ailesinin maksimum CO₂ hidrasyonu turnover sayısına sahip, katalitik aktivitesi en yüksek olan üyesidir. Katalitik etkisi, aktif bölgesindeki çinko iyonlarının üç histidin rezidüsüyle koordinasyonu ile gerçekleşir (25). CA II, böbrek tubulus hücrelerinde, gözde processus siliariste, eritrositlerde, mide mukozasında, beyinde, karaciğerde, pankreatik kanal ve endotel hücrelerinde, trombositlerde ve spermatozoada bulunur. CA II, ayrıca safra kesesinin epitel hücrelerinde eksprese edilmektedir. Bazı hücrelerde CA II, asit-baz dengesinde için temel bir rol oynar. Üriner asidifikasyon için H⁺ salgılayan renal tubuler ve H⁺ salgılayan gastrik parietal hücrelerinde etkindir. CA II, pankreas sıvısı için pankreatik kanal hücrelerine HCO₃⁻ temin eder (26). CA II aynı zamanda böbrekte, eritrositlerde ve karaciğerde proksimal tübüllerde CO₂ değişimine katkıda bulunur (27).

4.2.Tiroid Bezi ile İlgili Genel Bilgiler

Endokrin bezlerin en büyüğü olan tiroid bezinin ağırlığı kişiler arasında değişmekle birlikte, yaklaşık 25-30 g kadardır (28). Tiroid birbirinden bağımsız çalışan iki endokrin sistem içerir. Biri foliküler hücrelerden, diğeri parafoliküler hücrelerden oluşur. Foliküler hücreler tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3), parafoliküler hücreler kalsitonin hormonu yapar ve salgırlar. Tiroid hormonlarının yapımını üstlenen kısma tiroid follikülü adı verilir

T3 ve T4'ün yapımı, salınması, taşınması ve düzenlenmesi tiroid uyarıcı (stimulan) hormon (thyroid stimulating hormone; tirotropin; TSH), TSH'nın yapımı ve salınması ise tirotropin salıcı hormon (thyrotropin releasing hormone; TRH) ve T3-T4'ün kontrolü altındadır. Bilindiği gibi TRH hipotalamustan, TSH ise hipofizden salgılanır (22).

4.3.Tiroid Hastalıkları

Tiroid hastalıklarının değerlendirilmesinde genellikle kullanılan testler TSH (normal sınırları: 0.27-4.2 μ IU/mL), serbest T4 (normal sınırları: 0.9-1.7 ng/dL) ve serbest T3'dür (normal sınırları: 1.8-4.6 pg/dL). Normal TT3 değeri 0.8-2.0 ng/mL ve TT4 değeri ise 5.1-14.1 μ g/dL'dir (18).

TSH düzeyi tiroid fonksiyonlarının iyi bir göstergesidir. Günümüzde kullanılan modern ölçüm yöntemleri ile çok küçük miktarlardaki TSH konsantrasyonları dahi saptanabilmektedir.

4.3.1.Hipotiroidi

Hipotiroidi en sık görülen klinik tiroid fonksiyon bozukluğu olup (29). tiroid hormonlarının eksikliği veya nadiren etkisizliği sonucu ortaya çıkar. Bu hastalıkta metabolik bir yavaşlama söz konusudur (6). Hipotiroidi bebeklik (kretinizm) ve çocukluk döneminde (Jüvenil hipotiroidi ve jüvenil miksödem) ortaya çıktığında kayda değer büyüme ve gelişme geriliğine sebep olduğundan erken tanı ve zamanında tedavi önemlidir (6,7).

Hipotiroidi, primer tiroid patolojisine bağlı olarak primer hipotiroidi (tiroid bezi kökenli) veya sekonder hipotiroidi (hipofiz kaynaklı TSH yetersiz) veya tersiyer

hipotiroidi (hipotalamus kaynaklı, TRH yetersiz) gibi sınıflandırılabilir. Bazen tiroid hormonlarının periferik etkisizliğine bağlı da oluşabilmektedir (16,30).

4.3.1.1. Hipotiroidide Metabolizmadaki Değişiklikler

Enerji metabolizmasında oluşan yavaşlama O_2 tüketiminde azalmaya, bazal metabolizma hızının düşmesine, iştah azalmasına, bazal beden ısısının azalmasına ve soğuk intoleransına neden olur (7,16).

Protein sentezinde ve yıkılmasında azalma söz konusudur. Kemik ve yumuşak dokularda büyüme duraklaması, hem büyüme hormonunun sekresyonunun, hem de, etkisinin azalması sonucu oluşur (17).

Lipidlerin sentez ve yıkım hızı düşmüştür. Post-heparin lipolitik aktivite azalmış, lipidlerin yıkım bölgelerine geçişi yavaşlamıştır. Primer hipotiroidide kolesterol yüksekliği mevcuttur. Trigliseridlerde artış olabilir. Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) kolesterol ve serbest yağ asitleri azalmıştır, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) yükselmiştir. Serbest yağ asitlerinin mobilizasyonu yavaşlamıştır (7,16,17).

4.3.1.2. Hipotiroidi Tanısı

Tanıda önemli parametreler tiroid hormonları ve TSH'dır. Tiroid hormonlarının total ve serbest fraksiyonları ölçülür (6,16).

Serbest T4 (ST4) düşük ve TSH değeri yüksek ise primer hipotiroidi tanısı konur. Serum T3 düzeyleri değişkendir. Primer hipotiroidizmde, T3 azalması T4'e göre daha azdır ve bu da tanıda önemsizdir. Yüksek TSH düzeyine rağmen, normal ST3 ve genellikle ST4 düzeyi subklinik hipotiroidi göstergesidir (7,30).

Sekonder hipotiroidide TSH azalmasının yanı sıra, diğer ön hipofiz hormonlarından adrenokortikotropik hormon (ACTH), folikül uyaran hormon (FSH), luteinizan hormon (LH), büyüme hormonu (GH) azalması da söz konusudur (6,7,30).

Tiroid otoantikorları, otoimmün hipotiroidinin tanısını kesinleştirir. Tiroid peroksidaz antikoru (anti-TPO) ve tiroglobulin antikorlarının (anti-TG) pozitif olması Hashimoto tiroiditini düşündürür (7,16).

4.3.2. Hipertiroidi

Hipertiroidi, tiroid hormon yapımının ve salgılanmasının artışıyla oluşan klinik tablodur (7). Hipertiroidinin en sık formu olan otoimmün kaynaklı Graves hastalığında, hipertiroidiye tiroid stimulan immunglobulinler yol açarlar. Graves hastalığında tespit edilebilen TSH-R Ab tiroid dokusunda değişik etkileri görülür. Bunlardan en önemlisi, tiroid hormon sentezini artırmalarıdır (6,16,30).

4.3.2.1. Metabolizmadaki Değişiklikler

Enerji metabolizması ve ısı oluşumu normale nazaran daha çok uyarılır. Bu durumda bazal metabolizma hızını, iştahı, bazal vücut ısını artırırken, sıcağa tahammülü azaltır. Gıda alımı arttığı halde kilo kaybı söz konusudur. Bunun sebebi ise kişinin kendini aşırı enerjik hissetmesidir. Fakat sağlıklı bir bireye göre daha çabuk yorulurlar (16, 6).

Protein sentezinde artış mevcuttur fakat katabolizma derecesi daha çok arttığından, vücut doku proteinleri parçalanır. İdrarla azot atımı artar ve negatif azot dengesi oluşur. Triglicerid ve kolesterol sentezi artmıştır, fakat yıkım hızı daha fazla olduğundan plazma yağ asidi düzeyi yükselir, kolesterol düzeyi düşer (7,17).

4.3.2.2. Hipertiroidi Tanısı

Tiroid stimulan hormon tespit edilemeyecek kadar düşük veya baskılıdır. ST3 ve ST4 düzeyleri yüksektir. Tiroglobulin düzeyi yüksektir (7,6).

Otoimmünitinin varlığını tespit etmek için, anti-TPO ve anti-TG antikorları istenebilir (6).

4.4. Otoimmünite

İmmün sistemin başlıca görevi vücudun kendisine yabancı antijenleri tanıma ve onlara karşı immün cevap oluşturmaktır. B ve T tipi lenfositler ile makrofajlar immün cevap oluşumundan ve denetiminden sorumludur. Canlılar normalde kendi doku antijenlerine karşı immün cevap vermemektedir. Ancak, bazı patolojik durumlara bağlı olarak hücre reseptörlerinin bozulması ile veya immün cevap ürünlerinden bazılarının değişik aktivite göstermesi ile, organizmada değişen doku antijenlerine karşı immün cevap oluşmaktadır. Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap

oluşturmasına otoimmünite, otoimmünizasyonun rol oynadığı hastalıklara da otoimmün hastalıklar denilmektedir. Oluş mekanizması kesin olarak bilinmeyen bu tür hastalıkların tanısında organizmanın kendi dokularına karşı oluşan hücresel tip immün cevap ve otoantikorların belirlenmesinden yararlanılmaktadır (8).

4.4.1.Otoimmün Hastalıklarda İmmünopatolojik Mekanizmalar

1- İmmün sistem araçlarıyla doğrudan temas halinde olmayan hücre içi maddeler organizma tarafından “kendisine ait” olarak tanınmamış olabilir. Bunlar dolaşıma karıştıkları takdirde bir immün cevaba yol açabilirler. Sempatik oftalmide etkili olan bir mekanizmadır; normal olarak gözün içerisinde bulunan ve dolaşıma karışmayan bir antijenin dolaşıma katılması bağışıklık cevabına neden olmaktadır (8).

2- Organizmanın “kendisine ait” olarak tanıdığı antijenler; kimyasal, fiziksel veya biyolojik değişikliklere uğrayarak bu özelliklerini kaybedebilirler. Mesela, temas dermatitinde olduğu gibi bazı kimyasal maddeler, vücut proteinleriyle birleşerek onları immün cevabı meydana getirebilecek hale sokabilmektedir (8).

3- Otoimmünite oluşumunda hücresel immün cevabın önemi de büyüktür. T ve B lenfositler normalde organizmanın kendi doku antijenleri ile uyarılmamaktadır. Bu olay gelişme sürecinde otoantijenlerle temas sonucu anerji (cevapsızlık) oluşmasıyla ve yetişkin dönemde ise otoantijene özgül supresör T hücresi oluşmasıyla açıklanmaktadır. Gelişim sırasında bir mutasyonla supresör T lenfositlerin fonksiyonlarının azalması sonucu, T lenfositlerin B lenfositleri sürekli aktive etmesi ile otoantikorlar sentezlenmektedir. Lepra, sifiliz, tüberküloz gibi kronik bakteri infeksiyonlarında adjuvant gibi kuvvetli ve devamlı uyarım yapan antijenler, B lenfositleri normal dışı uyararak otoantikorların sentezine neden olmaktadır (8).

4.4.2.Otoimmün Hastalıklar

Otoimmün hastalıkları klinik yönden hastalığın bulunduğu organlar bakımından 2 gruba ayırabiliriz. Bunlardan bazılarında hastalık bir organda görülmektedir. Tiroid hastalıkları (Hashimoto Hst, Graves hst), pernisiyöz anemi, Addison, juvenil diabet gibi... Bu otoimmün hastalıklara organa özgül otoimmün hastalıklar denir. Birden fazla organ tutulumu varsa organa özgül olmayan veya sistemik otoimmün hastalıklar denir.

Bunlara örnek olarak romatoid artrit, skleroderma ve SLE (Systemic Lupus Erythematosus) verilebilir (8).

4.4.3.Otoimmün Hastalıkların Oluşumunda Etkin Olan Faktörler

4.4.3.1.Genetik Faktörler

Otoimmün hastalıkların patogeneğinde genetik, immünolojik ve viral faktörler rol oynamaktadır. Ia (I region associated) antijenleri makrofaj ve lenfositlerde bulunan ve MHC genleri tarafından kontrol edilen bir antijendir. Otoimmünitenin patogeneğinde HLA antijenlerini yöneten gen lokuslarının rolü olduğu belirlenmiştir (8).

4.4.3.2.İmmünolojik Faktörler

Otoantijenler baskılandığı veya fonksiyonları bozulduğu zaman otoimmün hastalık oluşmamaktadır. Yapısal olarak anormallik kazanan otoantijenler veya ilaç gibi yabancı bir madde ile birleşerek çapraz reaksiyon verebilen otoantijenler, hücre membranında moleköl yapısı değişen otoantijenler, Epstein-Barr virusu, bakteri lipopolisakkaridleri gibi poliklonal aktivatörlerin T veya B lenfositleri doğrudan uyarımıyla otoimmün hastalık oluşmaktadır (8).

4.4.3.3.Hümmoral İmmün Cevap

Eritrositlere karşı oluşan antikorların, eritrositlerle birleşmesi ve komplemanın da aktivasyonu sonucu, sitolitik etki ile doku hasarı olmaktadır ve bu tür hastalıklara otoimmün hemolitik anemi denilmektedir. Eritrositlere karşı oluşan antikorlar eritrositlerle birleştğinde bu eritrositlerin dalak ve karaciğer fagositer hücreleri tarafından tutulma ve tahrip edilmeleri hızla artmaktadır. Eritroblastozis fetalisde de mekanizma aynıdır. Tiroid hücre membran antijenlerine karşı oluşan plasentadan geçebilen LATS antikorlarının Fab kısımları, tiroid hücrelerini sürekli uyararak neonatal hipertiroidiye neden olmaktadır. Spermleri aglutine eden antikorlar, spermlerin servikal mukus içine girmesini engelleyerek steriliteye yol açmaktadır (8).

4.4.3.4. İmmün Kompleksler

Doku antijenlerine karşı oluşan antikorlar ile anti-nükleer antikorların kanda dolaşan antijen-antikor kompleksi oluşturarak bunların böbrek glomeröl kapillerlerinde

birikmeleriyle glomerülo nefrit; damar endotellerinde birikmeleri sonucu da vaskülitler meydana gelir. Sistemik lupus eritematozda DNA-antijen-antikor, romatoid artrit romatoid faktör-IgG kompleksleri hastalığın oluşumundan sorumlu tutulmaktadır. Viral infeksiyonlarda immün kompleks oluşumuna daha sık rastlanılmaktadır (8).

