

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**AİLEVİ AKDENİZ ATEŞLİ HASTALARDA NÖTROFİL**  
**FONKSİYONLARININ GÖSTERGESİ OLARAK NÖTROFİLLERDE**  
**KALSİYUM SİNYALİ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNDE KOLŞİSİNİN**  
**ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Halil DEMİRKAN**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**  
**UZMANLIK TEZİ**

**I. DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN**

**II. DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 1789-TU-09 proje numarasıyla desteklenmiştir.**

**2010 – ISPARTA**

**KABUL ve ONAY**

**Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir**

**Tez Adı:** Ailevi Akdeniz Ateşli Hastalarda Nötrofil Fonksiyonlarının Göstergesi Olarak Nötrofillerde Kalsiyum Sinyali ve Oksidatif stres Üzerinde Kolşisinin Etkisinin Araştırılması

**Tez Yazarı:** Dr. Halil Demirkan

**Uzmanlık Tez Savunma Tarihi:** 21.06.2010

**Tez Danışmanları** : Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN, SDÜ  
Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu

**Üye** : Prof. Dr. Mehmet Numan TAMER, SDÜ

**Üye** : Prof. Dr. Mehmet Tuğrul SEZER, SDÜ

**Üye** : Doç. Dr. Şevket Ercan TUNÇ, SDÜ

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Emine Güçhan Alanoğlu, SDÜ

ONAY: Bu uzmanlık tezi, Fakülte Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

**Tıp Fakültesi Dekanı**  
Prof. Dr. Yıldırım Songur

## TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince verdiği yakın destek ve değerli katkılarından dolayı tez danışmanım sayın hocam Doç. Dr. Mehmet Şahin başta olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet Numan TAMER, Prof. Dr. Mehmet Tuğrul SEZER, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR, Prof. Dr. Ülkü SARITAŞ, Prof. Dr. Mehmet İŞLER, Doç. Dr. Şevket Ercan TUNÇ, Doç. Dr. Muhammet Cem KOÇKAR, Doç. Dr. Hasan Şenol COŞKUN, Doç. Dr. Şeref Yüksel, Yrd. Doç. Dr. Emine Güçhan ALANOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Banu KALE KÖROĞLU, Yrd. Doç. Dr. Altuğ ŞENOL, Yrd. Doç. Dr. Zeynep Dilek AYDIN, Yrd. Doç. Dr. Murat KOÇER, Uzm. Dr. Murat DEMİR, Uzm. Dr. İbrahim GÖREN'e ve birlikte çalıştığımız başta Dr. Hakan KORKMAZ olmak üzere tüm Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma saygı ile teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışması sırasında gösterdikleri yakın ilgi ve desteklerinden dolayı başta Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU ve Arş. Gör. Cihangir UĞUZ olmak üzere tüm Biyofizik A.D. çalışanlarına saygıyla teşekkür ederim. Çalışma süresince verdikleri destekten dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve çalışanlarına saygıyla teşekkür ederim.

Dr. Halil DEMİRKAN

2010 – ISPARTA

## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL VE ONAY .....</b>	<b>II</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>III</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>IV</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER .....</b>	<b>IX</b>
<b>TABLolar .....</b>	<b>X</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) .....	3
2.1.1. Tanım .....	3
2.1.2. Epidemiyoloji .....	3
2.1.3. Patogenez .....	3
2.1.4. Klinik Bulgular.....	6
2.1.4.1. Ateş.....	7
2.1.4.2. Peritonit .....	7
2.1.4.3. Plörezi-Plörit .....	7
2.1.4.4. Eklem Tutulumu.....	8
2.1.4.5. Cilt Bulguları .....	8
2.1.4.6. Amiloidoz .....	8
2.1.4.7. Diğer Organ Tutulumu .....	9
2.1.5. Laboratuar Bulguları .....	9
2.1.6. Tanı.....	10
2.1.7.Tedavi.....	11
2.2. Oksidatif Stres.....	13
2.2.1 Serbest Radikaller .....	13
2.2.1.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri .....	19
2.2.2. Antioksidanlar .....	20
2.2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar .....	21

2.2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar .....	22
2.2.2.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları .....	23
2.2.3. Fizyolojik Süreçlerde Oksidatif Stres .....	24
2.2.4. Patolojik Süreçlerde Oksidatif Stres .....	26
2.3. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali .....	28
2.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi .....	28
2.3.2. Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu .....	28
<b>3. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>31</b>
3.1. Materyal .....	31
3.1.1. Hasta Kontrol Populasyonunun Seçimi .....	31
3.2. Metod .....	32
3.2.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler .....	32
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	33
3.2.3. Nötrofil İzolasyonu .....	34
3.2.4. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü .....	36
3.2.4.1. Glutatyon (GSH) ve Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) .....	36
3.2.4.2. Lipit Peroksidasyon (LPO) Analizi .....	37
3.2.5. İntraselüler Kalsiyumun Ölçülmesi .....	38
3.2.6. Biyokimyasal Analizler .....	38
3.3. İstatistiksel Analiz .....	38
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>39</b>
4.1. Genel Bulgular .....	39
4.2. Oksidatif Stres Bulguları .....	42
4.3. Kalsiyum Sinyali Bulguları .....	45
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>47</b>
<b>6. SONUÇLAR .....</b>	<b>55</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>56</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>57</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>58</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>AAA</b>	: Ailevi Akdeniz Ateşi
<b>Ach</b>	: Asetil Kolin
<b>ADPR</b>	: Adenozin Difosfat Riboz
<b>Ark</b>	: Arkadaşları
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>C 3a</b>	: Kompleman 3a
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum İyonu
<b>[Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub></b>	: Hücre İçi Kalsiyum Konsantrasyonu
<b>c-AMP</b>	: Siklik Adenomonofosfat
<b>CCl<sub>3</sub>·</b>	: Triklormetil
<b>CCl<sub>4</sub></b>	: Karbon Tetraklorür
<b>c-GMP</b>	: Siklik Guanozinmonofosfat
<b>CRP</b>	: C- Reaktif Protein
<b>Cu<sup>+2</sup></b>	: Bakır
<b>DAG</b>	: Diaçilgliserol
<b>DHLA</b>	: Dihidrolipoik Asit
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>EC-SOD</b>	: Ekstraselüler Superoksit Dismutaz
<b>ER</b>	: Endoplazmik Retikulum
<b>ESH</b>	: Eritrosit Sedimentasyon Hızı
<b>Fe<sup>+2</sup></b>	: Demir
<b>GPKR</b>	: G Proteini Kenetli Reseptör
<b>GSH</b>	: Glutasyon (indirgenmiş glutasyon)
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GSSG</b>	: Okside (yükseltgenmiş) Glutasyon
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>HNA</b>	: 4-hidroksinoneal

<b>HSP</b>	: Henoch Schönlein Purpurası
<b>HT</b>	: Hipertansiyon
<b>IL</b>	: İnterleukin
<b>İP3</b>	: İnositol Trifosfat 3
<b>KAT</b>	: Katalaz
<b>LA</b>	: $\alpha$ -Lipoik Asit
<b>LDL</b>	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
<b>LPO</b>	: Lipit Peroksidasyonu
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>LS</b>	: L-selektin
<b>LTB 4</b>	: Lökotrien B 4
<b>M</b>	: Molar
<b>MDA</b>	: Malonildialdehit
<b>MEFV</b>	: MEditerranean FeVer (AAA'ten sorumlu gen )
<b>Mn</b>	: Manganez
<b>MPP<sup>+</sup></b>	: N-metil-4-fenilpridinyum
<b>Na</b>	: Sodyum
<b>NAD(P)H</b>	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	: Nüklear Faktör Kappa-B
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik Oksit Sentaz
<b>NSAEİ</b>	: Non Steroid Antienflamatuar İlaç
<b>O<sub>2</sub></b>	: Moleküler Oksijen
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Singlet Oksijen
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit Anyonu
<b>·OH</b>	: Hidroksil Radikali
<b>ONOO<sup>-</sup>·</b>	: Peroksinitrit
<b>PAN</b>	: Poliarteritis Nodoza
<b>PARP-1</b>	: Poli(ADPR) Polimeraz-1
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffer Saline
<b>PKC</b>	: Protein Kinaz C
<b>PLC</b>	: Fosfolipaz C

<b>PMNL</b>	: Polimorfonükleer Lökosit
<b>PUFA</b>	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
<b>ROO·</b>	: Peroksil
<b>ROT</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>SD</b>	: Standart Deviasyon
<b>sGC</b>	: Solubl Guanilat Siklaz
<b>sICAM-1</b>	: Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1
<b>SLE</b>	: Sistemik Lupus Eritematozus
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>SSRİ</b>	: Selektif Serotonin Reuptake İnhibitörleri
<b>TBA</b>	: Tiyobarbitürik Asit
<b>TBARS</b>	: Tiyobarbitürik Asit Reaktif Türleri
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekrozis Faktör- $\alpha$
<b>TRPM2</b>	: Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2
<b>TRX</b>	: Tiyoredoksin
<b>TSH</b>	: Tiroid Stimulan Hormon
<b>VCAM-1</b>	: Vascular Cellular Adhesion Molecule-1
<b>Zn</b>	: Çinko



## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.</b> Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması .....	17
<b>Şekil 2.</b> OH radikalının biyolojik moleküllerle reaksiyonları.....	17
<b>Şekil 3.</b> Redoks homeostazının mekanizmaları .....	26
<b>Şekil 4.</b> Redoks dengesi .....	27
<b>Şekil 5.</b> G Proteini kenetli reseptör (GPKR) etkili $Ca^{+2}$ sinyali .....	30
<b>Şeki 6.</b> Nötrofillerde oksidatif stres bulguları.....	43
<b>Şekil 7.</b> Serumda oksidatif stres bulguları .....	44
<b>Şekil 8.</b> Sitozole $Ca^{+2}$ salınışının tüm gruplarda düzeyleri .....	45
<b>Şekil 9.</b> Sitozole $Ca^{+2}$ salınışının tüm gruplardaki zaman akım grafiği.....	46
<b>Şekil 10.</b> Sitozole $Ca^{+2}$ salınışının gruplara spesifik zaman akım grafikleri .....	46

## TABLÖLAR

<b>Tablo 1.</b> AAA tanısında Tell Hashomer kriterleri.....	10
<b>Tablo 2.</b> AAA tanısında Livneh kriterleri.....	11
<b>Tablo 3.</b> Reaktif oksijen türleri (ROT), simgeleri ve elektron yapıları.....	15
<b>Tablo 4.</b> GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar .....	37
<b>Tablo 5.</b> Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı .....	39
<b>Tablo 6.</b> AAA hasta gruplarının hastalık süresi ve kolşisin dozları .....	40
<b>Tablo 7.</b> Çalışmaya alınan bireylerin laboratuvar verileri.....	41
<b>Tablo 8.</b> Nötrofillerde MDA, GSH, GSH-Px düzeyleri .....	43
<b>Tablo 9.</b> Serumda MDA, GSH, GSH-Px düzeyleri.....	44
<b>Tablo 10.</b> Sitozole Ca <sup>+2</sup> salınışının tüm gruptaki düzeyleri .....	45

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA) tekrarlayan ateş, peritonit, sinovit, plörit, nadiren perikardit ve menenjit atakları ile karakterize otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır. Akdeniz çevresindeki ırklar ve etnik gruplarda (Türkler, yahudiler, ermeniler, ve araplar) nisbeten sık görülmektedir (1, 2).

Hastalığın ve aktivasyonların patogeneğinde birçok mekanizma ileri sürülmüşse de kesin olarak nedeni bilinmemektedir. En çok kabul gören hipoteze göre hastaların çoğunda gözlenen MEditerranean FeVer (MEFV) gen mutasyonu esas rolü oynamaktadır. MEFV geni pyrin (marenostin) isimli proteini kodlamaktadır. Bu proteinlerin eksternal patojenlere ve zararlı ajanlara karşı oluşan vücut savunmasında immun sistemi düzenleyici etkisi vardır (3). Bu proteinlerin hatalı sentezlendiği AAA hastalarında enflamasyonun baskılanamaması ve seröz zarlara olan nötrofil göçüyle enflamasyon ve klinik bulgular gelişmektedir.

Ataklar esnasında polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) hem sayısı hem de kemotaktik aktivitesi ileri derecede artmıştır. Tutulmuş olan dokularda belirgin nötrofil hakimiyeti mevcuttur (4). Hastalığın özellikle aktif döneminde belirgin olan nötrofil aktivasyonunun da nedeni tam olarak bilinmemektedir.

Hastalığın kesin tedavisi mevcut olmamasına rağmen bugün için kullanılan en etkin tedavi kolşisinidir. Kolşisin etki mekanizması kısmen bilinen antiinflamatuvar bir ilaçtır. Hücresel seviyede özellikle nötrofiller üzerinde inhibitör etkiye sahiptir. AAA'de ortaya çıkan bu nötrofil hiperaktivasyonuna karşı kolşisin özellikle fagositoz ve kemotaksisi önleyici etkiler gösterebilmektedir (5).

Çalışmamızda AAA hastalarında atak dönemi ve atak dışında nötrofilleri aktive eden moleküler mekanizmaları ve bu mekanizmalar üzerine kolşisinin etkisini araştırmayı amaçladık. Daha önce öne sürülen hipotezlere ek olarak hasta gruplarımızda nötrofil aktivasyonunda oksidatif stresin rolünü belirlemek için nötrofillerde intraselüler ve serum örneklerinde oksidatif stres göstergelerini değerlendirdik. Çalışmamızda oksidatif stres göstergeleri olarak; Glutatyon (GSH), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Malonildialdehit (MDA) düzeyleri incelendi. Ayrıca oksidatif stres durumunda hücre içine kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) iyon akımında artma

olabileceği düşünöldü. Bu amaçla hastalığın oluşumunda önemli rol oynayan nötrofillerin aktivasyonunda oksidatif stres bulguları ile birlikte  $Ca^{+2}$  sinyali de incelendi ve sitozole  $Ca^{+2}$  akışı ölçöldü.

Bu araştırma sonucunda AAA hastalarında aktif dönemde nötrofil aktivasyonunun ve oksidatif strese bağlı DNA hasarının birbiri ile etkileşiminin belirlenmesi amaçlandı. Sonuçta nötrofilleri aktive eden ve sinyalizasyonunu bozan moleküler mekanizmalar ile hastalığın oluşum nedenlerinin anlaşılmasında önemli bir katkı sağlanabilecektir.

Ayrıca hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan kolşisinin çalışılan parametreler üzerinde etkileri incelenerek, hem etki mekanizmasına ışık tutulabilecek hem de bu mekanizmalar üzerinden geliştirilecek yeni tedavi yöntemi için katkıda bulunulabilecektir. Çalışmamız bu bağlamda bahsedilen mekanizmaların etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ailevi Akdeniz Ateşi

#### 2.1.1. Tanım

Ailevi Akdeniz Ateşi günümüzde bilinen hereditör periyodik ateş sendromları arasında en yaygın ve en iyi tanınmış olanıdır. AAA, etnik kökenlerle ilişkili, otozomal resesif geçiş gösteren, yaklaşık olarak dünya genelinde 150.000'e yakın insanı etkilediği bilinen bir hastalıktır (6). Tipik ataklar genellikle üç günden kısa süreli ateş, peritonit, plörezi, artrit ve erizipel benzeri cilt lezyonlarıyla karakterizedir (7). Hastalığın en ciddi komplikasyonu, bazı vakalarda klinik tabloya eklenen amiloidozisdir (8).

#### 2.1.2. Epidemiyoloji

Ülkemizde pediatrik yaş grubunda yapılan bir epidemiyolojik çalışmada muhtemel AAA prevalansı 9,3/10000 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde en yaygın olarak Orta ve Doğu Anadolu'da ortaya çıkmaktadır. Yahudilerde ve Lübnan Ermenilerinde bu oran 1/500 olarak bildirilmiştir (4).

Hastaların çoğunda ilk semptomlar çocukluk veya adolesan dönemde, 5-15 yaşları arasında ortaya çıkar. Hastaların %90'ında ilk atak 20 yaşından önce başlamaktadır. Erkeklerde görülme oranı kadınlardakinin 1,5-2 katıdır. Olguların % 30-50'sinde aile öyküsü vardır (9).

#### 2.1.3. Patogenez

AAA'nın genetik temeline yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen hastalığın patogenezini hala tam olarak aydınlığa kavuşmuş değildir. PIRIN disfonksiyonu AAA etyopatogenezinin temelini oluşturmaktadır. MEDITERRANEAN FEVER (MEFV) genindeki çeşitli mutasyonlar sonucu farklı genotip ve fenotipler ortaya çıkar. Bu farklılık AAA'nın ağırlık derecesini, gelişme sıklığını, değişik etnik

gruplarda farklı şiddette seyretmesini ve amiloidoz gelişimini belirlemektedir. Bu gendeki mutasyonlardan on tanesi 10. Eksonda saptanmıştır. Bunlardan ilk dört mutasyon (M694V, M690I, M694I, V726A) tüm etnik grupların %85'inde bulunmuştur. Bu mutasyonlar Anadolu Türklerinde heterojen dağılım gösterir. M694V mutasyonu amiloidoz ile sık ilişkili bulunmuştur (10). Ülkemizde yapılan bir çalışmada Türk AAA hastalarında MEFV geninde en sık görülen mutasyonların oranı; M694V için %51.55, M680I için %9.22, E148Q için %3.55, V726A için %2.88, M694I için %0.44 olarak belirlenmiş ve Türk popülasyonundaki AAA taşıyıcılığı %20 olarak rapor edilmiştir (11).

Otozomal resesif geçişli olan AAA hastalığına neden olduğu düşünülen MEFV geni pyrin/marenostrin adı verilen ve normal şartlarda enflamasyonu kontrol altında tutmaya yarayan bir proteini kodlamaktadır.

Patogeneizde ileri sürülen en önemli hipotez, pyrin/marenostrin'in nötrofil aracılı enflamasyonu baskılamasında aksama olmasıdır. MEFV geninde mutasyon oluştuğunda ortaya çıkan fonksiyonel değişiklikler, enflamasyonun kontrolünü aksatabilmektedir. Bu durumda, çeşitli nedenlerle uyarılan enflamatuar reaksiyonlar durdurulamamakta ve ateş ile birlikte, periton, plevra, eklemler ve deri gibi belirli bölgelere sınırlı enflamasyon ataklarıyla karakterize klinik tablo ortaya çıkmaktadır.