4.4.3.5.Hücresel İmmün Cevap

Hücresel otoimmün cevapta lenfokinler, hücre içi paraziti olabilen bakteri ve virüs enfeksiyonlarından sonra gelişen geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonları ve lenfosit-hedef hücre ilişkileri rol oynamaktadır. Freund adjuvantı karıştırılarak verilen beyin dokusu ile deney hayvanında ansefalomyelit oluşturulmakta ve bu hasta hayvanın lenfositleri normal hayvanlara nakledildiğinde aynı lezyonlar geliştirilebilmektedir. Lezyonların oluşumunda hücresel cevabın ve NK hücrelerinin rolü olduğu sanılmaktadır. Kuduz aşısından sonra görülebilen ensefalit olgularında da aynı mekanizma düşünülmektedir (8).

4.4.3.6.Viral Faktörler

Bazı virüslere duyarlı hayvan ve insanlarda kalıcı kronik tipte viral infeksiyonlar gelişmektedir. Yavaş virüslerin otoimmün hastalıklarla ve immün komplekslerin oluşumuyla ilişkisi kesin bilinmektedir. Fare lenfositik koriyomenenjit virüsü, kalıcı kronik viral infeksiyon ve immün komplekslerin oluşumuna neden olmaktadır. Aynı mekanizma ile hepatit B virusu poliartrit nodoza, Epstein-Bar virusu infeksiyöz mononükleoz ve Burkitt lenfoması oluşturmaktadır. İnfeksiyöz mononükleozlu hastaların B lenfositlerinin yüzeyinde bulunan Epstein-Bar virüsünün viral antijen reseptörlerine (CD21) karşı duyarlılaşmış atipik T lenfositleri bulunmaktadır (8).

Kuru ve Creutzfeldt-Jacop hastalığında immün kompleksler oluşmaktadır. Antijen antikor kompleksleri glomerul membranında ve kan damar duvarlarında birikmektedir (8).

4.4.4.Otoimmün Tiroid Hastalıklarının Patogenezi

Otoimmünite; immün sistemin kendi organ, doku, hücre, protein veya lipoproteinine yönelik immün reaksiyon göstermesidir. Normalde tüm doku organlara karşı intrauterin yaşamdan başlayan bir self-tolerans bulunmaktadır. Bu toleransın

sonradan yok olması ya da yetersiz kalması ile o doku ya da moleküle karşı immün reaksiyon ortaya çıkmaktadır. Böylece; ilgili doku, organ ya da molekülde fonksiyonel yetersizlik, inflamatuvar sürecin aktivasyonu, hücre apoptozunun tetiklenmesi gibi olumsuzluklarla karşılaşmaktadır. Otoimmünitenin nedeni açık olmamakla birlikte çoğu olguda genetik yatkınlık mevcuttur. Otoimmün hastalığı olan bireylerin birinci derece akrabalarında da bu bireylerinkine benzer otoimmün hastalıklara toplumun genel ortalamasından daha yüksek oranda rastlanması genetik faktörlerin oynadığı rolün önemini vurgulamaktadır. Ancak genetik yükün yanı sıra kişisel yatkınlık da göz ardı edilmemelidir. Otoimmün hastalığa sahip bireylerde diğer otoimmün hastalıkların da gözlenmesi sık rastlanılan bir durumdur (Graves ve Hashimoto hastalarında tip 1 DM' in daha fazla saptanması gibi) (31).

Graves hastalığı etyolojisinden tiroidi stimüle eden IgG tabiatındaki TSH-R Ab'ları sorumludur. T-lenfositler tiroiddeki antijenlere karşı sensetif hale gelerek B-lenfositlerin bu antijenlere karşı antikor oluşturmalarını sağlarlar. TSH-R Ab'ları patogeneizde en önemli unsur olmakla beraber anti-TPO ile anti-Tg antikorlarının da kısmi bir etkisi olduğu düşünülmektedir (32).

Hashimoto tiroiditi, tiroid bezinin otoimmün, inflamatuvar kronik bir hastalığıdır. Bu hastalık tiroid spesifik CD₄ (+) T hücrelerinin aktivasyonu ile başlar. Aktive olan bu hücreler CD₈ (+) sitotoksik T hücreler ve otoantikorların oluşumunu teşvik ederler. Bunlar da tiroid folikül hücrelerine zarar verirler (32).

4.4.5. Karbonik Anhidraz I ve II'nin Otoimmün Hastalıklarla İlişkisi

Sjögren's sendromu, idiopatik kronik pankreatit, primer biliyer siroz (PBC), renal tübüler asidozu içeren kuru gland sendromu veya otoimmün ekzokrinopati adı verilen hastalık grubunda farklı organların duktal epitel hücrelerinde eksprese edilen yaygın bir antijene karşı otoimmün bir cevabın varolabileceği ileri sürülmüştür (33,34). Bu organlardan elde edilen ekstraktların çeşitli hayvan türlerine farklı adjuvantlarla immunizasyonu bazı immün hastalıklar oluşturulmuştur. Ancak bu ekstraktlardaki uyarıcı antijenin yapısı tanımlanamamıştır (35,36).

İlk kez 1991 yılında, Inagaki ve arkadaşları tarafından sistemik lupus eritematos (SLE) ve Sjögren sendromlu hastaların serumlarında CA II otoantikorlarının varlığı gösterilmiştir (37). Nishimori ve arkadaşları Sjögren sendromlu hastalarda pankreas,

tükrük bezi, böbrek ve özofagus gibi ekzokrin organların ekstraklarında, CA II'ye bağlanan monoklonal bir antikorun varlığını göstermişlerdir (38). Yine aynı araştırmacılar 1994 yılında yaptıkları bir çalışmada insan CA II'yi PL/J ırkı farelere immunize ederek otoimmün sialoadeniti oluşturmayı başarmışlardır (39). Daha sonraki yıllarda Ueno ve arkadaşları CA II immunizasyonu ile immün aracılıklı kolanjit oluşturmuşlardır (40).

Bu çalışmaları takiben, polimiyosit, sistemik skleroz, endometriosis, otoimmun kolanjit (AIC), kronik viral hepatit, diyabet gibi çeşitli hastalıklarda CA otoantikorları belirlenmiş ve hastaların serumlarından saflaştırılmıştır (41). Bazı hastalıklar için bu antikorların güvenilebilir bir teşhis göstergesi olabileceği ileri sürülmüştür (42). Özellikle AIC ile antimitokondrial antijeni negatif PBC hastaların ayırımında kullanılabileceği ifade edilmiştir (43).

CA II otoantikorlarının yukarıda bahsedilen hastalıkların patolojisindeki rolü anlaşılamamıştır. Bazı araştırmacılara göre, hastalığın patolojik seyrine bağlı olarak oluşan doku harabiyetinin bir sonucu olarak CA II'ye karşı bir antikor oluşturulmaktadır. Farklı olarak bazı araştırmacılar ise, oluşan antikorların CA II'ye karşı oluşmadığını, ancak, moleküler taklitten (molecular mimicry) dolayı farklı bir antijene karşı üretilmiş antikorun CA ile çapraz reaksiyon verdiğini ve bu antijenin membrana bağlı diğer CA izoenzimleri (CA IV, IX, XII) olabileceğini ileri sürmüşlerdir (38).

Anti CA II'ye nispeten çok daha az sayıda olmakla beraber, otoimmün pankreatit, kronik pankreatit ve Sjögren's sendromu gibi hastaların serumlarında CA I antikorlarının da varlığı bildirilmiştir (3,4,5). CA I otoantikorlarının da yukarıda ifade edilen hastalıkların patolojisindeki rolü CA II'de olduğu gibi anlaşılamamıştır.

Karbonik anhidraz enzimi tiroid hücrelerinde de bulunmaktadır. Otoantikorlar hücrelere reseptör aracılıklı endositoz ile alınabilirler. Böylece anti-CA II antikorları tiroid hücrelerine girebilir ve CA aktivitesini inhibe edebilir. Bu durumda ise CA inhibisyonu nedeniyle I⁻ transportu ve tiroid hormon sentezi artabilir (18).

4.5. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türlerinin biyomoleküllerle tepkimeye girmesi sonucunda oluşan toksik etkiler nedeniyle gelişen patolojik duruma 'oksidatif stres' denir (44,45).

Tiroid hormonları bir çok memeli türünde enerji metabolizmasını hızlandırmaktadır (9,10). Tiroid hormonları enerji metabolizması üzerindeki bu etkisini oksijen tüketimini, oksidatif fosforilasyonu içeren bazı mitokondriyal solunum zinciri komponentlerinin aktivite ve sayısında bir çok değişiklik yaparak, mitokondriyal solunumu arttırarak göstermektedir (9,11). Tiroid hormonu ile indüklenen hipermetabolik durumun sebep olduğu hızlanmış mitokondriyal elektron transportu ubikinon bölgesinde süperoksit oluşumunda artış ile sonuçlanır. Oluşan süperoksit radikalleri lipid peroksidasyonunun serbest radikal sürecini hızla başlatan hidroksil radikallerini de içeren birçok reaktif türlerinin oluşumuna öncülük eder (9,12).

Oksidatif stres sadece oksijen radikallerinin üretimindeki artışla oluşmaz. Vücutta oksijen radikallerinin sentezinde artış olmasa dahi indüksiyonlar sonucu artan NO sentezi tek başına oksidatif strese neden olabilir. Nitrik oksit (NO) kaynaklı reaktif türler de oksijen radikalleri gibi lipid peroksidasyonunu başlatabilir. DNA'da zincir kırılmaları ve baz modifikasyonlarına neden olabileceği gibi metal iyonlarının oksidasyonunu değiştirebilir, proteinleri oksitleyebilir ve antioksidan tüketimine sebep olabilirler (44).

Nitrik oksidin oksidasyonu sonucu oluşan ve oksidatif streste etkili olan başlıca reaktif türler azot dioksit (NO_2), peroksinitrit (ONOO^-), diazot trioksit (N_2O_3) ve nitroksil iyonudur (NO^+) (44,46).

4.6.Antioksidan Savunma Mekanizmaları

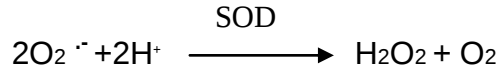
Canlı hücrelerdeki protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar denir. Antioksidanlar serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmayı korurlar ve buna antioksidan savunma denir (46,47,48).

Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek, peroksitleri alkol gibi nonradikal ürünlere dönüşümünde etkin rol oynayarak etkilerini gösterirler. Membran lipidlerine etki ederek peroksit oluşturabilen singlet oksijeni baskılayabilir ya da temizleyebilirler. Okside substratın oksidasyonunu geciktirir veya inhibe ederler (47,49).

Antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem membran kısımlarında bulunurlar (47,50).

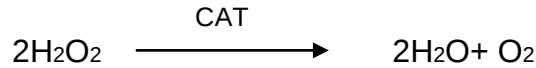
4.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (E.C. 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz, süperoksitin hidrojen perokside dismutasyonunu katalize eden bir metaloenzimdir. İnsanda SOD'nin iki tip izoenzimi mevcuttur. Sitozolda dimerik, Cu ve Zn içeren izomeri (Cu-Zn SOD) ile mitokondride tetramerik, Mn içeren izomeri mevcuttur (Mn-SOD). Prokaryotlarda Fe içeren bir izomeri daha vardır (Fe-SOD). Ayrıca 1982 yılında glikoprotein yapısında olan ekstrasellüler SOD (EC-SOD) tanımlanmıştır (47,51). SOD'ın katalizlediği reaksiyon şöyledir:



4.6.2. Katalaz

Katalaz yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Daha çok peroksizomlarda bulunur. Karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kas ve eritrositlerde aktivitesi yüksektir. İndirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit, metil ve etil hidroperoksitler gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlere etki etmez (47,52).



4.6.3. Total Antioksidan Seviye

Bu ölçüm yönteminde 2,2 - azinobis - (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) radikali (ABTS radikali) kullanılmaktadır. ABTS radikali, antioksidan konsantrasyonuna ve antioksidan kapasiteye göre mavi ve yeşil rengini kaybetmektedir. Bu renk değişikliği, absorbans değeri 660 nm'de ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır. Bu ölçüm metodunun prensibi hidrojen peroksit varlığında ABTS molekülünün ABTS⁺ molekülüne okside olmasına dayanmaktadır. Renk değişimi örnek içindeki antioksidan miktarı ile ilişkilidir (53).

4.6.4. Total Oksidan Seviye

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyon oksitlerler. Ferrik iyonlar asidik ortamda xilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.(53).

4.6.5. Protein Karbonil Grubu

Proteinler serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastır. Proteinlerin lizin, arjinin, prolin ve threonin rezidülerinin yan zincirlerinin metal katalizli oksidasyonu protein karbonil türevlerinin oluşumuna yol açar. Protein karbonilleri sadece proteinlerin direkt oksidasyonu ile değil, aynı zamanda indirgeyici şekerler ve PUFA'nın oksidasyon ürünleri ile proteinlerin fonksiyonel gruplarının etkileşimi ile de oluşabilirler. Bu reaksiyonlar sonucunda albümin ve immünoglobülin G gibi çok sayıda disülfid bağları içeren proteinlerin tersiyer yapıları bozulur. Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını meydana getiremezler. Enzimler protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde değişiklik meydana gelir.

2,4-dinitrofenilhidrazin (DNP) karbonil grupları ile birleştiğinde renkli bir hidrazon oluşmakta ve oluşan bu hidrazonun absorbansı 360 nm dalga boyunda okutulmaktadır.(15).

5.GEREÇ ve YÖNTEM

5.1.Gereçler

5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

Tablo 1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemelerin özellikleri.