AAA'da enflamasyon ataklarının periyodik olarak gelişmesi pyrin'in normal şartlarda görevini yerine getirebilirken, stres durumunda yeterli düzeye ulaşamaması nedeniyledir. Bu nedenle pyrin enflamasyonu kontrol edici görevini yerine getirememekte ve hastalık bulgularına neden olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla genetik mutasyonların yanı sıra, çevresel tetikleyicilerin de AAA patogenezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Hastalığın temelinde otoimmün mekanizmaların bulunabileceği de düşünülmüş, ancak spesifik otoantikorların saptanamamış olması ve semptomların steroidlere yanıt vermemesi patogeneizde otoimmün değişikliklerin rol oynadığı görüşünü azaltmıştır (12).

Günümüzde AAA'da nötrofil aktivasyonunu gösteren çalışmalarla da patogeneiz aydınlatılmaya çalışılmaktadır. AAA'li hastalarda özellikle ataklar esnasında PMNL'in kemotaktik aktivitesi ileri derecede artmıştır. Tutulmuş olan dokularda belirgin nötrofil hakimiyeti mevcuttur (4).

Bu hastalarda, nötrofil  $\beta 2$  integrin ve L-selektin (LS) yapışma moleküllerinin hücre yüzeyinde bulunuşu araştırılmış ve kimyasal uyanların nötrofil kemotaksisine etkisi incelenmiştir. Nötrofillerin kemotaktik aktivasyonu  $\beta 2$  integrinin ve LS molekülünün ortaya çıkışını arttırmaktadır. Bu da lökositlerin endotele yapışmasını ve enflamasyon bölgesine geçişini sağlar. Atak sırasında AAA hastalarında nötrofil yüzeyinde  $\beta 2$  integrinin ortaya çıkışı kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Kimyasal uyarı sonrasında  $\beta 2$  integrin ve LS'in ortaya çıkışında ise kontrol grubuna göre belirgin bir farklılığa rastlanılmamıştır. Sonuç olarak; atak sırasında kimyasal uyarıyla ilişkili olmayan nötrofil aktivasyonu olduğu gösterilmiştir (13).

Bunun yanı sıra AAA'da hücreler arasındaki Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) ve Interleukin-8 (IL-8) seviyelerinin yüksek olduğu saptanmış ve lökositlerin endotel yüzeyine yapışmasının arttığı gösterilmiştir (14).

Kolşisin, in vitro ortamda tübülün molekülüne bağlanarak mikrotübül oluşumunu sağlayan polimerizasyonu engellemektedir. Mikrotübüler toksikasyon hücrenin mitozunun metafazda duraklamasına sebep olur. Mikrotübüller; sinir hücrelerinde, siliyalı hücrelerde, lökositlerde ve sperm kuyruğunda yoğun olarak bulunan organellerdir. Bu nedenle bu hücreler diğer hücrelere göre kolşisinden daha yoğun olarak etkilenirler. Kolşisin mikrotübül polimerizasyonu inhibe ederek bu yolla intraselüler granüllerin hareketini de inhibe eder ve hücre dışına çeşitli komponentlerin salınımını bozar (5).

Kolşisin aynı zamanda monosit ve nötrofil kemotaksisini azaltır, lökosit c-AMP düzeyini artırarak lizozomal degranülasyonu inhibe eder. Yapılan bir çalışmada kolşisinin insülin, tiroksin, TSH, amilaz ve katekolamin salınımını, mast hücrelerinden histamin salınımını azalttığı, fagositlerden lizozomal hidrolazların salınımını engelleyerek ekstraselüler alana kollajen transportunu engellediği saptanmıştır (15).

Kolşisin özellikle nötrofillerde diğer hücrelere göre rölatif olarak daha yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Nötrofillerdeki en belirgin etkisi, düşük konsantrasyonlarda bile kemotaksisi inhibe etmesidir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ) ve IL-1'e yanıt olarak gelişen nötrofil adezyonunu,

ameboid hareketlerini, mobilizasyonunu ve lizozomların degranülasyonunu ve sonuçta fagositozu etkilemektedir (15, 16).

AAA'li hastalarda IL-8 ve sICAM-1 seviyeleri de yüksek bulunmuştur dolayısıyla AAA'da nötrofillerin artmış adezyon yoluyla aktive olduğu iddia edilmiştir (14). Kemokinler lökositlerde kemotaksis oluşturan veya onları aktive eden sitokinlerdir. Klasik kemokinler arasında Kompleman 3a (C3a), (C5a), Lökotrien B4 (LTB4), platelet aktive eden faktör yer almaktadır. İn vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda, kemokinlerin AAA gibi enflamatuvar hastalıklarda rol oynadığı ve onları hedef alan yeni tedavi stratejilerinde yer alması gerektiği öne sürülmektedir (17).

1984 yılında Matzner ve ark. AAA'li hastaların periton ve sinoviyal sıvılarında, kompleman aktivasyonu sırasında oluşan ve önemli bir enflamatuvar mediatör olan C5a inhibitörünün eksikliğini göstermişlerdir. Komplemanın C5a parçası ve IL-8, kemotaktik aktiviteye sahip enflamasyon öncüsü olan peptidlerdir. C5a inhibitörünün eksik olması nedeni ile enflamatuvar yanıtın yetersiz baskılandığı ve nötrofil kemotaksisinin inhibe edilemediği ileri sürülmüştür (18).

Bir semptomimetik ajan olan metaraminol infüzyonunun akut ataklara yol açması nedeniyle ketakolamin metabolizmasındaki bir bozukluğun AAA ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Bu görüşe destek olarak da ataklar sırasında plazma adrenalin düzeyleri belirgin derecede artmış olarak bulunmuştur (4).

#### **2.1.4. Klinik Bulgular**

AAA'nin tipik özelliği karın ağrısı, göğüs ağrısı veya eklem ağrısının eşlik ettiği akut ateş ataklarıdır. Hastalar ataklar arası dönemlerde tamamen normal ve sağlıklıdırlar. Ataklar genellikle 12-72 saat arasında sonlanır, ancak artralji veya artrit daha uzun süreli olabilir. Ataklar arasında düzenli bir zaman aralığı olmadığı gibi atakların süresi ve klinik özellikleri de ataktan atağa farklılıklar gösterebilir. Atakların sıklığı ve şiddeti yaşla birlikte azalır (4).

Atakları tetikleyen belirgin bir faktör tespit edilememişse de emosyonel stres, aşırı fiziksel aktivite ya da menstürasyonla tetiklenebilmektedir (9).



Hastalık ilk kez çocukluk veya genç erişkin yaşta ortaya çıkar. Hastaların %75'inde yaşamın ilk 10 yılında, %90'ında ise ikinci 10 yılın sonuna kadar atak başlamış olur (9). AAA'lı hastalar iki fenotipe ayrılırlar. Ateş, karın ağrısı, eklem ağrısı, göğüs ağrısı gibi tipik atakların görüldüğü hastalar fenotip I, tipik ateş ve karın ağrısı gibi hastalığa özgü ataklar olmadan amiloid nefropatisi gelişen hastalar ise fenotip II olarak sınıflandırılırlar (19).

#### **2.1.4.1. Ateş**

Ateş 38-40°C'ye kadar yükselebilir. Akut atakların hemen hepsinde ateş gözlenir. Bazen subfebril seyredebilirken, %2 olguda tek başına ateş bulunabilmektedir (20).

#### **2.1.4.2. Peritonit**

Ateşten sonra en sık rastlanan ikinci belirtidir. Hastaların yaklaşık %95'inde bulunurken, %50'sinde ilk semptomdur (4). Bulantı ve kusma eşlik edebilir. Erişkinlerde konstipasyona, çocuklarda ise ishale daha sık rastlanır. Ağrı genellikle bir kadrandan başlayıp tüm batına yayılır. Fizik muayenede batın şiş görünümde, rijit, hassas, barsak sesleri azalmış olabilir, hatta rebound bulgusuna rastlanabilir. Direkt grafide hava sıvı seviyesi görülebilir.

Klinik tablo, akut apandisit veya kolesistit gibi yanlış tanı alınmasına neden olabilir. Bundan dolayı hastaların büyük bir kısmına apendektomi veya kolesistektomi uygulanabilmektedir (20).

#### **2.1.4.3. Plörezi-Plörit**

Plevral ataklar Yahudi ve Arap hastaların %40'ında, Türk hastaların %30'unda, Ermeni hastaların %50'sinde görülmektedir. 2838 AAA'lı hasta üzerinde yapılan bir çalışmada plörit prevalansı %31,2 olarak bulunmuştur (21). Plörezi genellikle tek taraflıdır. Nefes alma ağırlıdır. Muayenede tutulan tarafta solunum seslerinde azalma, plevral frotman duyulabilir. Akciğer grafisinde kostofrenik açıda

az miktarda geçici efüzyon veya atelektazi gözlenebilir. Plörezi bir hafta kadar sürebilir ve sekel bırakmadan iyileşir (4).

#### **2.1.4.4. Eklem Tutulumu**

Eklem tutulumu hastaların %16-24'ünde ilk belirti olabilir (6) Artrit en sık monoartikülerdir ve genellikle destrüktif değildir. En çok, diz, ayak bileği ve kalça eklemleri tutulurken, üst ekstremitte eklemleri daha az sıklıkla tutulur. Ataklar genellikle birkaç günde sekel bırakmadan iyileşir, ancak nadiren diğer tüm sistemik bulgular ortadan kalktığı halde eklem bulguları gerilemez, aylarca hatta yıllarca sürebilir (20).

AAA'li hastalarda nadiren sakroiliit bildirilmesine rağmen seronegatif spondiloartropati ve AAA ilişkisi halen tartışmalıdır (22). AAA'li hastalarda febril miyaljiler de bildirilmiştir. Bu tarz myalji atakları 6 haftaya kadar uzayabilir. Oldukça şiddetlidir ve genellikle kol ve bacaklardadır (23).

#### **2.1.4.5. Cilt Bulguları**

AAA'lı hastalarda görülen en karakteristik cilt lezyonu erizipel benzeri eritemdir. Türk hastalarda erizipel benzeri eritemin prevalansı %20,9 olarak bulunmuştur (21). Bu lezyonlar genellikle keskin kenarlı, 10-15 cm çapında, şiş ve kızarıklık alanlardır. Palpasyonda hassasiyet ve ısı artışı mevcuttur (24). Eritem genellikle diz altı ve ayak bileğinin ekstansör yüzlerinde ve ayak sırtında gözlenir, sıklıkla tek taraflıdır. Genellikle 2-3 gün içerisinde kendiliğinden geçer. Diğer dermatolojik lezyonlar arasında subkutan nodüller, nonspesifik purpura sayılabilir (19)

#### **2.1.4.6. Amiloidoz**

AAA'nin en önemli komplikasyonu olan amiloidoz (AA tipi), serum amiloid A proteininin birikmesi sonucunda meydana gelir (25). Amiloidoz, çoğunlukla 40 yaşından önce gelişir. Erkek çocuklarda daha fazla görülmektedir. En sık olarak böbrekleri tutar, sıklıkla nefrotik sendrom gelişir, son dönem böbrek yetmezliğine kadar ilerleyebilir. Amiloid nefropatisinin ilk klinik bulgusu proteinürüdür (26).

Amiloidozun görülme sıklığı etnik gruplara göre farklılık göstermektedir. Kuzey Afrika Yahudilerinde ve Anadolu Türklerinde daha sık görülür. Ermenilerdeki sıklığı daha azdır. Araplarda, Askenazi ve Irak Yahudilerinde ise oldukça nadirdir. Kolşisinin etkin ve yaygın kullanımı amiloidoz sıklığını eskiye nazaran azaltmıştır (4).

#### **2.1.4.7. Diğer Organ Tutulumu**

AAA'li hastalarda santral sinir sistemi tutulumu sık değildir ancak tekrarlayıcı aseptik menenjit vakaları bildirilmiştir (27). Henoch-Schönlein purpurası (HSP) ve poliarteritis nodoza (PAN) gibi bazı vaskülitlerin bu hastalarda normal popülasyona göre daha fazla görüldüğü bildirilmiştir. AAA'li hastalarda mezenşial proliferatif glomerulonefrit ve hızlı progresif glomerulonefrit görülmüştür (25). Diğer nadir komplikasyonlar arasında perikardit ve kardiak tamponad sayılabilir (21).

#### **2.1.5. Laboratuvar Bulguları**

AAA atakları sırasında nonspesifik bir akut faz yanıtı olur. Eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve serum C-Reaktif Protein (CRP), fibrinojen, alfa 2 ve beta globulin düzeyleri artar, lökositöz olur. Akut faz yanıtı, amiloidoz gelişmiş hastalarda daha abartılıdır. Amiloidozun erken bulgusu mikroalbuminüri ve proteinüridir. AAA seyrinde mikroskopik hematüri ve atak sonrasında gaitada gizli kan saptanabilir. Eklem ponksiyonunda sinovyal sıvı viskozitesi azalmış, münin pıhtısı ise normal, lökosit sayısı değişkendir, PMNL baskınlığı vardır. Kültürde üreme yoktur. Sinovyal biyopsi nonspesifiktir. Atak sırasında peritoneal veya plevral sıvı; fibrin, protein ve lökosit zengin steril bir eksuda niteliğindedir.

Radyolojik bulgular nonspesifiktir. Akut atak sırasında akciğer grafisinde plevral efüzyon, abdominal atak sırasında da ayakta direkt karın grafisinde hava sıvı seviyeleri tespit edilebilir. Akut artritte yumuşak doku şişliği ve geçici osteoporoz görülebilir.

### 2.1.6. Tanı

AAA'nin teşhisinde spesifik bir test olmadığı için klinik tanı geçerlidir. Klinik bulguların ve etnik grubun uygunluğu, kolşisine yanıt ve başka bir nedene bağlı olmayan AA tipi amiloidoz tanı için önemlidir. Genetik bilimindeki hızlı ilerlemeler de AAA tanısını klinik tanıdan ileriye götürememiş, sadece destekleyici bulgu olarak kalmıştır. Tipik ataklarla başvuran hastalarda tanı oldukça kolaydır. Ancak, AAA ülkemizde çok yaygın görülmesine rağmen tanıda gecikme süresi ortalama 9,3 yılı bulmaktadır.

Tanı için değişik kriterler geliştirilmiş olup en sık Tell-Hashomer kriterleri kullanılmaktadır (Tablo 1) (28).

**Tablo 1.** AAA tanısında Tell Hashomer kriterleri

Major Kriterler:
1.Peritonit, sinovit veya plöritin eşlik ettiği tekrarlayan ateş atakları
2.Predispoze hastalık olmadan AA tipi amiloidoz olması
3.Sürekli kolşisin tedavisine iyi yanıt
Minör Kriterler:
1.Tekrarlayan ateşli ataklar
2.Erizipel benzeri eritem
3.Birinci derece akrabalarda AAA olması
Kesin tanı: 2 major veya 1 major, 2 minör kriter
Muhtemel tanı: 1 major ve 1 minör kriter

Livneh ve ark. tarafından geliştirilen AAA tanısına yönelik kriterlerin sensitivitesi ve spesifitesi % 99 olarak tespit edilmiştir (28) (Tablo 2).

**Tablo 2.** AAA tanısında Livneh kriterleri

<p><b>Majör</b>  <b>Tipik Atak*:</b>  1-Generalize peritonit atağı  2-Unilateral plörit veya perikardit  3-Monoartrit (kalça, diz, ayak bileği)  4- Ateş  5-İnkomplet abdominal atak**</p>
<p><b>Minör</b>  <b>İnkomplet atak**:</b>  1.Plevral atak  2-Eklem atağı  3-Egzersizle ortaya çıkan bacak ağrısı  4-Kolşisinden iyi yanıt alınması</p>
<p>* Tipik atak: Rekürren (aynı yerde yılda en az 3 atak ), ateşli (38 ° C ve üstü rektal ateş), kısa süreli (12 saat -3 gün )  ** İnkomplet atak: Tipik ataktan aşağıdaki 1-2'si farklı olan rekürren ağırlı ataklardır.</p> <p>1- Ateş 38 °C'nin altında veya normal  2- Ataklar tipik ataktan daha kısa veya daha uzundur ancak 6 saat- bir hafta arası olmalı  3- Atak sırasında peritonit bulguları saptanmaz  4- Peritonit lokalizedir  5- Eklem tutulumu kalça, diz veya ayak bileği dışında bir eklemdir.</p> <p><b>Tanı için 1 major veya 2 minör kriter yeterlidir.</b></p>

### 2.1.7. Tedavi

İlk kez 1972 de Goldfinger tarafından AAA tedavisi için önerilen kolşisinin etkinliği (29), 1974 de Zemer ve ark.'nın yaptığı çift kör bir çalışma ile gösterilmiştir (30). Atak sırasında başlanan kolşisinin, o atağı geçirici etkisi yoktur. Önerilen profilaktik kolşisin dozu 1-1,5 mg/gün'dür. 2 mg/gün üzerinde ise toksisite riskini artırmak dışında yarar sağlamaz (29). Karın ağrısı ve plevral ataklar kolşisine iyi yanıt verirken, eklem bulguları tedaviye dirençlidir. Kolşisinin etki mekanizması patogeneze bölümünde belirtilmiştir.

Akut atak sırasında indometazin gibi nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAEİ) kullanılabilir. Steroidler ise etkisizdir. Hatta steroid tedavisine yanıtızsızlık ayırıcı tanıda önemlidir (9).

Kolşisin amiloidoz gelişimini de önler. Kolşisinin proteinürisi olan hastalarda bile böbrek fonksiyonlarındaki bozulmayı azalttığı, ayrıca amiloidozu geriletmediği bildirilmiştir (5).

Amiloidoza bağlı son dönem böbrek yetmezliği gelişen hastalarda diyaliz veya transplantasyon yapılabilir. Transplant böbrekte amiloidoz gelişiminin, 1,5 mg/gün dozunda kolşisinle önlenmediği gösterilmiştir (31).