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Vorteks	Nüve, NM 110
Santrifüj	Heraeus
Magnetik Karıştırıcı	Ikamag RH
ELISA okuyucusu	VERSA max
Otomatik pipet,10-100 µL	Eppendorf research
Otomatik pipet,100-1000 µL	Eppendorf research
Otomatik pipet,1-5 mL	Eppendorf research
Mikro dalga fırın	Altus ALMD 171
pH metre	Hanna Instruments
ELISA yıkayıcısı	Diagnostics Pasteur LP 35
Saf su cihazı	Aquatron 4 AD
Hassas analitik terazi	Metler Toledo AB 204-S
Deney tüpleri	SH&GLASS
Spektrofotometre	Beckman-Coulter
Kuartz Küvet	Agilent Technologies
Soğutmalı santrifüj	Allegra 64R Centrifuge
ELISA pleyti	Bioscience

5.1.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 2. Kullanılan kimyasal maddeler üretici firmalar ve ürün kodları

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici firma, ürün kodu ve saflığı
Guanidin Hidroklorid	Amresco, 3494311
DNPH	ALDRICH %97
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	Lancaster %98, 13098
Sülfürik asit (H_2SO_4)	Carlo Erba, %96 (d=1.84 g/mL)
Ksantin	Sigma, X-0626
EDTA	Carlo Erbo Reagent, Code No 303227
Nitroblue tetrazolium (NBT)	Sigma, 97596L5
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma, Lot#058K0726
Amonyum sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	Merck, Art 1216
Bakır klorür (CuCl_2)	Lancaster, 13167
Ksantin oksidaz	Sigma, Lot#SLBB1574V
Etanol	Sigma, Lot#34870, %99.8
Süt tozu	Pınar
Tween-20	Sigma, %10, P8942
Fosforik Asit (H_3PO_4)	Merck, Art 563, %85
Sitrik Asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma, C-1909, Lot 47H0808
Sodyum bikarbonat(NaHCO_3)	Merck, >%99,5 (6329)
Trolox	Fluka, 56510
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, 314, %37
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Sigma, A6011
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck, Art 4871
Potasyum klorür (KCl)	Merck, Art 4935
Disodyum hidrojenfosfat heptahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck, A547474

5.2.Yöntemler

5.2.1. Numunelerin Toplanması

Çalışmaya, KTÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları kliniğine başvuran ve yapılan tetkikler sonucu hipotiroidi veya hipertiroidi tanısı konulmuş, yaş ortalaması 50.5 ± 19.9 yıl olan 21'i kadın 18'i erkek toplam 39 hipotiroidili hasta ve yaş ortalaması 47.1 ± 14.5 yıl olan 29'u kadın 40'ı erkek toplam 69 hipertiroidili hasta ile gönüllü olarak çalışmaya katılan, yaş ve cinsiyet yönünden hasta grubuyla eşleştirilmiş yaş ortalaması 49.34 ± 15.46 yıl olan 52 sağlıklı kişi katıldı. Tiroid hastalığının tanısında kullanılan biyokimyasal parametreler ve demografik bilgiler Tablo 3'de gösterildi.

Tablo 3. Tiroid hastalığının tanısında kullanılan biyokimyasal parametreler ve demografik özellikler

	Hasta Sayısı	Cinsiyet Kadın (%) Erkek (%)		Yaş Ort. (yıl)	TSH N=0.27-4.2 $\mu\text{IU/mL}$	ST3 N=1.8-4.6 pg/dL	ST4 N=0.9-1.7 ng/dL
Hipotiroidi	39	21 (54)	18 (46)	50.5 ± 19.9	59 ± 41	1.96 ± 1.1	0.57 ± 0.25
Hipertiroidi	69	29 (42)	40 (48)	47.1 ± 14.5	0.023 ± 0.051	7.94 ± 5.4	2.69 ± 1.52

Çalışmaya katılan kişiler, daha önce KTÜ Tıp Fakültesi İnsan Etik Kurulu'nda onaylanan 2012/90 nolu rapora uygun olarak çalışma hakkında bilgilendirildi ve aydınlatılmış onamları alındı. Bireylerin her birinden biyokimya ve CBC tüplerine alınan kan örnekleri Tıbbi Biyokimya AD Araştırma Laboratuvarı'nda 3 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası serum ve plazmalar ayrıldı. CBC tüplerinde plazmaları ayrılmış kanlara yaklaşık üç katı hacimde %0.9'luk NaCl eklenerek 3 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlanarak plazma artıkları uzaklaştırıldı.

Bu şekilde elde edilen serum, plazma ve eritrosit paketleri çalışma gerçekleştirilene kadar -80°C de saklandı.

5.2.2. Karbonik Anhidraz Otoantikorlarının ELISA Yöntemiyle Tayini

Çalışma gruplarındaki bireylerin CA I ve CA II otoantikorlarının belirlenmesinde Hosoda ve arkadaşları tarafından geliştirilen ELISA yöntemi bazı küçük değişiklikler yapılarak kullanıldı (54). Her numune için ölçümler iki kez tekrarlandı.

Kullanılan Çözeltiler

1. Kaplama tamponu: A çözeltisi: 0.2 M Na_2CO_3 (2.12 g / 100ml), B çözeltisi: 0.2 M NaHCO_3 (1.68 g/ 100ml). 8 mL A çözeltisi ve 17mL B çözeltisi alındı ve pH 9.6 ya ayarlanıp distile su ile son hacim 100mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

2. Birinci yıkama tamponu (PBS çözeltisi): 0.8 g (0.14 M) NaCl, 0.02 g (2.7 mM) KCl, 0.02 g (1.5 mM) KH_2PO_4 ve 0.2169 g (8.1 mM) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılıp bir miktar distile suda çözüldükten sonra NaOH çözeltisi ile pH 7.4 olarak ayarlandı. Distile su ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3. İkinci yıkama tamponu (Tween-20-PBS çözeltisi): (0.14 M) 0.8 g NaCl, (2.7 mM) 0.02 g KCl, (1.5 mM) 0.02 g KH_2PO_4 ve (8.1mM) 0.2169 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılıp bir miktar distile suda çözüldü ve pH 7.4'e NaOH ile ayarlandı. 50 μL tween-20 eklendi. Distile su ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

4. Bloklama tamponu: Üç gram süt tozu 100mL PBS' de çözülerek hazırlandı.

5. Seyreltme tamponu: Bir gram süt tozu 100mL PBS' de çözülerek hazırlandı.

6. Sitrat-fosfat tamponu: 0.1 M (2.101 g) sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 0.2 M (3.12 g) sodyum hidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tartıldı ve pH 4.8'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Substrat çözeltisi hazırlamak için kullanıldı.

7. Antikor (konjugat) çözeltisi: 5 μL Horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human IgG antikoru alındı ve bloklama tamponu ile 10 mL'ye tamamlandı.

8. Substrat çözeltisi: 10 mg orto-phenylene-diamine pH 4.8 olan sitrat - fosfat tamponunun 25 mL'sinde çözüldü. Kullanılmadan hemen önce çözeltiye 10 μL , %30'luk hidrojen peroksit ilave edildi.

9. 2 M sülfürik asit çözeltisi: %98'lik H_2SO_4 'ten 10.8 mL alınıp deiyonize suyla 100 mL'ye tamamlandı. Reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

Deneyin Yapılışı

1. Kaplama tamponunda seyreltilen ve konsantrasyonu 10 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 dört kuyucuk ayrılır ve bu kuyucukların ikisi CA I veya CA II ile kaplanır, ikisi kaplanmaz. Sonuçlar değerlendirilirken kaplı olan kuyucukların absorbans değerlerinden kaplanmamış olan kuyucukların absorbans değerleri çıkartılır).

2. Pleyt PBS tamponu (birinci yıkama çözeltisi) ile beşer dakika arayla üç 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 beş dakika çalkalandı ve ardından ELISA yıkayıcısında yıkandı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.

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

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

5. Sonra hasta ve kontrol grubu serumları %1 BSA ihtiva eden seyreltme tamponunda 1/200 oranında seyreltildi ve her bir seyreltilmiş serum örneği iki kuyucuk CA II kaplanmamış ve iki kuyucuk CA II kaplanmış olmak üzere toplam dört kuyucuğa ayrı ayrı 100 µL pipetlendi ve iki saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi.

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

7. 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 bir saat çalkalayıcıda bekletildi.

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

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

10. 100 µL 2 M H₂SO₄ bütün kuyucuklara pipetlenerek reaksiyon durduruldu. ELISA okuyucusunda 485 nm'de absorbans okundu.

CA kaplanmış kuyucuklarda okunan absorbanların ortalamasından CA kaplanmamış kuyucuklarda okunan absorbanların ortalaması çıkarılarak sonuçlar elde edildi. Böylece serumlardaki anti-CA miktarları 485 nm'deki absorban artışı olarak hesaplandı.

5.2.3.Eritrosit Antioksidan Enzimler

Deneylere başlamadan önce hasta ve kontrol gruplarındaki bireylere ait eritrosit paketlerindeki hemoglobin değerleri ölçüldü. Ölçüm KTÜ Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda Beckman Coulter LH 750 tam otomatik kan sayım cihazı ile kendi orijinal solüsyonları kullanılarak yapıldı.

5.2.3.1.Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Süperoksit dismutaz aktivitesinin tayini, Sun ve Oberley'in metoduna göre yapıldı (55). Bu metod, ksantin-ksantin oksidaz sisteminin oluşturduğu süperoksit radikallerinin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgeyerek oluşturduğu mavi-mor rengin 560 nm de verdiği absorbanın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar yüksek ise ortamdan o kadar çok süperoksit uzaklaştırılacağı için reaksiyondan sonra oluşan rengin şiddeti daha az olmalıdır.

Kullanılan Çözeltiler

1. 0.3 mmol/L ksantin çözeltisi: 0.0456 g ksantin tartıldı ve 1 L deiyonize suda çözüldü.

2. 0.6 mmol/L EDTA çözeltisi: 0.056 g EDTA tartıldı ve 250 mL deiyonize suda çözüldü.

3. 150 µM NBT çözeltisi: 1.2265 mg NBT tartıldı ve 10 mL deiyonize suda çözüldü. NBT günlük taze hazırlandı ve SOD reaksiyon karışımına en son eklendi

4. 400 mM Na₂CO₃ çözeltisi: 2.12 g Na₂CO₃ tartıldı ve 50 mL deiyonize suda çözüldü.

5. 1g/L BSA: 100 mL deiyonize suda 0.1 g BSA çözüldü.

Yukarıdaki beş çözelti karıştırılarak SOD reaksiyon karışımı elde edildi.

6. 167 U/L ksantin oksidaz çözeltisi: 27.3 U/mL'lik orijinal şişeden 12.2 µL alınıp 2 mL ye tamamlandı. Ksantin oksidaz günlük hazırlandı.

7. 0.8 mmol/L CuCl₂ çözeltisi: 0.027 g CuCl₂ tartıldı ve 250 mL deiyonize suda çözöldü. Günlük taze hazırlandı. Spektrofotometrik ölçömden hemen önce, oluşın reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

8. 2 mol/L amonyum sülfat: 13.2 g amonyum sülfat 50 mL deiyonize suda çözöldü. Ksantin oksidaz enziminin dilüsyonunda kullanıldı.

Deneyin Yapılışı

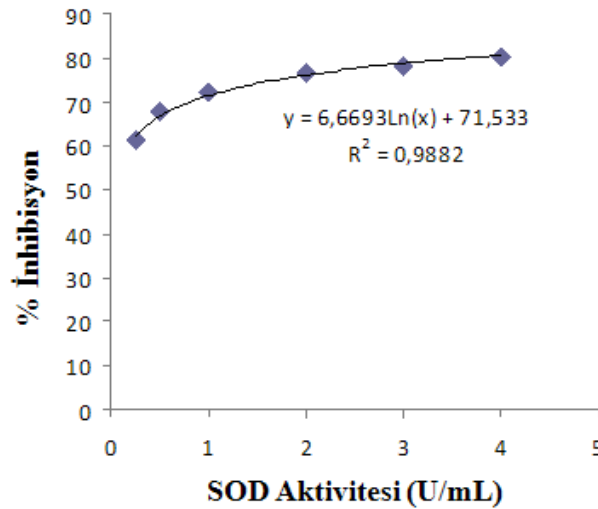
Tablo 4’de ifade edildiğı gibi pipetlemeler ve işlemler yapıldı.

Tablo 4. SOD aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı

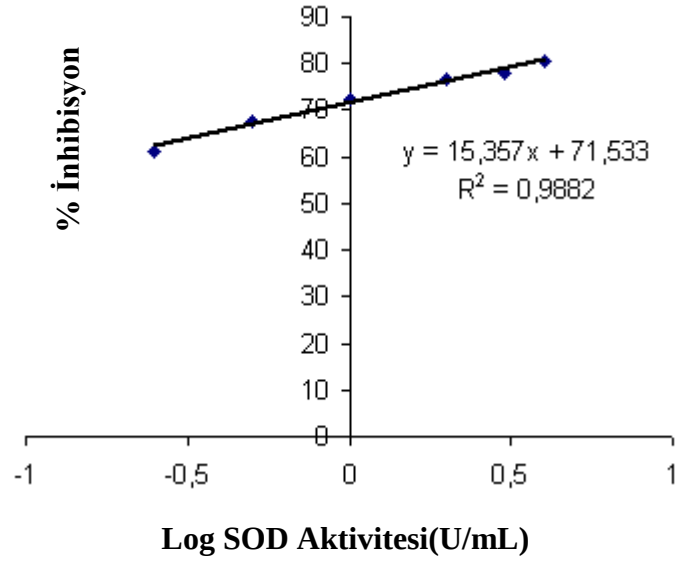
Çözeltiler	Miktar(mL)
Reaksiyon karışımı	2.45
Numune/Standart	0.5
Ksantin oksidaz	0.05
25 °C’de 20 dakika inkübasyona bırakıldı(karanlıkta).	
Bakır klorür	1.00
560 nm’de absorbans ölçöldü.	

Hesaplamalar % inhibisyon olarak hesaplandı. şekil 1’deki standart grafiğı SOD aktivitesinin logaritması alınarak şekil 2’deki lineer standart grafiğıne dönüştüröldü. Bu standart grafiğınden yararlanılarak % inhibisyonlar SOD aktivitesine dönüştüröldü. Sonuçlar hemoglobin miktarına bölünerek U/g Hb olarak hesaplandı.

$$\%inhibisyon=(A\text{ kör}-A\text{ numune})/A\text{ kör} \times 100 \text{ (1)}$$



Şekil 1. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiğı



Şekil 2. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği.

5.2.3.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini

Hidrojen peroksidin oksijen ve suya hidrolizini katalizleyen katalaz aktivitesinin tayininde Aebi'nin metodu kullanıldı (56). 240 nm'de H_2O_2 'nin bozulması sonucu absorbanstaki düşüş takip edildi.

Çözeltilerin Hazırlanması

1. 50 mM fosfat tamponu (pH 7.06): 81 g KH_2PO_4 , 1L ve 8.90 g $Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 1L deiyonize suda çözüldü. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1.5 oranında karıştırıldı. Gerektiğinde asit veya baz ilavesiyle pH 7.0'a ayarlandı.

2. 30 mM hidrojen peroksit: 0.34 mL %30'luk H_2O_2 alınarak fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı. Günlük hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Eritrosit paketleri hemoglobin konsantrasyonu 5g/dL olacak şekilde seyreltilerek hemolizatlar hazırlandı ve Tablo 5'de ifade edildiği gibi pipetlemeler yapıldı.

Tablo 5. Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı.

	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	1.00	--
Numune	2.00	2.00
H₂O₂	--	1.00

Hidrojen peroksit ilave edilir edilmez 30 s boyunca 240 nm’de absorbanlardaki düşüş izlendi. Katalaz aktivitesinde birim olarak birinci derece reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. 10 s’lik zaman aralığı için aşağıdaki formülden yararlanılarak aktivite hesaplandı. Seyreltme faktörü ile çarpıldı. Eritrositlerde gram Hb başına aktivite hesabı yapıldı (k / g Hb).

$$k=0.153 \times \log A_1/A_2 \text{ s}^{-1} \times \text{g Hb (2)}$$

A1=10 s sonraki absorbans

A2=20 s sonraki absorbans

5.2.4. Protein Karbonil Düzeyi Tayini

Protein karbonil içeriği Levine ve ark. tarafından 2,4 dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile protein karbonillerinin reaksiyonu ile belirlenmiştir (57).

Kullanılan Çözeltiler

1. % 20’lik TCA: 30 g TCA tartıldı 150 mL saf suda çözüldü.

2.% 10’luk TCA:15 g TCA tartıldı 150 mL saf suda çözüldü.

3.10 mM DNPH çözeltisi: 0.198 g DNPH tartıldı 100 mL 2.5M HCl ‘de çözüldü.

4.2 M HCl çözeltisi: % 37’lik HCl ‘den 52 mL alındı 250 mL ‘ye tamamlandı.

5. Etanol-etil asetat çözeltisi (1:1) (360 mL): 180 mL etanol ile 180 mL etil asetat karıştırıldı.

6.20 mM KH₂PO₄: 0.272g KH₂PO₄ tartıldı ve 100 mL’ye saf suyla tamamlandı.

7.6M Guanidin hidroklorür: 57.3g guanidin hidroklorür 80mL 20mM KH₂PO₄’ de çözüldü ve pH TFA ile 2.3’e ayarlandı. Son hacim 20mM KH₂PO₄ ile 100 mL’ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

1. Her numune için numune körü hazırlandı. Serum örnekleri 1:10 oranında serum fizyolojik ile seyreltilti. Numune ve numune körleri için hazırlanan ependorflara 100'er µL serum eklendi.

2. Numuneye 500 µL DNPH, numune körüne ise 500 µL HCl ilave edildi.

3. Numuneler ve numune körleri karanlık ortamda bir saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyonun ardından 500 µL soğuk %20 'lik TCA buz üzerine alınan numune ve numune körlerine ilave edildi. TCA ilave edildikten sonra buz üzerinde 15 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirildi.

5. 11 000 rpm'de beş dakika +4 °C 'de santrifüj edildi.

6. Süpernatant atıldı pellet üzerinden devam edildi. Pellet 500 µL %10 TCA ile yine buz üzerinde çözüldü.

7. 11 000 rpm'de beş dakika +4 °C 'de santrifüj edildi.

8. Süpernatant kısım atıldı pellet 500 µL etanol:etil asetat ile çözüldü. 3000 rpm 'de 7 dakika santrifüj edildi. Bu basamak üç kez tekrar edildi.

9. Pellet 250 µL guanidin hidroklorit ile çözüldükten sonra 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

10. Pleyte 220 µL numune ve numune körleri yüklendi ve 360 nm 'de ölçüm yapıldı. Eş. 3'e göre konsantrasyon hesaplandı.

$$\Delta Abs = a \times b \times c \quad (3)$$

5.2.5.Total Antioksidan Seviye (TAS) Tayini

TAS seviyeleri üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ticari kolorimetrik assay kit (Rel Assay, Ref. RL27, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Örneklerin absorbansları 660 nm dalga boyunda VERSA max tunable microplate reader (Designed by molecular Devices in California, USA) kullanılarak belirlendi. Serum TAS seviyeleri mmol Trolox equivalent/L cinsinden verildi.

$$\text{Total Antioksidan Seviye} = [(\Delta Abs_{Std1}) - (\Delta Abs_{numune})] / [(\Delta Abs_{Std1}) - (\Delta Abs_{Std2})] \quad (4)$$

Deneyin Yapılışı

Tablo 6'deki pipetlemeler ve işlemler yapıldı.

Tablo 6. TAS ölçümü için reaksiyon karışımı

	Numune(μ L)	Standart(μ L)	Kör(μ L)
Numune	10	-	-
Standart	-	10	-
Kör	-	-	10
Reaktif 1	166	166	166
660 nm’de absorbands ölçümü ELISA okuyucusunda yapıldı (A1).			
Reaktif 2	25	25	25
10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir ve 660’nm de ölçüm yapılır(A2).			

5.2.6.Total Oksidan Seviye (TOS) Tayini

TOS seviyeleri üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ticari kolorimetrik assay kit (Rel Assay, Ref. RL27, Türkiye) kullanılarak ölçüldü. Örneklerin absorbandsları 530 nm dalga boyunda VERSA max tunable microplate reader (Designed by molecular Divices in California, USA) kullanılarak belirlendi. Serum TOS seviyeleri μ mol H₂O₂ equivalent/L cinsinden verildi.

Total Oksidan Seviye = (Δ Abs numune/ Δ Abs Std2)x20x20 μ mol H₂O₂ Equivalent/L (5)

Standart Hazırlanışı

Standart 2 Hazırlanışı: 800 mM’lık stoktan 25 μ L alınır 5 mL deiyonize suya ilave edilir. Hazırlanan çözeltiden 25 μ L alınır 5 mL suya ilave edilerek 40.000 kat seyreltme yapılır. 20 mM’lık standart 2 çözeltisi elde edilir.

Deneyin Yapılışı

Tablo 5’deki pipetlemeler ve işlemler yapıldı.

Tablo 7. TOS ölçümü için reaksiyon karışımı

	Numune(μ L)	Standart(μ L)	Kör(μ L)
Numune	30	-	-
Standart	-	30	-
Kör	-	-	30
Reaktif 1	200	200	200
530 nm’de absorbands ölçümü ELISA okuyucusunda yapıldı (A1).			
Reaktif 2	10	10	10
10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir ve 530’nm de ölçüm yapılır(A2).			

5.2.7.Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

TOS'nin TAS'ye oranı alınarak OSİ değeri hesaplandı. Hesaplama sırasında, TAS değerlerinin birimi, mmol Trolox equivalent/L cinsinden μmol Trolox equivalent/L cinsine dönüştürüldü.

$$\text{OSİ} = \left[\frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}}{\text{TAS, mmol Trolox equivalent/L}} \times 100 \right]$$
 formülü kullanılarak hesaplandı (6).

5.3. İstatistiksel analiz

Hasta grupları ile kontrol grubu arasında değerlerin normal dağılıma uygunlukları Kolmogorow Simirnov testiyle tespit edildikten sonra uygulanacak istatistiki yöntem belirlendi. Normal dağılıma uymayan (anti-CA I, anti-CA II, TOS, OSI, protein karbonil grubu, SOD) parametrelerindeki karşılaştırmalar Student-t testi ile normal dağılıma uyan (TAS, katalaz) parametrelerindeki karşılaştırmalar ise Mann Whitney-U testi ile yapıldı. Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart hata olarak sunuldu. Korelasyon analizleri için Spearman korelasyon analiz testi kullanıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Hipotiroidi, Hipertiroidi ve Kontrol Grubunda Anti-CA I, Anti-CA II, SOD, Katalaz, TAS, TOS, OSI, Protein Karbonil Grubu Düzeyi Sonuçları

Tez çalışmamızda hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubuna ait serum örneklerinde anti-CA I, anti-CA II, TAS, TOS, OSI, protein karbonil grubu ve eritrosit paketlerinde SOD, katalaz düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar Tablo 8’de gösterildi.

Tablo 8. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda anti-CA I, anti-CA II, SOD, katalaz, TAS, TOS, OSI, protein karbonil grubu düzeyleri

Parametreler	Gruplar		
	Kontrol	Hipotiroidi	Hipertiroidi
n	52	39	69
Anti-CA I	0.126 ± 0.033	0.202 ± 0.141*	0.167 ± 0.072*
Anti-CA II	0.090 ± 0.039	0.220 ± 0.169**	0.161 ± 0.136**
SOD	16.1 ± 15.9	22.6 ± 12.1*	25.0 ± 18.2*
Katalaz	0.586 ± 0.181	0.652 ± 0.217	0.595 ± 0.178
TAS	1.95 ± 0.30	1.91 ± 0.30	1.88 ± 0.25
TOS	0.929 ± 0.22	2.10 ± 1.44**	2.15 ± 1.40**
OSI	0.049 ± 0.01	0.111 ± 0.073**	0.117 ± 0.09**
Protein karbonil grubu	0.900 ± 0.87	0.221 ± 0.09	0.991 ± 1.15

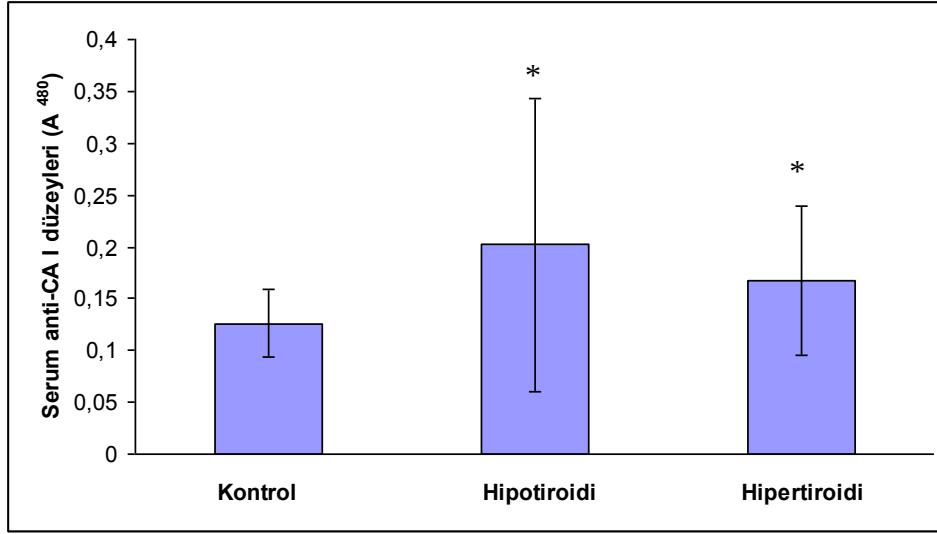
* $P = 0.001$ (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

** $P = 0.0001$ (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

Hipotiroidi ve hipertiroidi grupları mevcut parametreler açısından değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($P > 0.05$). Hipotiroidi grubu ile hipertiroidi grubu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında sırasıyla SOD aktivitesi için $p=0.892$, anti-CA I için $p=0.135$, anti-CA II için $p=0.055$, protein karbonil grubu düzeyi için $p=0.245$, TOS için $p=0.648$, OSI için $p=0.732$, katalaz için $p=0.097$ ve TAS için $p=0.674$ olarak belirlendi.

6.1.1. Karbonik Anhidraz I Otoantikor Sonuçları

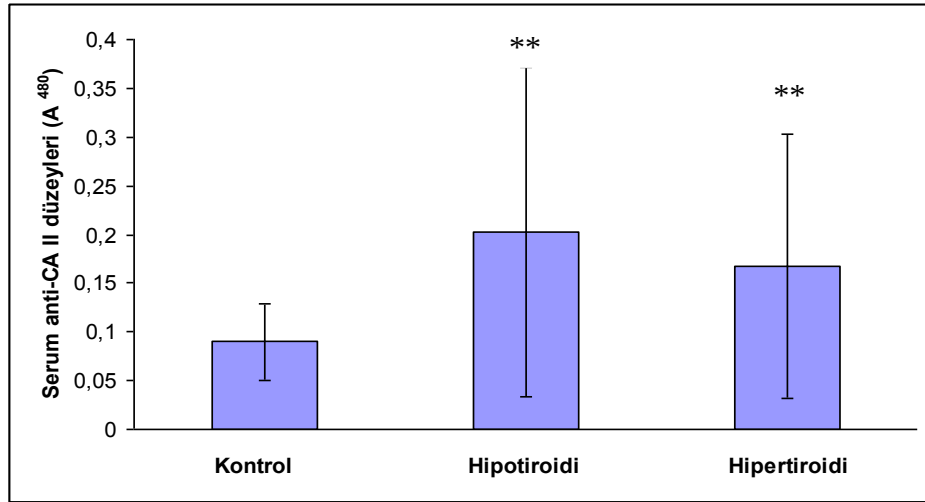
Karbonik anhidraz I otoantikor bulguları Şekil 3 ve Tablo 8’de gösterildi. Hipotiroidi ve hipertiroidi hastalarında anti-CA I düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek seviyede belirlendi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu ($p<0.001$). Hipotiroidide anti-CA I düzeyi 0.202 ± 0.141 , hipertiroidide 0.167 ± 0.072 , kontrol grubunda ise 0.126 ± 0.033 olarak belirlendi.