Kolşisinin gebelikte kullanımına ara verilmeden devam edilmesi, ataklar sırasında oluşabilecek komplikasyonların sonuçlarının daha kötü olması nedeniyle gereklidir. Gebeliğin 4-5'inci aylarında amniosentez yapılması tavsiye edilir (32).

Kolşisinin en sık görülen yan etkileri gastrointestinal sistemde olur. Gastrointestinal sistem motilitenin artmasına bağlı olarak bulantı-kusma, karın ağrısı ve ishal görülebilir. Doza bağlı olan bu yan etkiler, genellikle dozun azaltılmasına iyi yanıt verir. Daha nadiren miyopati, periferik nöropati, alopesi, kemik iliği baskılanması, oligospermi, azospermi görülebilir. Çok yüksek dozlarda (6-8 mg/gün üzerinde) gastrointestinal kanama, deri döküntüsü, karaciğer ve böbrek yetersizliği, metabolik asidoz, hipokalsemi, konvülsiyon ve koma görülebilir (5).

AAA'li hastaların yaklaşık 1/4'ü kolşisin tedavisine dirençlidir. Bu hastalarda tedaviye eklenen interferon- $\alpha$ 'nın etkili olduğunu gösteren çalışmaların yanında (33), belirgin etkisinin olmadığını öne süren çalışmalar da vardır (34). Eklem tutulumu genellikle fonksiyonel olarak iyileştiği için konservatif yaklaşım yeterli olur.

Kolşisin ve NSAİİ tedavilerine yanıtız, inatçı eklem tutuluşunda eklem içi steroid ve sinoviyektomi denenebilir. Uzamış artritli vakalarda interferon- $\alpha$  tedavisinin sinoviyektomiye alternatif bir tedavi olabileceği de savunulmaktadır (35).

Onat ve ark. yaptıkları bir çalışmada kolşisin tedavisine yanıt vermeyen hastalarda tedaviye selektif serotonin reuptake inhibitörleri (SSRI) eklenmesinin atak sayısını belirgin şekilde azalttığını öne sürmüşlerdir (36).

Anti TNF- $\alpha$  ajanlarının AAA tedavisindeki rolü açık değildir. İnflksimab tedavisi almış birkaç vaka bildirilmiştir. Çoğunda özellikle eklem bulguları üzerinde iyi sonuçlar alınmıştır. Mor ve ark. ise TNF- $\alpha$  blokörü olarak Etanercept kullanmışlar ve semptomlarda belirgin düzelme sağlamışlardır (37).

## 2.2. Oksidatif Stres

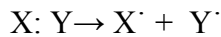
### 2.2.1 Serbest Radikaller

Dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan serbest radikaller, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte üretilen, oldukça aktif haldeki atom veya moleküllerdir. Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve bu son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Her tip kimyasal ve biyokimyasal tepkime atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini olağanüstü artırır, dolayısıyla serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (38).

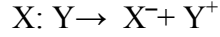
Oksijen (O<sub>2</sub>) bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküldür. Radikal olmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir anlatımla Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ifade edilmektedir. Serbest radikaller organizmada normal şartlar altında sürekli oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler ve biyolojik sistemlerde en sık elektron transferi ile oluşurlar (39).

İnsan vücudunda serbest radikaller 3 yolla meydana gelir.

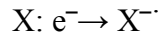
**1.** Kovalent bağlı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kalarak homolitik bölünmesi: Yüksek sıcaklık ve yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar, kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı atomlar üzerinde kalır ise, her iki atom üzerinde paylaşılmamış elektron bulunur. Sonuç olarak, iki adet reaktivite düzeyi yüksek serbest radikal oluşur.



**2.** Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi: Radikal özelliği olmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur. Askorbik asit, GSH ve tokoferoller gibi hücrel antioksidanlar radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formu oluşur.



3. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi yoluyla: Radikal özelliği olmayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir. O<sub>2</sub>'in tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidin (O<sub>2</sub><sup>-</sup>·) oluşumuna neden olur.



Radikal olmayan türler bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda radikal haline gelir. Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sıra ile serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (40).

Nitrojen molekülleri ve O<sub>2</sub> serbest radikal kaynaklarıdır. O<sub>2</sub>'in kısmi indirgenmesinden ROT olan hidroksil (·OH) radikali ve (O<sub>2</sub><sup>-</sup>·) oluşmaktadır. Ayrıca singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) molekülleri, radikal olmayan ROT olarak ifade edilirler. O<sub>2</sub> kaynaklı olmayan diğer serbest radikaller ise nitrik oksit (NO·), peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>·), lipid peroksidasyonu (LPO) sırasında oluşan peroksil (ROO·) ve karaciğerdeki karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) metabolizması sırasında oluşan triklormetil (CCl<sub>3</sub>·) radikalidir (40, 41).

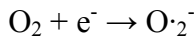
Organizmadaki serbest radikallerin en önemlisi ve büyük kısmı O<sub>2</sub> kaynaklı radikallerdir. O<sub>2</sub>'in toksik etkisi yoktur, ancak aerobik hücre metabolizması sırasında serbest oksijen radikallerine dönüşür. O<sub>2</sub>'in kısmi indirgenmesinden, ROT arasında yer alan ·OH ve O<sub>2</sub><sup>-</sup>· oluşmaktadır. (42, 43) (Tablo 3).



**Tablo 3.** ROT, simgeleri ve elektron yapıları

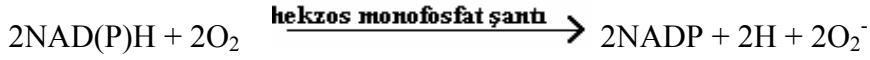
ROT	Simgesi	Elektron Yapısı
Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot-}$	$\left[ \cdot \ddot{O} : \ddot{O} \right]^-$
Hidroksil radikali	$\cdot OH$	$\cdot \ddot{O} : H$
Singlet oksijen radikali	$^1O_2$	$\cdot \ddot{O} : \ddot{O} \cdot$
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	$H : \ddot{O} : \ddot{O} : H$

Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ );  $O_2$ 'in indirgenmesi ile oluşan ilk üründür. En önemli kaynağı, mitokondriyal elektron transport zinciridir.

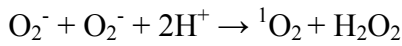


Uzun yarılanma süreli ve düşük tepkili bir radikaldir.  $O_2^{\cdot-}$ ,  $O_2$ 'in oksidatif fosforilasyonu esnasında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NAD(P)H)-oksidaz veya ksantin-oksidaz gibi enzimlerin katalizörlüğünde bir elektron indirgenmesi sonucunda meydana gelmektedir.  $O_2^{\cdot-}$ 'in yarılanma ömrü hücrelerin farklı yerlerinde bulunan süperoksit dismutaz (SOD) enziminin varlığına bağlıdır. Ayrıca indirgeyici moleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken  $O_2^{\cdot-}$  oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler gibi yüzlerce molekül aerobik ortamda oksitlenirken  $O_2^{\cdot-}$  yapımına neden olurlar. Başta çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında  $O_2^{\cdot-}$  bir ürün olarak oluşabilmektedir (38, 44).

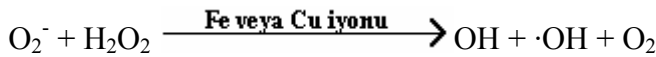
$O_2^{\cdot-}$ 'in dokulardaki en önemli kaynağı, PMNL fonksiyonları sırasında üretilendir. Daha az miktarda olmakla birlikte eozinofil ve lenfositler de antibakteriyel bir ajan olarak  $O_2^{\cdot-}$  üretirler. PMNL'lerde  $O_2^{\cdot-}$  üretimi membran bağlı azalmış NAD(P)H-oksidadaz şantı (veya heksoz monofosfat şantı) yolu ile gerçekleşir (38, 45).



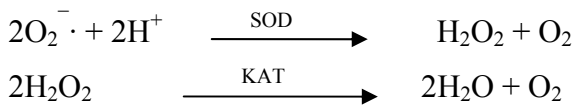
$O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  radikalinden daha zayıf reaktif özelliği olan bir molekül olmakla birlikte biyolojik dokulara zarar verebilir. Hücre hasarına neden olarak, aköz ortamda spontan bir biçimde  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $^1\text{O}_2$  radikaline dönüşebilir.



$O_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  radikali ile reaksiyona girerek daha etkili  $\cdot\text{OH}$  radikaline de dönüşebilir. Bu reaksiyon için metal iyonlarına [demir ( $\text{Fe}^{+2}$ ) ve bakır ( $\text{Cu}^{+2}$ )] gereksinim vardır.

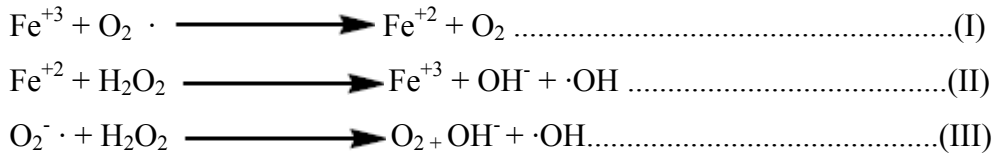


$O_2^{\cdot-}$ 'in dokulardan uzaklaştırılması,  $\text{H}_2\text{O}_2$  spontan dismutasyonu yolu ile olur. Bu reaksiyon SOD enzimi tarafından da katalizlenir.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ikinci bir enzimle [katalaz (KAT)] uzaklaştırılır (38, 45).

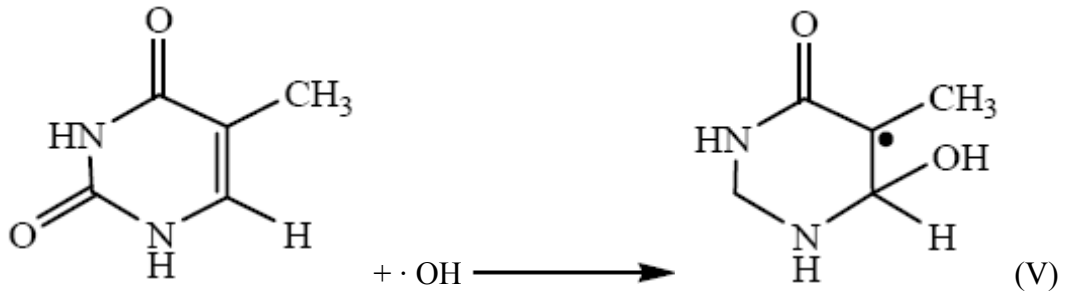
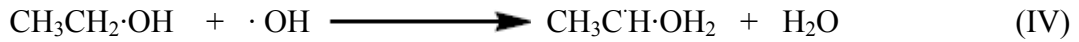


Hidroksil radikali ( $\cdot\text{OH}$ ); bilinen en reaktif radikaldir. Bu radikal, DNA sarmallarında kırılmaya sebep olur, hidroksilasyon için temel oluşturur ve gen mutasyonlarına neden olarak malign transformasyonlara veya hücre ölümlerine yol açar.  $\cdot\text{OH}$  aynı zamanda klasik serbest radikal reaksiyonunu (LPO) da stimüle etmek yoluyla doku yıkımında rol oynamaktadır.  $\cdot\text{OH}$ , membran fosfolipitlerine yakın bölgede oluşursa, lipit zincirlerini etkiler ve peroksil radikalleri,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve lipit

hidroperoksitleri gibi ara radikaller oluşur. Hidroksiperoksitlerin birikimi, membran fonksiyonlarını bozabilir veya hidroksiperoksitler ayrışarak sitotoksik aldehitlere dönüşebilir.  $\cdot\text{OH}$ , en aktif ve en toksik oksijen radikali olarak üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir.  $\cdot\text{OH}$ , iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluşabildiği gibi  $\text{H}_2\text{O}_2$  molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilmektedir.  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  gibi metal iyonları tarafından katalizlenen bu indirgenme reaksiyonu Haber-Weiss tepkimesi (Şekil 1) olarak bilinmektedir. IV ve V numaralı reaksiyonlar, III numaralı reaksiyonun ara basamaklarıdır (46, 47) (Şekil 2).



**Şekil 1.** Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması



**Şekil 2.**  $\cdot\text{OH}$  radikalinin biyolojik moleküllerle reaksiyonları

Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan  $\cdot\text{OH}$ , su dahil ortamda rastladığı her molekül ile tepkimeye girer. Bütün bu tepkimeler,  $\cdot\text{OH}$ 'in paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (47, 48).

LPO olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonu,  $\cdot\text{OH}$  radikalinin sebep olduğu en önemli hasardır.  $\cdot\text{OH}$  radikalinin başlıca hedefi, hücre zarı su

içermediğinden dolayı yağ asididir. Zar lipitlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozabilmekte ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilmektedir (38, 44, 46).

Singlet oksijen radikali ( $^1O_2$ ), gerçek bir radikal değildir. Çünkü eşleşmemiş elektron taşımaz.  $O_2$ 'in yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında, dış yörüngesindeki bir elektronun enerjisinin değişmesi ve stabilitenin bozulmasıyla oluşur.  $O_2$ 'in kinetik olarak uyarılan bu formu, membran lipitleri ile oldukça yüksek reaktivite gösterir ve hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle (PUFA) reaksiyona girmesiyle, lipit peroksitlerin oluşumuna yol açabilmektedir (38, 49).

$H_2O_2$  radikali enzimatik olarak  $O_2$ 'in iki elektron alarak indirgenmesiyle ya da  $O_2\cdot^-$  radikallerinin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu sonucu oluşur. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Güçsüz bir oksidan olmasına rağmen hücre membranlarından kolayca diffüze olabildiği için ve ayrıca geçiş metalleriyle Fenton reaksiyonuna girdiği için hasar oluşturmada yüksek potansiyele sahiptir.

$H_2O_2$ , özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan  $Fe^{+2}$  ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif formlarını oluşturur. Ayrıca bu radikal birçok pro-enflamatuvar sitokinin transkripsiyonundan sorumlu nükleer faktör kappa-B (NF- $\kappa$ B)'nin oksidasyonunda rol oynar.  $H_2O_2$  radikalinin uzaklaştırması hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan KAT ve peroksidaz enzimleri ile gerçekleştirilebilir (50-52).

LPO sırasında oluşan  $ROO\cdot$ ,  $NO\cdot$ ,  $ONOO\cdot$  ve karaciğerdeki  $CCl_4$  metabolizması sırasında oluşan  $CCl_3$  oksijen kaynaklı olmayan diğer serbest radikallerdir (38, 53).

Vücutta üretilen radikaller, vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde de önemli rol oynarlar, Mitokondride aerobik solunumda kullanılan  $O_2$ 'in % 2-5'i bu tür tepkimelerde kullanılmak üzere serbest oksijen radikallerine dönüştürülür. Steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiğin üretimi, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve

sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için serbest radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur (38).

Serbest radikaller, normal insan fizyolojisinde endojen kaynaklı olarak indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimelerinde; mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron iletim sistemlerinde (Sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi metabolik olaylar sırasında bol miktarda üretilir. Ayrıca bu moleküller hücre içerisinde ultraviyole ışınları, x ışınları gibi radyant enerjinin emilimi, hava kirliliği, sigara dumanı, ilaç kullanımı (parasetamol, nitrofurantoin gibi), solventler gibi çevresel faktörlerin etkisiyle eksojen kaynaklı olarak da oluşabilirler.

Malignite, Diabetes Mellitus (DM), Ateroskleroz ve Nörodejeneratif hastalık gibi birçok patolojik olayla ilişkili olan serbest radikallerin en zararlı biyolojik etkisi; hücre membranı yağ asitlerine ve lipoproteinlere saldırması ve LPO olarak bilinen bir reaksiyon zincirini başlatarak, membran proteinlerine hasar verip yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olmasıdır (54).

### **2.2.1.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri**

Antioksidan savunma mekanizması ve serbest radikaller arasındaki denge oksidanlar lehine bozulduğunda serbest radikaller; lipit, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır (38, 54, 55).

*1) Membran Lipitleri Üzerinde Etkileri:* Serbest radikaller, hücre komponentleri ile etkileşim içine girebilmeleri için hücre membranını geçmek zorundadır. Hücre zarı, içerdiği PUFA nedeniyle oksidatif hasara oldukça duyarlıdır. Yağ asidi zincirinden, serbest radikallerin etkisi ile hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin de radikal özelliği kazanmasına neden olur. LPO, PUFA'nin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlar, zincir reaksiyonları şeklinde devam eder ve sonucunda MDA, 4-hidroksinoneal (HNA), alkoller, etan ve pentan oluşur. LPO sonucu membran bütünlüğü bozulması ile membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar.

MDA DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri üzerinde genotoksik ve karsinojen etkilidir. LPO ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (54, 56).

2) *Proteinler Üzerinde Etkileri:* Serbest radikallerin etkilerine karşı proteinler, lipitlere göre daha az hassastırlar ve etkilenme dereceleri aminoasit içeriklerine bağlıdır. Serbest radikal atağı sonucu proteinlerde aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu ve agregasyonu veya çapraz bağlanmaları gibi yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Böylece enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarını bozabilir, immün sistemi uyarabilecek antijenik değişikliklere de yol açabilirler (56-58).

3) *Karbonhidratlar Üzerinde Etkileri:* Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler otooksidasyona uğrayarak,  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$  radikallerini meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonu, çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. DM ve komplikasyonlarının gelişimi, koroner kalp hastalığı, göz hastalıkları, kanser, hipertansiyon, romatoid artrit, psöriazis ve yaşlılık gibi pek çok hastalıkta ve durumda serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan mekanizmaların yetersiz olduğu gösterilmiştir (57, 59)

4) *DNA Üzerinde Etkileri:* DNA üzerinde serbest radikaller, nükleik asit-baz modifikasyonlarına, nokta mutasyonlara, DNA çift sarmalının açılmasına, depürinasyona, çapraz bağlanmalara neden olabilir. Bu etkiler kromozomal mutasyonlar ve sitotoksisite ile sonuçlanır (38).

### 2.2.2 Antioksidanlar

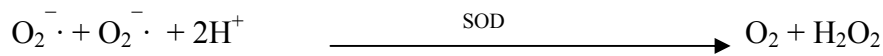
Nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için serbest radikal reaksiyonları gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Bunlar önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalardır (38).