Şekil 3. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda anti-CA I düzeyleri. Hipotiroidi ve hipertiroidi hastalarında anti-CA I seviyeleri kontrol grubuna göre $p<0.001$ düzeyinde farklıdır.

6.1.2. Karbonik Anhidraz II Otoantikor Sonuçları

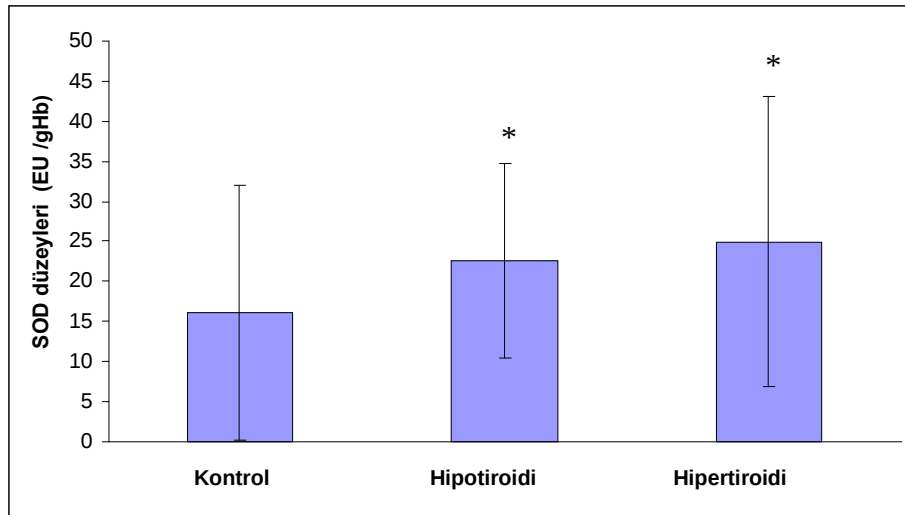
Hipotiroidi ve hipertiroidi hastalarında anti-CA II düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek seviyede belirlendi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu ($p<0.001$). Hipotiroidide anti-CA II düzeyi 0.220 ± 0.169 , hipertiroidide 0.161 ± 0.136 , kontrol grubunda ise 0.090 ± 0.039 olarak belirlendi (Şekil 4) (Tablo 8).



Şekil 4. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda anti-CA II düzeyleri. Hipotiroidi ve hipertiroidi hastalarında anti-CA II seviyeleri kontrol grubuna göre $p<0.001$ düzeyinde farklıdır.

6.1.3. Süperoksit Dismutaz Ölçüm Sonuçları

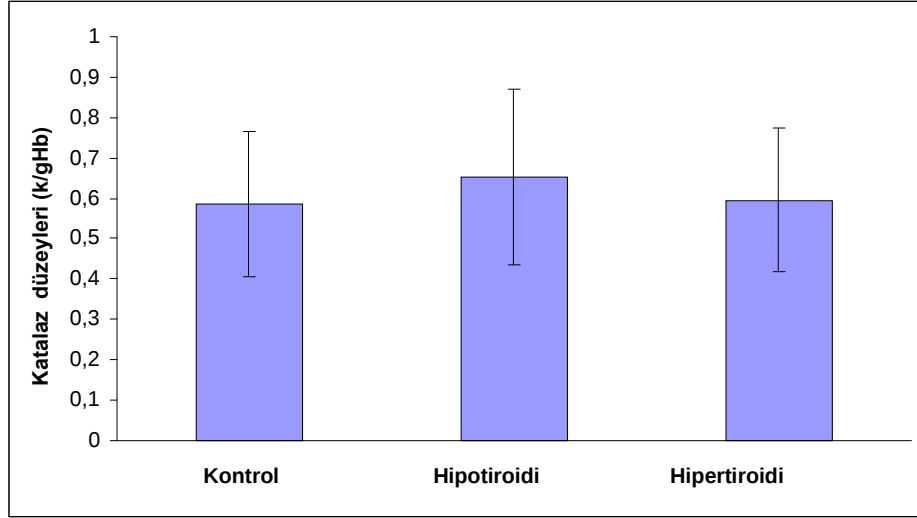
Hipotiroidi ve hipertiroidi hastaların SOD aktivitesi düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede tespit edildi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu ($p<0.001$). Hipotiroidide SOD aktivitesi düzeyi 22.6 ± 12.1 hipertiroidide 25.0 ± 18.2 ve kontrol grubunda ise 16.1 ± 15.9 olarak belirlendi (Şekil 5) (Tablo 8).



Şekil 5. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda SOD düzeyleri. Hipotiroidi ve hipertiroidi hastalarında SOD aktivitesi kontrol grubuna göre $p<0.001$ düzeyinde farklıdır.

6.1.4. Katalaz Sonuçları

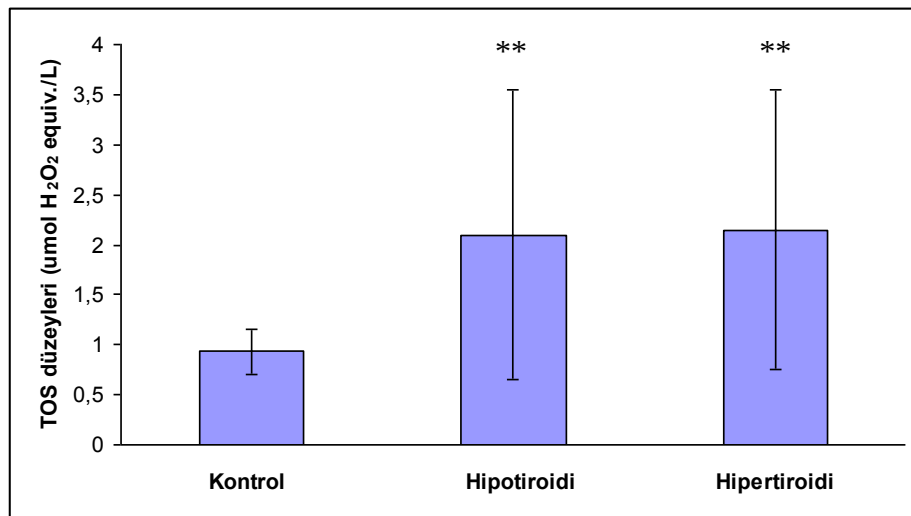
Hipotiroidide katalaz aktivitesi 0.652 ± 0.217 , hipertiroidide 0.595 ± 0.178 ve kontrol grubunda ise 0.586 ± 0.181 olarak belirlendi (Şekil 6) (Tablo 8).



Şekil 6. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda katalaz düzeyleri

6.1.5. Total Oksidan Seviye Sonuçları

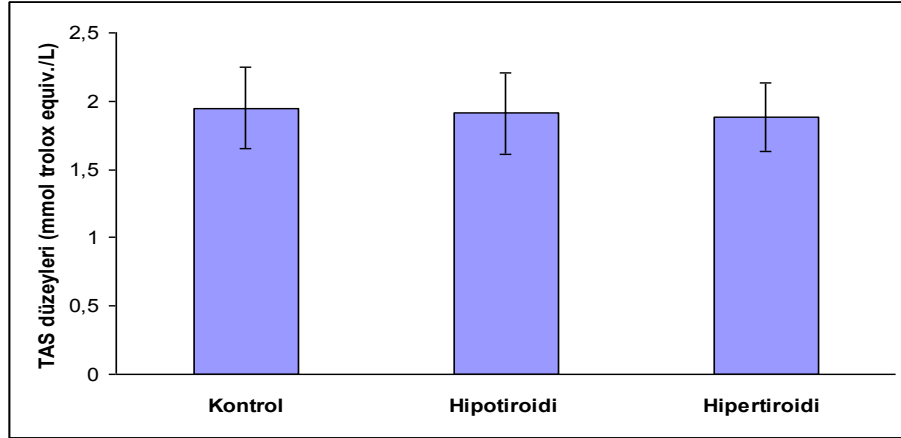
Hipotiroidi ve hipertiroidi hastalarında TOS düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek seviyede belirlendi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Hipotiroidili hastalarda TOS düzeyi 2.10 ± 1.44 , hipertiroidide 2.15 ± 1.40 , kontrol grubunda ise 0.929 ± 0.22 olarak belirlendi (Şekil 7) (Tablo 8).



Şekil 7. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda TOS düzeyleri. Hipotiroidi ve hipertiroidi hastalarında TOS kontrol grubuna göre $p < 0.001$ düzeyinde farklıdır.

6.1.6. Total Antioksidan Seviye Sonuçları

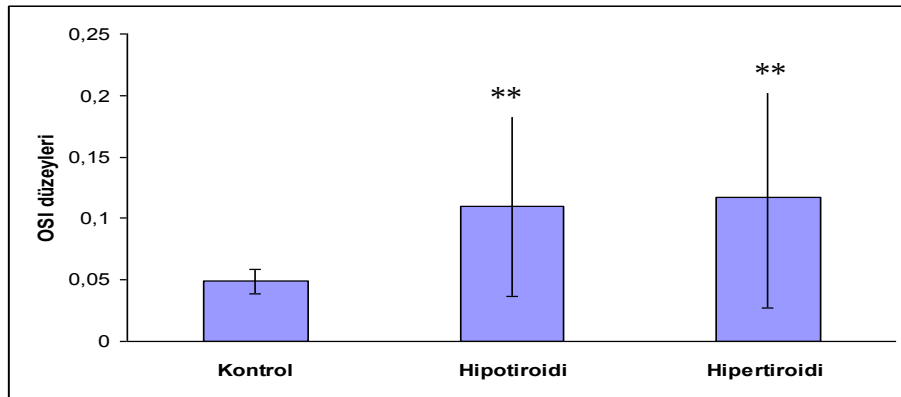
Hipotiroidili hastalarda total antioksidan seviye düzeyi 1.91 ± 0.30 , hipertiroidide 1.88 ± 0.25 ve kontrol grubunda ise 1.95 ± 0.30 olarak belirlendi (Şekil 8) (Tablo 8). Hipotiroidi ve hipertiroidi hastalarının total antioksidan seviyeleri ile kontrol grubunun total antioksidan seviyesi arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı.



Şekil 8. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda TAS düzeyleri

6.1.7. Oksidatif Stres İndeksi Sonuçları

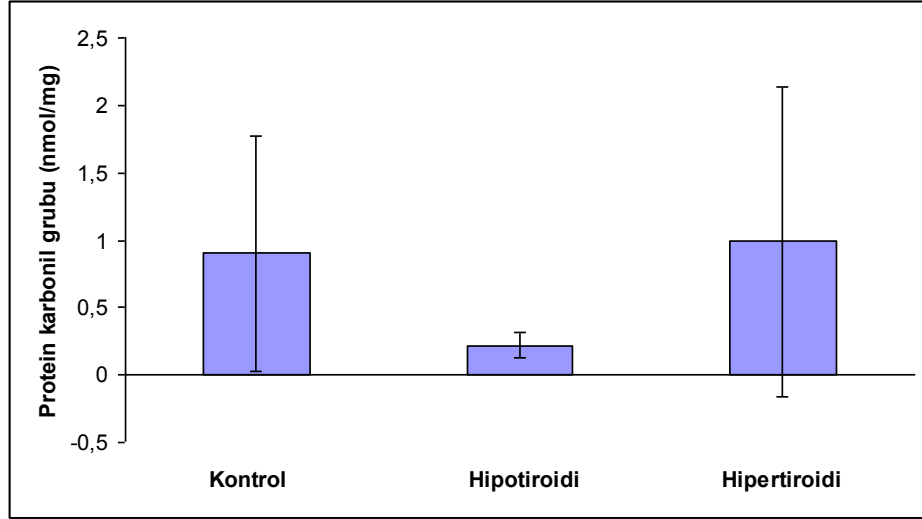
Hipotiroidi ve hipertiroidi hastalarında OSI düzeyi kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede tespit edildi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Hipotiroidide OSI düzeyi 0.111 ± 0.073 , hipertiroidide 0.117 ± 0.09 ve kontrol grubunda ise 0.049 ± 0.01 olarak belirlendi (Şekil 9) (Tablo 8).



Şekil 9. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda OSI düzeyleri. Hipotiroidi ve hipertiroidi hastalarında OSI kontrol grubuna göre $p < 0.001$ düzeyinde farklıdır.

6.1.8. Protein Karbonil Grubu Sonuçları

Hipotiroidili hastaların serum protein karbonil grubu düzeyi 0.221 ± 0.09 , hipertiroidide 0.991 ± 1.15 ve kontrol grubunda ise 0.900 ± 0.87 olarak belirlendi (Şekil 10) (Tablo 8). Hipotiroidi ve hipertiroidi hastalarının protein karbonil grubu düzeyleri ile kontrol grubunun protein karbonil grubu düzeyleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı.