Antioksidan savunma; canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya

geciktirilebilmesidir. Bu süreçte rol oynayan maddelere ‘antioksidanlar’ denir (60). Enzimatik antioksidanlar SOD, KAT ve GSH-Px enzimleridir. SOD’ın yapısında bakır, çinko ve manganez, GSH-Px’da ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar (46, 61). Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilirubin, β-karoten sorumludur. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (46, 57).

### 2.2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

*Süperoksit Dismutaz (SOD):*  $O_2^-$  radikalinin  $H_2O_2$  ve  $O_2$  moleküllerine dönüşümünü katalizlemektedir. Metalloprotein olan SOD, hücrelerdeki  $O_2^-$  düzeylerini kontrol etmede rol oynar. SOD, bir  $O_2^-$  radikalini yükseltirken, diğer  $O_2^-$  radikalini  $H_2O_2$ ’e indirger (62).



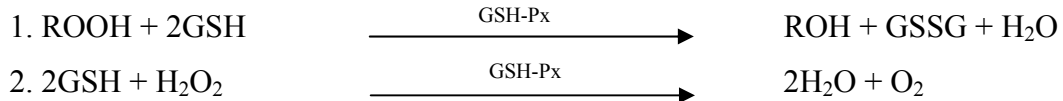
Memelilerde üç tip SOD izoenzimi tanımlanmıştır:

*1.Çinko-Bakır (Cu-Zn) SOD:* Genellikle lizozomda ve sitozolde lokalizedir. Cu atomları enzimatik aktiviteden sorumluyken, Zn atomları enzimin stabilitesinden sorumludur. Cu-Zn SOD’ın antioksidan savunmada ilk sırada yer aldığı düşünülmektedir (61).

*2.Manganez (Mn) SOD:* Mitokondriyal SOD olarak da ifade edilir,

*3.Ekstraselüler SOD (EC-SOD):* EC-SOD, ekstraselüler bölümlere salgılanabilir ve hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlara bağlanabilir, Cu-Zn SOD gibi kofaktör olarak Zn ve Cu kullanır. EC-SOD’un  $ONOO^-$  aktivitesini önlediği düşünülmektedir. Yüksek  $O_2$  kullanımı olan eritrosit gibi hücrelerde SOD aktivitesi fazladır. SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde de rol oynamaktadır. Bu nedenle SOD nötrofil fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de SOD fazla miktarda bulunmaktadır (58).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): GSH-Px, glutasyon yolunun ilk enzimidir, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H'a bağımlıdır (63).



GSH-Px, üç peptidli glutasyonu kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan  $\text{H}_2\text{O}_2$  radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldırabilme özelliği gösterir (64).

Selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere farklı substratlar kullanan iki tip GSH-Px vardır. Selenyumdan bağımsız formu organik  $\text{H}_2\text{O}_2$  moleküllerini kullanıp, yüksek bir aktivite gösterebilir. Selenyuma bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve kapasitesi daha düşüktür (64).

Fagositik hücrelerde majör peroksit uzaklaştırıcı olarak görev yapan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte, oksidatif patlama sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (63).

Katalaz (KAT): İçeriğinde  $\text{Fe}^{+3}$  bulunduran dört hem grubuna ayrılmış, glikoprotein yapısında, bir hemoproteindir. SOD'ın oluşturduğu  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalanmasında rol alır



KAT, hemen hemen tüm memeli hücrelerinde, ağırlıklı olarak eritrosit, karaciğer ve böbrekte bulunur (58).

#### 2.2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

*GSH:* Sistein içeren bir tripeptit yapısında olup in vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve eksojen bir antioksidandır. Peroksidazlar için substrat görevi görebilen GSH, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (60).



GSH, DNA sentezi ve hasarlı parçalarının onarılmasında etkindir; aminoasit transportu, peroksit metabolizması, iskelet-kas bütünlüğü ve birçok enzim aktivitesinin düzenlenmesinden sorumludur ve eksikliği hücre ölümüne yol açar (62).

Enzimatik olmayan diğer antioksidanlar şunlardır;

C Vitamini (Askorbik Asit)

E Vitamini

A Vitamini

Karotenoidler

$\alpha$ -Lipoik Asit (LA)

Ubikinonlar (Redükte Koenzim Q)

Ürik Asit

Bilirubin

Albümin

Transferrin

Seruloplazmin

### 2.2.2.3 Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar; ROT ve nitrojen türlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle hasarlanmış dokuların tamiri, diğer antioksidanların onarımı/yenilenmesi ve metal şelasyonu gibi farklı etki şekillerinden birini veya birkaçını ortaya koyarlar. Biyolojik sistemlerde oksidanların yıkımı ve oluşumu arasındaki denge, hücre ve dokunun biyolojik bütünlüğünün sürdürülmesinde önemlidir (65).

Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

*Süpürücü etki (Temizleme Etkisi) (Scavenging):* ROT'ni etkileyerek onları tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler bu şekilde etki gösterir.

*Bastırıcı etki (Baskılama Etkisi) (Quencher):* Vitaminler, flavonoidler ve trimetazidin, radikallere bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya onları inaktif forma dönüştüren bir etkiye sahiptir.

*Onarıcı etki (Onarma Etkisi) (Repair):* Bu grupta DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz sayılabilir.

*Zincir kırıcı etki (Zincir Koparma Etkisi) (Chain breaking):* Serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye denir. Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller bu tip etki göstermektedir (65-67).

### 2.2.3 Fizyolojik Süreçlerde Oksidatif Stres

O<sub>2</sub>, hücrenin günlük aktiviteleri için gerekli enerjiyi sağlar. Besin kaynakları, hücrenin enerji santrali olan mitokondrideki respiratuvar elektron transport zincirindeki enzimatik reaksiyon süreciyle oksidize edilirler, bir başka deyişle elektronlarını kaybederler. Bu süreçte en son elektron alıcısı O<sub>2</sub>'dir ve bu elektron transferleri sırasında elde edilen enerji, kimyasal enerji formunda depolanır. Oksidatif fosforilasyon olarak ifade edilen bu reaksiyonlar zinciri sonucunda hücresel enerjinin kaynağı olan adenosin trifosfat (ATP) elde edilir. Bu reaksiyonların moleküler temeli, elektron alışverişidir.

Redoks (redüksiyon-oksidasyon reaksiyonu); atomların oksidasyon durumlarının değiştiği tüm kimyasal reaksiyonların genel adıdır. Redoks kelimesi, redüksiyon ve oksidasyon terimlerinden köken alır.

Redüksiyon, elektronların/hidrojenin kazancını veya oksijen kaybını; molekül, atom veya iyondaki oksidasyon durumunun azalışını ifade eder.

Oksidasyon, elektronların/hidrojenin kaybını veya oksijen kazancını; molekül, atom veya iyondaki oksidasyon durumunun artışını ifade eder (57).

Elektron transferi olmaksızın da çeşitli reaksiyonlarda aktif olarak bir redoks reaksiyonu gerçekleşebilir. Dolayısıyla oksidasyonu 'oksidasyon miktarındaki artış' ve redüksiyonu 'oksidasyon miktarında azalma' olarak ifade etmek mümkündür. Her hücrede belli yapılar içinde elektron konsantrasyonu bulunur, sıkı şekilde denetim altında olan ve normal hücresel işlevi belirleyen bu denge haline 'redoks durumu' denir. Hücrenin redoks durumu, asit-baz dengesinde olduğu gibi (pH) normal şartlarda dar bir çerçeve içinde dengede tutulur. Hücre içi redoks homeostazı veya

redoks tamponlaması, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarının ürünleri arasındaki dengeye dayalıdır (68).

Hücreler birbirleriyle iletişim kurmasını sağlayan biyolojik mekanizma sinyal iletimidir ve yine bu mekanizma aracılığıyla hücre dışı uyarılara cevap verirler. Sinyal iletimi, hücre dışından hücre içine bilgi taşınmasını sağlayan bir süreçtir. Hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve nörotransmitterler gibi hücre dışı sinyaller, sinyal iletimini tetikler. Sinyal iletim süreçleri kas kontraksiyonu, gen ekspresyonu, hücre büyümesi ve sinir iletimi gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri başlatır (69).

Reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin hücre ve doku hasarı yapıcı etkinliği ön plana çıksa da hücreler arası sinyallerin düzenlenmesi ve iletiminin birçok aşamasında fizyolojik olarak temel rol oynarlar. Hücre büyümesi ve farklılaşmasında etkin olan sinyal ileti yollarının uyarılması ve devamlılıklarının sağlanmasında rol oynayan ROT'ni hücreler, endojen olarak sentezlemektedirler (46, 70).

Hormonların, anjiyotensin II, platelet kaynaklı büyüme faktörü, IL-1 $\beta$ , IL-3, TNF- $\alpha$ , sinir büyüme faktörü, granülosit-makrofaj koloni-stimüle eden faktör ve fibroblast büyüme faktörü gibi sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin uyarısıyla birçok hücre tipinde düşük konsantrasyonlarda serbest radikal üretildiği belirlenmiştir. Buna göre; birçok sinyal iletim yolunun başlaması ve/veya doğru çalışmasının, bu yolların çeşitli aşamalarında ROT'nin etkinliğine dayandığı ve bu moleküllerin ikincil mesaj taşıyıcı olarak fizyolojik olarak önemli rol oynadığı düşünülmektedir.