Şekil 10. Hipotiroidi, hipertiroidi ve kontrol grubunda protein karbonil grubu düzeyleri

6.2. Hipotiroidili ve Hipertiroidili Hastaların Anti-CA I ve Anti-CA II Düzeyleri ile TAS, TOS, OSI, Protein Karbonil Grubu, SOD, Katalaz Düzeylerine İlişkin Korelasyon Sonuçları

Çalışmamızdaki hipotiroidili ve hipertiroidili hastaların anti-CA I ve anti-CA II düzeyleri ile TAS, TOS, OSI, protein karbonil grubu, SOD, katalaz düzeylerine ilişkin korelasyon sonuçları Tablo 9 ve Tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 9. Hipotiroidili hastaların anti-CA I ve anti-CA II düzeyleri ile TAS, TOS, OSI, protein karbonil grubu, SOD, katalaz düzeylerine ilişkin korelasyon sonuçları

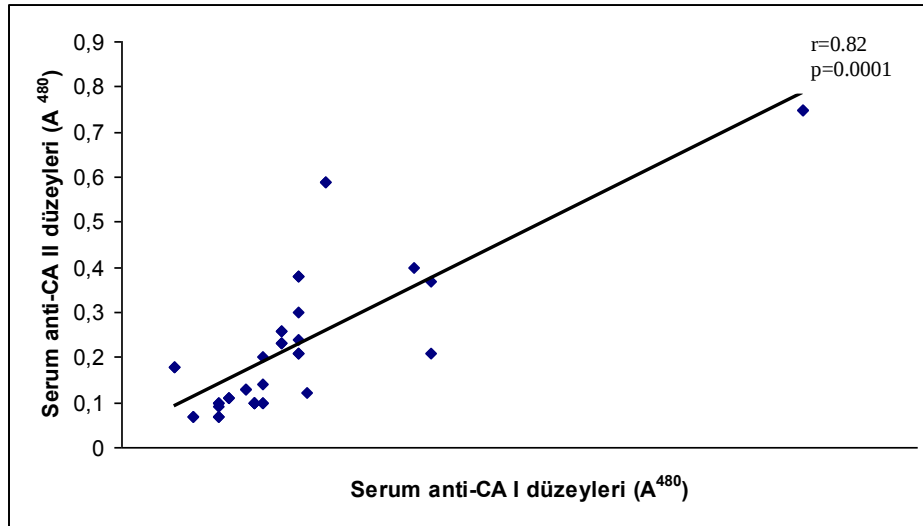
	Anti-CA I	Katalaz	SOD	Protein karbonil grubu	TAS	TOS	OSI
Anti-CA I		0.02 (0.46)	-0.069 (0.375)	-0.056 (0.39)	0.087 (0.34)	-0.12 (0.29)	-0.109 (0.302)
Anti-CA II	0.82 (0.0001)	-0.05 (0.41)	-0.20 (0.18)	-0.09 (0.34)	0.32 (0.06)	-0.04 (0.42)	-0.11 (0.30)

Tablo 10. Hipertiroidili hastaların anti-CA I ve anti-CA II düzeyleri ile TAS, TOS, OSI, protein karbonil grubu, SOD, katalaz düzeylerine ilişkin korelasyon sonuçları

	Anti-CA I	Katalaz	SOD	Protein karbonil grubu	TAS	TOS	OSI
Anti-CA I		0.07 (0.34)	-0.032 (0.424)	-0.035 (0.016)	0.064 (0.35)	-0.052 (0.38)	-0.023 (0.44)
Anti-CAII	0.572 (0.0001)	-0.17 (0.15)	-0.14 (0.20)	-0.45 (0.002)	-0.09 (0.29)	0.12 (0.24)	-0.17 (0.13)

6.2.1. Hipotiroidili Hasta Grubunda Anti-CA I ve CA II Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Sonuçları

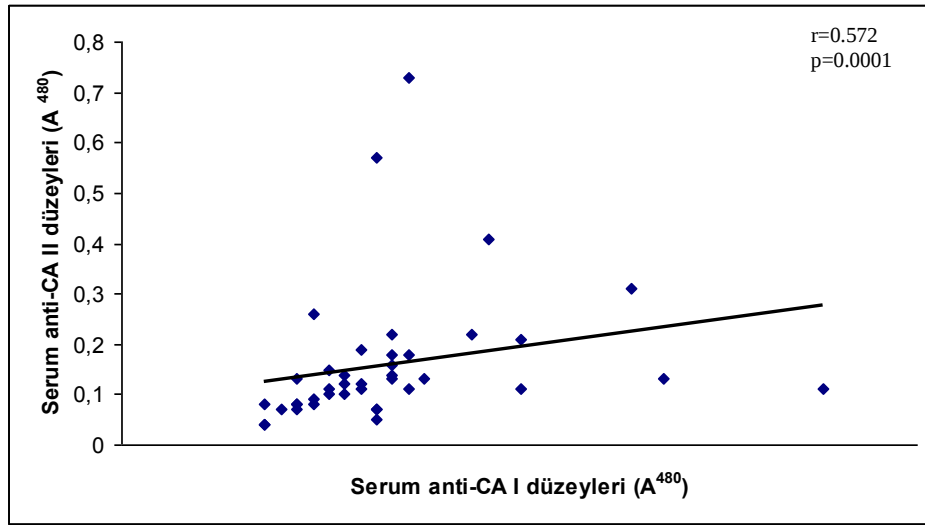
Hipotiroidili hasta grubunda anti-CA I ile CA II arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir korelasyon saptanmıştır ($r=0.82$, $p=0.0001$) (Şekil 11) (Tablo 9).



Şekil 11. Hipotiroidi grubunda anti-CA I ve CA II düzeyleri arasındaki korelasyon

6.2.2. Hipertiroidili Hasta Grubunda Anti-CA I ile CA II Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Sonuçları

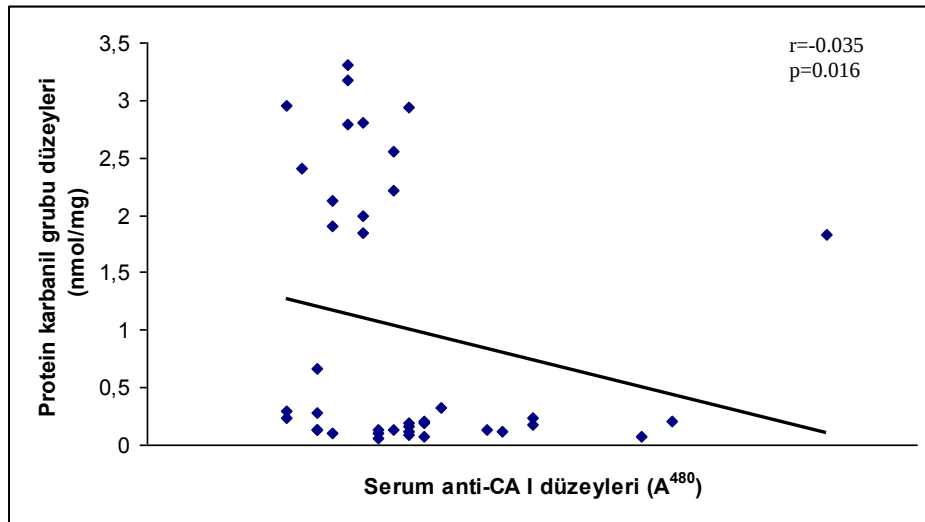
Hipertiroidili hasta grubunda anti-CA I ve CA II arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir korelasyon saptanmıştır ($r=0.572$, $p=0.0001$) (Şekil 12) (Tablo 10).



Şekil 12. Hipertiroidi grubunda anti-CA I ve CA II düzeyleri arasındaki korelasyon

6.2.3. Hipertiroidili Hasta Grubunda Anti-CA I Düzeyleri ile Protein Karbonil Grubu Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Sonuçları

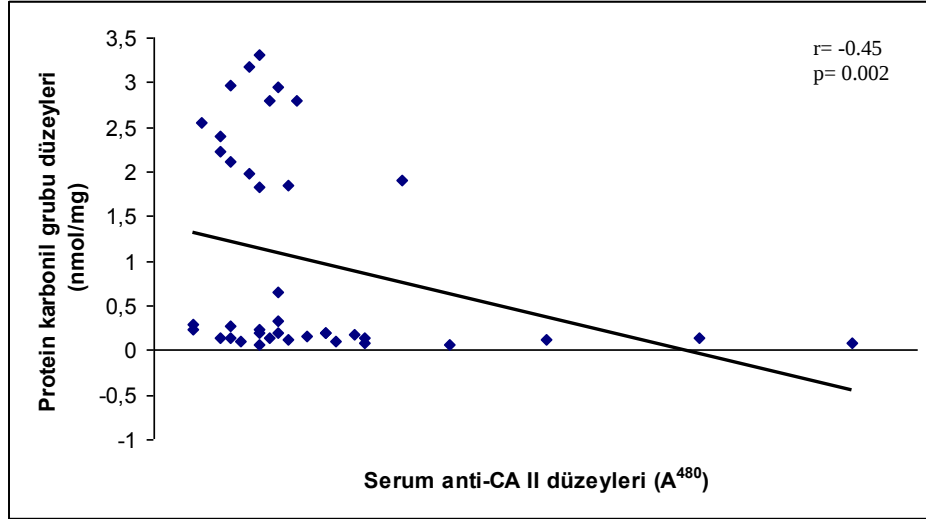
Hipertiroidili hasta grubunda anti-CA I düzeyleri ile protein karbonil grubu düzeyleri arasında negatif bir korelasyon tespit edilmiştir ($r = -0.035$, $p=0.016$) (Şekil 13) (Tablo 10).



Şekil 13. Hipertiroidi grubunda anti-CA I düzeyleri ve protein karbonil grubu düzeyleri arasındaki korelasyon

6.2.4. Hipertiroidili Hasta Grubunda Anti-CA II Düzeyleri ile Protein Karbonil Grubu Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Sonuçları

Hipertiroidili hasta grubunda anti-CA II düzeyi ile protein karbonil grubu düzeyleri arasında negatif bir korelasyon tespit edilmiştir ($r = -0.45$, $p = 0.002$) (Şekil 14) (Tablo 10).

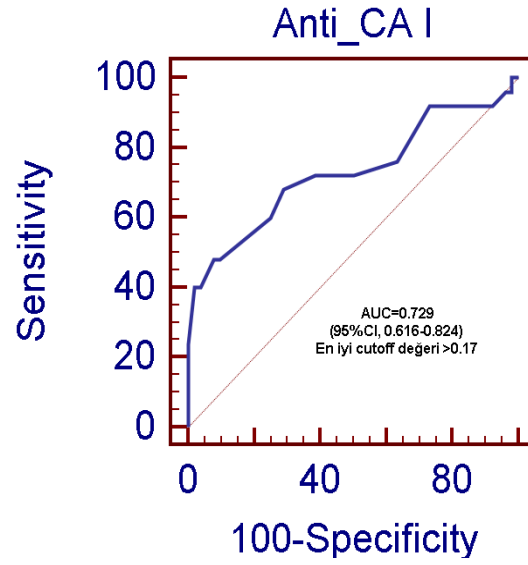


Şekil 14. Hipertiroidi grubunda anti-CA II düzeyleri ve protein karbonil grubu düzeyleri arasındaki korelasyon

6.3. ROC Analizi Sonuçları

6.3.1. Hipotiroidi Grubu ile Kontrol Grubu Arasında Anti-CA I Sonuçları

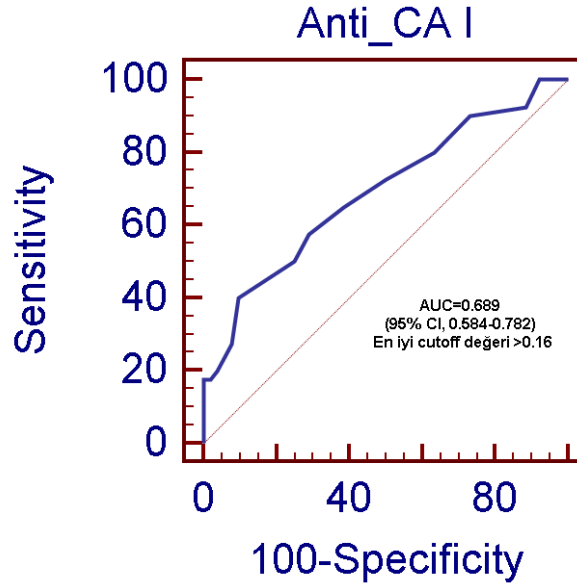
Hipotiroidi grubu ile kontrol grubu arasında anti-CA I düzeyi ROC analizi sonucu Şekil 15’de gösterilmiştir.



Şekil 15. Hipotiroidi grubu ile kontrol grubu arasında anti-CA I sonuçları

Hipotiroidi-kontrol arasında AUC=0.729, sensitivity=48. Spesificity=92.3, PPV=75 (95% CI, 46.6-93.1), NPV= 78.7 (95% CI, 66.3-88.1).

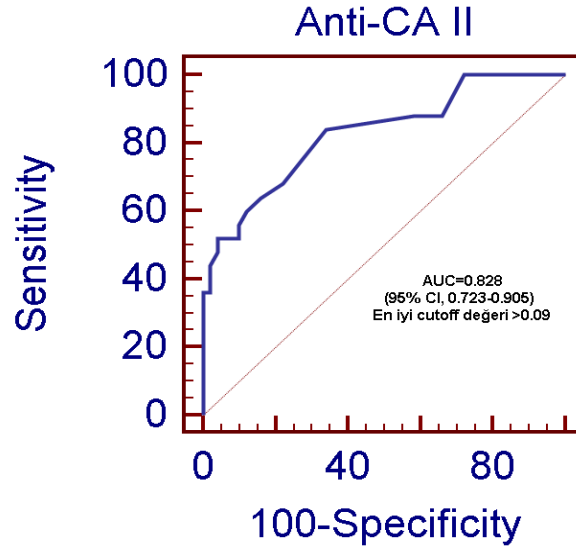
6.3.2. Hipertiroidi Grubu ile Kontrol Grubu Arasında Anti-CA I Sonuçları



Şekil 16. Hipertiroidi grubu ile kontrol grubu arasında anti-CA I sonuçları

Hipertiroidi-kontrol arasında AUC=0.689, sensitivity=40. Spesificity=90.4, PPV=76.2 (95% CI, 52.8-91.8), NPV= 66.2 (95% CI, 54.0-77.0).

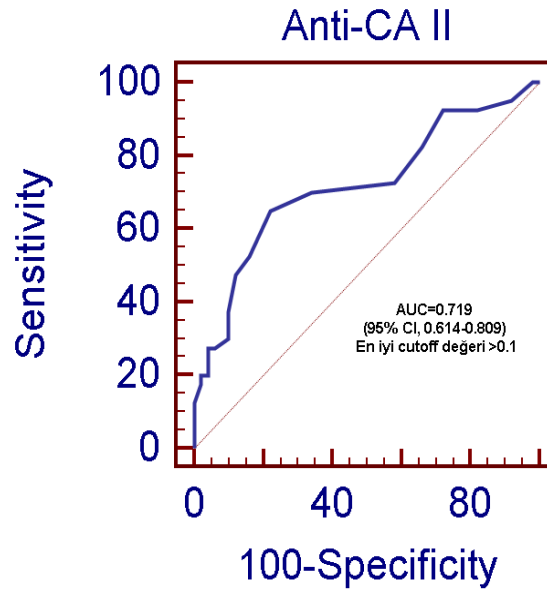
6.3.3. Hipotiroidi Grubu ile Kontrol Grubu Arasında Anti-CA II Sonuçları



Şekil 17. Hipotiroidi grubu ile kontrol grubu arasında anti-CA II sonuçları

Hipotiroidi-kontrol arasında AUC=0.828, sensitivity=84. Spesificity=66, PPV= 55.3 (95% CI, 74.6-97), NPV= 89.2 (95% CI, 38.1-71.6).

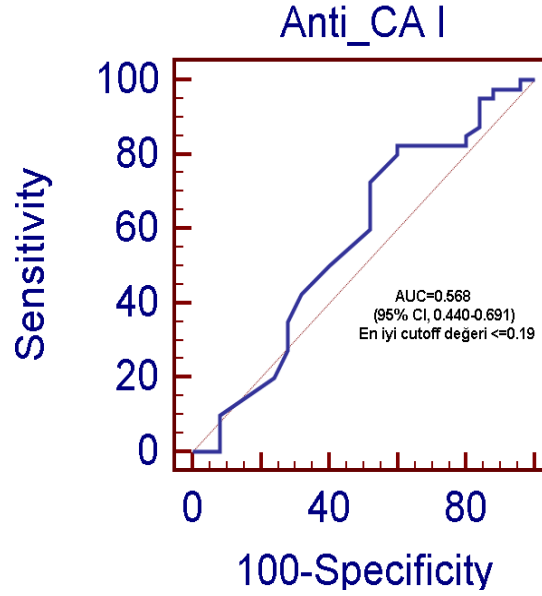
6.3.4. Hipertiroidi Grubu ile Kontrol Grubu Arasında Anti-CA II Sonuçları



Şekil 18. Hipertiroidi grubu ile kontrol grubu arasında anti-CA II sonuçları

Hipertiroidi-kontrol arasında AUC=0.719, sensitivity=65. Spesificity=78, PPV= 70.3 (95% CI, 52.8-84.3), NPV= 73.6 (95% CI, 59.5-84.8).

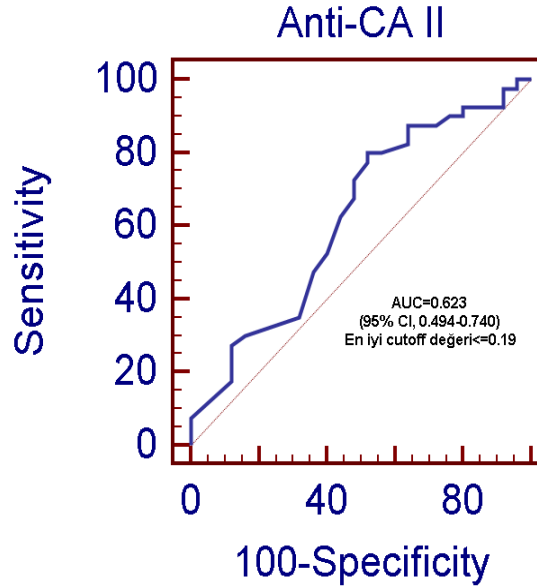
6.3.5. Hipertiroidi Grubu ile Hipotiroidi Grubu Arasında Anti-CA I Sonuçları



Şekil 19. Hipertiroidi grubu ile hipotiroidi grubu arasında anti-CA I sonuçları

Hipertiroidi-hipotiroidi arasında AUC=0.568, sensitivity=82.5. Spesificity=40, PPV= 68.7 (95% CI, 53.6-81.5), NPV= 58.8 (95% CI, 32.9-81.6)

6.3.6. Hipertiroidi Grubu ile Hipotiroidi Grubu Arasında Anti-CA II Sonuçları



Şekil 20. Hipertiroidi grubu ile hipotiroidi grubu arasında anti-CA II sonuçları

Hipertiroidi-hipotiroidi arasında AUC=0.623, sensitivity=80. Spesificity=48, PPV= 71.1 (95% CI, 55.5-83.8), NPV= 60 (95% CI, 35.4-81.4).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbonik anhidraz (karbonat hidrolizaz, E.C.4.2.1.1) bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir. Canlılarda CO_2 'nin hidratasyonu ve HCO_3^{-} 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlemektedir (1). Memelilerde bulunan CA'ların doku dağılımı, hücre içi yerleşimleri ve kinetik özellikleri farklı on altı ayrı (CA I-XVI) izoenzimi tarif edilmiştir (20). CA I insan eritrosit hücrelerinde bol bulunan izoenzimdir (24). CA II ise, böbrek tubulus hücrelerinde, gözde, processus siliariste, eritrositlerde, mide mukozasında, beyinde, karaciğerde, pankreatik kanal ve endotel hücrelerinde, trombositlerde ve spermatozoada olmak üzere organizmada yaygın olarak bulunur (26).

Tiroid hastalıkları tiroid hormonlarının aşırı salınımı (hipertiroidi) ve tiroid hormonlarının eksikliği (hipotiroidi) ile ilgili durumları ve tiroidin kitle lezyonlarını içerir (6,7). Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya otoimmünite, otoimmünizasyonun rol oynadığı hastalıklara da otoimmün hastalıklar denilmektedir. Hashimoto ve Graves hastalığı gibi tiroid hastalıkları otoimmün özelliktedir (8).

CA I ve II otoantikörlerinin otoimmün hastalıkların patolojisindeki rolü anlaşılamamıştır. Bazı araştırmacılara göre, hastalığın patolojik seyrine bağlı oluşan doku harabiyetinin bir sonucu olarak karbonik anhidraza karşı bir antikor oluşturulmaktadır. Diğer taraftan bazı araştırmacılara göre ise, meydana gelen antikorlar moleküler taklitten (molecular mimicry) dolayı farklı bir antijene karşı üretilmiş antikörün CA ile çapraz reaksiyon vermesinden kaynaklanmaktadır (38).

Reaktif oksijen türlerinin biyomoleküllerle tepkimeye girmesi sonucu gelişen patolojik duruma 'oksidatif stres' denir (44,45). Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içindedir ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif stres, oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar lehine kayması sonucunda gelişir (58).

Tiroid hormonları birçok memeli türünde dokularda bazal enerji metabolizmasını hızlandırmaktadır (8,9) Tiroid hormonları enerji metabolizması üzerindeki bu etkisini oksijen tüketimini artırarak ve oksidatif fosforilasyonu içeren bazı mitokondriyal solunum zinciri bileşenlerinin aktivite ve sayısında değişikliğe sebep olarak göstermektedir (8,10).

Hipertiroidi tiroid hormon yapımının artışıyla oluşan klinik tablodur (29). Enerji metabolizması ve ısı oluşumu normale nazaran daha çok uyarıldığından, bazal metabolizma hızı artmaktadır. Oluşan hipermetabolik durumun mitokondriyal elektron transport bölgesinde süperoksit radikalının oluşumunda artışa yol açtığı bildirilmiştir. Artan süperoksit radikalleri lipid peroksidasyonunun başlamasında rol oynayan radikal türlerinin oluşumuna zemin hazırlamakta ve mitokondride serbest radikal oluşumunu hızlandırmaktadır bundan dolayı oksidan artışını dengelemek üzere antioksidan koruma sisteminde de değişiklikler olmaktadır (9,11,12).

Hipotiroidide ise, tiroid hormon seviyesindeki azalma bazal metabolizma hızının düşmesine ve metabolik baskılanmaya yol açmaktadır. Bunun sonucu olarak, serbest radikal oluşumunun azaldığı ve dokuların lipid peroksidasyonuna karşı korunduğu bildirilmiştir (11). Diğer taraftan, hipotiroidi hastalarında artmış T3 seviyesi belirlenebilir. T3'ün testis hariç, bütün dokularda kısmen Na⁺-K⁺ ATPaz'ı uyararak oksijen tüketimini ve ısı üretimini arttırdığı belirtilmiştir. T3'ün bu etkisi bazal metabolik hızda artışa neden olmaktadır (58).

Çalışmamızda, tiroid hastalarında oksidatif stres belirteçleri ile anti-CA I ve anti-CA II düzeylerini ölçüp, bu parametreler arasında bir korelasyon olup olmadığının ve bu parametrelerden tiroid hastalığının tanısında yararlanılıp yararlanılamayacağını belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamız sonucunda, hipotiroidi ve hipertiroidili hastalarda anti-CA I ve anti-CA II düzeyleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuş ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür (p<0.001). Hastaların serumlarındaki yüksek anti-CA I ve anti-CA II düzeyi hastalığın şiddeti ile ilgili olabilir. Ayrıca, otoimmün tiroid hastalıklarının, genellikle, diğer otoimmün hastalıklarla beraber görülmesi (59,60,61) yüksek anti-CA I ve anti-CA II düzeyleri ile ilişkilendirilebilir. Çeşitli otoimmün hastalıklarda da CA I ve/veya CA II' ye karşı otoantikor geliştiği gösterilmiştir (3,37,62-65). Bölümümüzde 2005 yılında yapılan çalışmada romatoid artritli hastaların yaklaşık % 50 'sinde CA II otoantikorları pozitif bulunmuştur (8). Graves ve Hashimoto hastalığı ile ilgili yapılan bir çalışmada da CA I ve CA II otoantikorlarının varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada Graves hastalarında anti-CA I ile anti-CA II düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir korelasyon

belirlenmiştir (18). Bu ilişki CA I ve II enzimleri arasındaki hemolojinin bir yansıması olabilir.

Katalaz aktivitesi kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen bu değişiklik istatistiki olarak anlamlı değildir. Bölümümüzde romatoid artritli hastalarla yapılan çalışmada da katalaz aktivitesi yönünden herhangi bir değişiklik bulunmamıştır (66). Yapılan çeşitli çalışmalarda ise hipertiroidili hastaların eritrosit katalaz aktivitesi kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (13,14,67-69). Mansour ve arkadaşlarının romatoid artritli hastalarla yaptığı çalışmada ise katalaz aktivitesinde düşüş belirlenmiştir (70).

Bu hastaların SOD aktivitesi düzeyleri ise, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak oldukça anlamlı yükseklikte daha tespit edilmiştir ve aralarındaki fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Hipertiroidili hastaların SOD aktivitesinin yüksek bulunmasının nedeni, tiroid hormonlarından dolayı bazal metabolizmadaki artış olabilir. Hipotiroidili hastaların SOD aktivitesinde enerji metabolizmasındaki yavaşlamaya paralel olarak düşüş beklendiği halde bu hastaların SOD aktivitelerindeki artış yüksek T3 düzeyinden kaynaklanmış olması mümkündür. Hipertiroidili hastalarda eritrosit SOD aktivitesinin kontrol grubundan düşük (71) olduğunu gösteren çalışmaların yanı sıra, SOD aktivitesinin yükseldiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (13,68,69,72). Katalaz aktivitesinde SOD aktivitesindeki artışa paralel bir değişim beklenildiği halde önemsiz bir artış gözlemlenmiştir.

Hipertiroidi ve hipotiroidi hastalarında total oksidan seviye bazal metabolik hızdaki artışa paralel olarak kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Hipertiroidi ve hipotiroidili hastalarla yapılan çalışmalarda MDA seviyelerindeki anlamlı artışlar oksidatif stresin başka bir ifadeyle oksidan seviyenin arttığını göstermesi bakımından çalışmamızda elde edilen bu sonuç normal görülmektedir (16).

Çalışmamızda protein karbonil grubu düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu durum, deneysel bir hatadan veya kullanılan kimyasal bileşiklerden kaynaklanmış olabilir. Das K. ve arkadaşları hipotiroid oluşturulan ratlar üzerinde çalışmışlar ve hipotiroidili ratlara propisil ve T3 uygulamaları sonucu mitokondriyal karbonil miktarında kontrol grubuna göre anlamlı artışlar belirlemişlerdir (11). Bir başka çalışmada Venditti ve ark. hipertiroidili ratların kalp ve karaciğerlerinin protein karbonil düzeylerinde anlamlı artışlar bulmuşlardır (73). Yapılan bir diğer

Çalışma sonucu da subklinik hipotiroidili hastaların protein karbonil düzeylerinde anlamlı artış bildirilmiştir (15). Ancak alışmamızda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Oksidatif strese paralel olarak protein karbonil grubu düzeylerinde anlamlı artış beklendiği halde bunun gerçekleşmemesi, yukarıda da ifade edildiği gibi deneysel bir hatadan veya kullanılan kimyasal bileşiklerden kaynaklı olabilir. Bu yüzden protein karbonil grubu düzeyi ile diğer parametreler arasındaki ilişkinin tartişılması anlamsız olacaktır.

Çalışmamızda her iki hasta grubunun total antioksidan seviyesinde kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Total antioksidan seviyenin azaldığı bazı çalışmalar da mevcuttur. Romatoid artritli hastalarla yapılan çalışmada da hasta gruplarının total antioksidan seviyelerinde kontrol grubuna göre düşüş belirlenmiştir (66).

Aslında TAS ve TOS birbiriyle bağlantılı parametrelerdir. Birisindeki artış diğerinde düşmeyle sonuçlanır. RA’li hastalarla yapılan bir çalışmada artan oksidatif strese karşı total antioksidan seviyede azalma bildirilmiştir (66). Özellikle TAS beslenme rejimiyle çok yakından ilişkili olduğundan TAS ile ilgili elde edilen sonuçlar istikrarlı olmayabilir dolayısı ile TAS ve TOS’un bu hastalıkların erken belirteci olarak kullanılmaları uygun değildir. Ancak anti-CA I ve anti-CA II seviyeleri , özellikle anti-CA II’ nin bu amaçla kullanılmasının önerilebileceği kanaatine varılmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Sly WS, Hu PY (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry* 64: 375-401.
2. Fuji 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. *Journal of Biochemistry* 402: 219-227.
3. Kino-Ohsaki J, Nishimori I, Morita M, Okazaki K, Yamamoto Y, Onishi S, Hollingworth MA (1996). Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and sjögren syndrome. *Gastroenterology* 110: 1579-1586.
4. Bartolome MJ, de las Heras G, Lopez-Hoyos M (2002). Low-avidity antibodies to carbonic anhydrase I and II in autoimmune chronic pancreatitis. *Scientific World Journal* 112: 1560-1568.
5. Frulloni L, Bovo P, Brunelli S, Vaona B, Di Francesco V, Nishimori I, Cavallini G (2000). Elevated serum levels of antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with chronic pancreatitis. *Pancreas* 20: 382-388.
6. Kologlu S (1996). *Endokrinoloji Temel ve Klinik*. 1.Baskı. Medical Network & Nobel; 139-158.
7. Özata M (2003). *Tiroid Hastalıkları Tanı ve Tedavisi*. Tiroid hormonları ve tiroid hastalıklarının fizyopatolojisi. 1. baskı. Gata Basımevi:1-15.
8. Menteşe A (2005). *Otoimmün Hastalıklarda Karbonik Anhidraz II Otoantikorlarının Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
9. Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T (1997). Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *Journal of Endocrinology* 155: 151- 157.
10. Goswami K, Nandakumar DN, Koner BC, Bobby Z, Sen SK (2003). Oxidative changes and desialylation of serum proteins in hyperthyroidism. *Clinica Chimica Acta* 337: 163-168.

11. Das K, Chainy GB (2001). Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defence system by thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta* 1537: 1-13.
12. Bianchi G, Solaroli E, Zaccheroni V, Grossi G, Bargossi AM, Melchionda N, Marchesini G (1999). Oxidative stress and anti-oxidant metabolites in patients with hyperthyroidism: effect of treatment. *Hormone and Metabolic Research* 31: 620-624.
13. Alıcıgüzel Y, Özdem SN, Özdem SS, Karayalçın U, Siedlak SL, Perry G, Smith MA (2001). Erythrocyte, plasma, and serum antioxidant activities in untreated toxic multinodular goitre patients. *Free Radical Biology and Medicine* 30: 665-670.
14. Adalı M, Inal-Erden M, Akalın A, Efe B (1999). Effects of propylthiouracil, propranolol, and vitamin E on lipid peroxidation and antioxidant status in hyperthyroid patients. *Clinical Biochemistry* 32: 363-367.
15. Karabağ SF (2006). Hipertiroidizm ve Hipotiroidizm Olgularında Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
16. Kıran TR (2007). Hipertiroidili ve Hipotiroidili Hastalarda Oksidatif Stres Parametreleri ve Adenozin Deaminaz Aktivitesi. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
17. Noyan A (1993). Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 8. baskı. Meteksan Anonim Şirketi, Ankara; 1007-1033.
18. 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 Clinical Endocrinology Diabetes* 115: 287-291.
19. Ekinci D (2006). Fare Genomunda Bulunan Karbonik Anhidraz İzoenzim ve Karboksilaz Enzim Genlerinin cDNA'larının Üretilmesi, Antisens mRNA Sentezi ve İn Situ Hibridizasyonu ile Gen Ekspresyon Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
20. Supuran CT (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery* 7: 1-12.

21. Hilvo M, Tolvanen M, Clark A, Shen B, Shah GN, Waheed A, Halmi P, Hänninen M, Hämäläinen JM, Vihinen M, Sly WS, Parkkila S (2005). Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal* 392: 83-92.
22. İşgör A (2000). Tiroit hastalıkları ve cerrahisi. 2. baskı. Avrupa Tıp Kitapçılık 253- 281.
23. Pocker Y, Botre F, Storey BT, Gros G (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 75-85.
24. Careter MJ (1972). Carbonic Anhydrase: Isoenzymes Properties, Distribution and Functional Significance. *Biological Reviews* 42: 462-475.
25. Akisawa N, Nishimari I, Miyaji E, Iwasaki S, Maedo T, Shimizu H, Sato N, Onishi S (1999). The ability of anti-carbonic anhydrase II antibody to distinguish autoimmune cholangitis from primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *Journal Gastroenterology* 34: 366-371.
26. 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: 457-479.
27. Epstein DL, Grant WM (1977). Carbonic anhydrase inhibitors side effects; Serum Chemical Analysis. *Archives of Ophthalmology* 85: 1387-1382.
28. Arıncı K, Elhan A (1997). Anatomi. İkinci baskı. Güneş Kitapevi, Ankara; 442-444.
29. Staub JJ, Althaus BU, Engler H, Ryff AS, Trabucco P, Marquardt K, Burckhardt D, Girard J, Weintraub BD (1992). Spectrum of subclinical and overt hypothyroidism: effect on thyrotropin, prolactin and thyroid reserve, and metabolic impact on peripheral target tissues. *American Journal of Medicine* 92:631-642.
30. Sencer E (2001). Endokrinoloji Metabolizma ve Beslenme Hastalıkları.1. baskı. Nobel Tıp Kitapevi, Ankara; 94-95.
31. Kabalak T (2009). Tiroid El Kitabı. 1. baskı. Güven Kitabevi, İzmir; 353-360.

32. Arıkan MK (2003). Tiroid Disfonksiyonunda (Hiper/Hipotiroidi) Otoimmün Antikorlar, Adezyon Molekülleri ve Lökosit Fonksiyonları Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon.
33. Epstein O, Chapman RW, Lake-Bakaar G, Foo AY, Rosalki SB, Sherlock S (1980). The pancreas in primary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 83: 1177-1782.
34. Strarand V, Talal N (1980). Advances in the diagnosis and concept of Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Bull Rheum Dis* 30: 1046-1052.
35. Whaley K, MacSween RN (1974). Experimental induction of immune sialoadenitis in guinea pigs using different adjuvants. *Clinical Experimental Immunology* 17: 681-684.
36. White SC, Casarett GW (1974). Induction of experimental autoallergic sialoadenitis. *The Journal of Immunology* 112: 178-185.
37. 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: 147-154.
38. Nishimori I, Okazaki K, Morita M, Tamura S, Yamamoto Y (1993). Identification of autoantibodies to a pancreatic antigen in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *The Journal of Clinical Immunology* 13: 265-271.
39. Nishimori I, Bratnova T, Toshkov I, Caffrey T, Mogaki M, Shibata Y, Hollingsworth MA (1995). Induction of Experimental Autoimmune Sialoadenitis by Immunization of PL/J Mice With Carbonic Anhydrase II. *The Journal of Immunology* 154: 4865-4873.
40. 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.
41. Uzun A (2007). Otoimmün Hastalıklarda Karbonik Anhidraz I ve Karbonik Anhidraz II Otoantikorlarının Belirlenmesinde Karbonik Anhidraz Miktarı

Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

42. Kiechle FL, Quattrocioni-Longe TM, Brinton DA, Gordon SC, Sykes E, Elkhaila MY (1996). Autoantibodies to specific enzymes, a review. Annual Clinical Laboratory Science 26: 195-207.
43. Kita H (2004). Are antibodies to carbonic anhydrase disease specific marker Hepatology Research 30: 238-239.
44. Kılınç A, Kılınç K (2003). Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. 1. Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara; 1-68.
45. İşlekel H, İşlekel S, Güner G (2000). Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. Tissue Injury Review Article Norol Bil D 17: 2.
46. Kılınç K, Kılınç A (2002). Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Temel Tıptan Kliniği. Hacettepe Tıp Derg. 33: 110-118
47. Akkus I (1995). Serbest Radikaller ve Fizyoterapik Etkileri. 1. baskı. Mimoza Basım, Konya; 4-113.
48. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. Nef Diy ve Transplan Derg 3-4: 92-95.
49. Simsek F (1999). Free radicals, antioxidants and lipid peroxidation. Türkiye Klinikleri J Pediatr. 8: 42-47.
50. Tekkes Y (2006). Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
51. Marklund SL (1984). Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. Biochemical Journal 220: 269-272.
52. Bay Karabulut A, Özerol E, Temel İ, Gözükar EM, Akyol Ö (2002). Yaş ve sigara içiminin eritrosit katalaz aktivitesi ve bazı hematolojik parametreler üzerine etkisi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 9: 85-88.
53. Ercan S (2008). Doğumsal Kalp Hastalığı Olan Çocuklarda Total Oksidan (TOS) ve Antioksidan Seviye (TAS) ile Oksidatif Stres İndeks (OSİ)

Düzeyleri. Uzmanlık Tezi, Harran Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

54. 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.
55. Sun Y, Oberlay LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 34: 487–500.
56. Aebi HE (1987). Catalase. In Bergmeyer, HU. *Methods of Enzymatic Analysis* 3: 273-285.
57. Levine RL, Garland D, Oliver CN (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Method Enzymol* 186: 464-478.
58. Altuntaş İ (2007). Otoimmün Tiroid Hastalığının Tanı ve Takibinde Oksidatif DNA Hasar Belirleyicisi 8-OHdG'nin Önemi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
59. Weetman AP (2004). Non-thyroid autoantibodies in autoimmune thyroid disease. *Best Practice Research Clinical Endocrinology Metabolism* 19: 17-32.
60. Scofield RH (2004). Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet* 363: 1544–1546.
61. Punzi P, Betterle C (2004). Chronic autoimmune thyroiditis and rheumatic manifestations. *Joint Bone Spine* 71: 275–283.
62. Itoh Y, Reichlin M (1992). Antibodies to carbonic anhydrase in systemic lupus erythematosus and other rheumatic disease. *Arthritis Rheumatism* 35: 73–82.
63. 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.
64. Reimand K, Talja I, Metsküla K, Kadastik Ü, Matt K, Uibo R (2001). Autoantibody studies of female patients with reproductive failure. *Journal of Reproductive Immunology* 51: 167–176.

65. Andoh A, Fujiyama Y, Yoshioka U, Sasaki M, Araki Y, Tsujikawa T, Bamba T (2002). Elevated serum anti-carbonic anhydrase II antibodies in patients with ulcerative colitis. *International Journal of Molecular Medicine* 9: 499 – 502.
66. Akyüz A (2008). Romatoid Artritli Hastalarda Karbonik Anhidraz Otoantikorları ve Antioksidan Enzimler Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
67. Komosinska-Vassev K, Olczyk K, Kucharz EJ, Marcisz C, Winsz-Szczotka K, Kotulska A (2000). Free radical activity and antioxidant defense mechanisms in patients with hyperthyroidism due to Graves' disease during therapy. *Clinica Chimica Acta* 300: 107-117.
68. Bednarek J, Wysocki H, Sowinski J (2004). The effect of one-month antithyroid therapy on peripheral metabolism of reactive oxygen species in Graves' disease with infiltrative ophthalmopathy. *Przegl Lek* 61: 841-844.
69. Bednarek J, Wysocki H, Sowinski J (2004). Oxidation products and antioxidant markers in plasma of patients with Graves' disease and toxic multinodular goiter: effect of methimazole treatment. *Free Radical Research* 38: 659-664.
70. Mansour RB, Lassoued S, Gargouri B, Gai AE, Attia H, Fakhfakh F (2008). Increased levels of autoantibodies against catalase and superoxide dismutase associated with oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 37: 103–108.
71. Wilson R, Chopra M, Bradley H, Mckillop JH, Smith WE, Thomson JA (1989). Free radicals and graves' disease: the effects of therapy. *Clinical Endocrinology* 30: 429-433.
72. Iwase K, Kato K, Otani S, Tsujimura T, Inagaki A, Miura K (1993). Study of the localization and the concentration of superoxide dismutase in various thyroid disorders. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 94: 1112-1117.

73. Venditti P, De Rosa R, Di Meo S (2005). Effect of prolonged exercise on oxidative damage and susceptibility to oxidants of rat tissues in severe hyperthyroidism. Archives of Biochemistry and Biophysics 2: 229-237.

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ KLİNİK
ARAŞTIRMALAR
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
ETHIC COUNCIL

Sayı:B302KTÜ0200000/ 582
Konu:

Tarih:13/06/2012

Sayın; Prof.Dr.E.Edip KEHA
Tıbbi Biyokimya ABD.

“Hipotiroidi ve Hipertiroidili Hastalarda Karbonik Anhidraz I ve II Otoantikorları İle Oksidatif Stres Parametreleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi” başlıklı etik kurul 2012/90 no’lu tez çalışmasının raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Faruk AYDIN
Etik Kurul Başkanı

Eki : 1 onay belgesi

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı :YALDUZ, Fazilet
Uyruğu :T. C.
Doğum tarihi ve yeri :12.12.1985- Şavşat
Medeni hali :Bekâr
E-Posta :faziletyalduz@hotmail.com
Yazışma adresi :Kalkınma mah. Farabi cad. Alemdağ apt.
no:6 Trabzon

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	-
Lisan	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2009
Lise	İnegöl Lisesi	2005
YABANCI DİL	İngilizce	