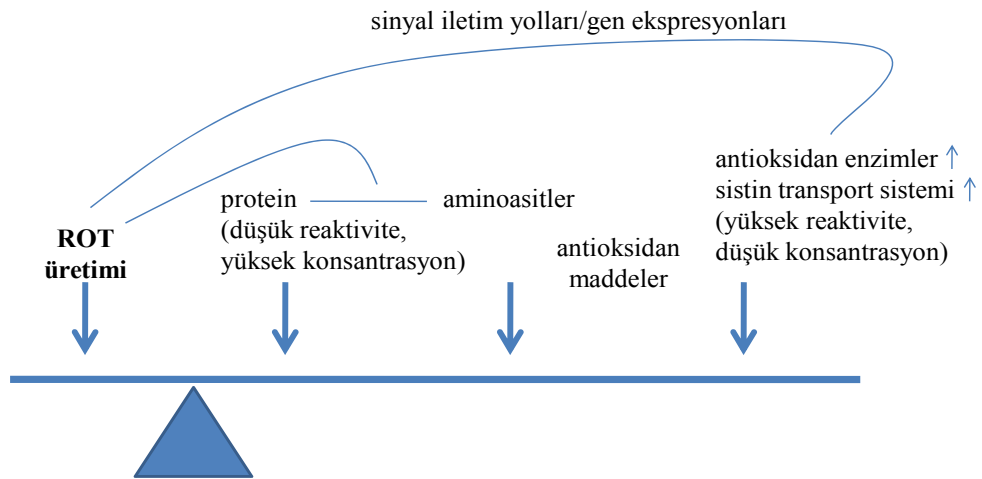
Fizyolojik süreçlerde hücreler, redoks homeostazını sağlamaya yönelik olarak, hücre içerisinde artmış olan serbest radikal seviyelerine karşı tiyoredoksin (TRX) ve GSH sistemlerini aktive ederek oksidatif stres cevabını oluşturur. Böylece hücre ve dokuda ROT klirensi sağlanır, redoks dengesi korunur. Bu noktada oksidatif ürünlere karşı antioksidan aktivitenin dengeleyici rolü sadece moleküler reaksiyon mekanizmalarıyla sınırlı değildir. Bazı hücre sinyal ileti yollarının oksidanlara ve hücrel redoks dengesine oldukça duyarlı olması; serbest radikallerin ve antioksidanların, hücrede fonksiyon düzenleyici enzim ve proteinlere yönelik gen ekspresyonunu regüle etmelerini gerektirir. Dolayısıyla antioksidanlar hücre büyümesi, gelişimi, farklılaşması ve fonksiyonunun önemli bileşenleridir (71, 72).

Serbest radikaller ve antioksidanların fizyolojik yanıtlardaki düzenleyici rolleri, redoks homeostazını korumaya yönelik temel mekanizmalara bağlıdır ve birçok fizyolojik fonksiyon, redoks durumuna cevap veren ileti yolları aracılığıyla kontrol altında tutulur.

Redoks regülasyonu; hücreyi oksidatif strese karşı koruma ve redoks homeostazının devamlılığının sağlanmasıdır. Birçok temel fizyolojik fonksiyon, NO ve ROT üretimlerinin ve sinyal ileti yolları üzerindeki etkilerinin düzenlenmesine dayalıdır.

### 2.2.4 Patolojik Süreçlerde Oksidatif Stres

Geçici olarak artmış serbest radikal konsantrasyonlarına maruz kalan canlı hücre ve dokular, redoks dengesini yeniden oluşturmaya yönelik birçok mekanizmayı çalıştırır. ROT üretim düzeyleri ile antioksidan savunma kapasitesi sabit ve dengedeysse, hücre ve dokular stabil durumdadır (73) (Şekil 3). ROT seviyelerinin stabiliteledeki devamlılık, ROT üretim düzeyleri ile temizleyici/süpürücü mekanizmaların etkisi arasındaki dengeye dayalıdır.

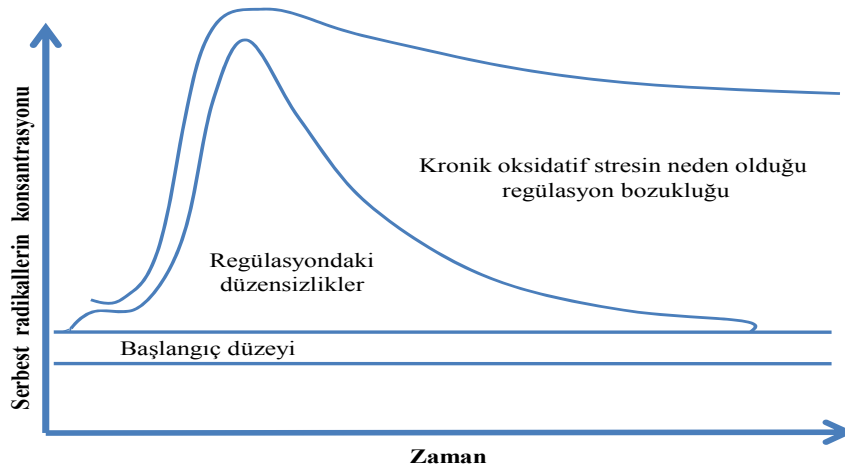


**Şekil 3.** Redoks homeostazının mekanizmaları.

GSH-Px, SOD ve KAT gibi belli antioksidan enzimler etkili ROT temizleyicileridir, ancak hücrelerde sadece göreceli olarak düşük konsantrasyonlarda

bulunurlar. Aynı durum, enzimatik olmayan antioksidanlar için de geçerlidir. Aminoasitler ve proteinler de ROT temizleyicisidir (38).

Redoks sinyal iletiminin çalışması; ROT konsantrasyonlarında artış ya da bir veya daha fazla antioksidan sisteminin aktivitesinde azalmaya bağlı dengenin bozulmasını gerektirir. Yüksek organizmalarda bu tip oksidatif bir olay, endojen serbest radikal üretimi yapan sistemlerin kontrollü aktivasyonu ile düzenlenebilir. Diğer taraftan, çevresel faktörlerin oluşturduğu oksidatif stres şartları da benzer cevapların oluşmasını sağlayabilir. Eğer ROT düzeylerindeki ilk artış göreceli olarak düşükse, ROT artışını dengelemek için antioksidan cevap yeterli olacaktır. Dolayısıyla, redoks regülasyonunun fizyolojik belirtileri, hücre içinde oksidatif duruma doğru geçici bir artış ve değişiklik şeklindedir (Şekil 4). Uzun dönemde, bu mekanizmalar redoks homeostazı olarak adlandırılan stabil bir duruma kazanmaya eğilim gösterir.



**Şekil 4.** Redoks dengesi

ROT üretimi belli şartlar altında çok daha güçlüdür, antioksidan cevap ise redoks dengesinin yeniden oluşturulmasını sağlayamayabilir. Bu tip durumlarda sistem şekil 4'teki modele göre bir yarı-denge durumunu yakalayabilir, ancak bu durum daha yüksek ROT konsantrasyonları, farklı düzeylerde serbest aminoasitler ve/veya redoksa duyarlı sinyal ileti yollarına bağlı farklı gen ekspresyon tipleriyle ilişkilidir. Yaşlanma süreci, bu tip bir yarı denge süreci için iyi bir örnektir.

Dolayısıyla, oksidatif yöndeki her öncül değişim, kesin bir patolojik süreç ve durumla ilişkilendirilemeyebilir (74).

Çok şiddetli ve yüksek ROT üretim düzeyleri söz konusu olduğunda patolojik durumlar ortaya çıkabilir. Bu durumların gelişimi, bir homeostaz kaybından çok homeostaz seviyesinde kronik bir değişiklik ile ilgilidir. Buna göre, patolojik durumlar hem ROT üretiminin hasar verici etkilerinden, hem de ROT'nin yönlendirdiği gen ekspresyonundaki değişikliklerden kaynaklanabilir. Oksidatif stresin birçok klinik durumda rol oynadığına dair bulgular gittikçe artmaktadır.

### **2.3. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali**

#### **2.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi**

Hücrelerin işlevleri hücrel iyon değişimleri ile tetiklenmektedir.  $Ca^{+2}$ , hem hücre içi süreçlerde, hem de hücreler arası etkileşimde önemli görevlere sahiptir. Canlılarda gerçekleşen pek çok önemli olayda  $Ca^{+2}$  belirleyici rol oynamaktadır. Bu olaylar arasında hareket, kalp atışı, beynin bilgiyi işleyip hafızayı oluşturması, yumurtanın dölleme sonucu aktivasyonu, pankreatik hücrelerde salgılama, yaraların iyileşmesi, karaciğer hücrelerinin davranışlarının düzenlenmesi ve apoptoz sayılabilir. Bu işlevlerde en önemli tetikleyici temel iyon, sekonder haberci olarak bilinen,  $Ca^{+2}$  iyonudur. Hücre içi  $Ca^{+2}$  sinyali, hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun ( $[Ca^{+2}]_i$ ) geçici bir şekilde artışından oluşur (75).

#### **2.3.2 Hücre içi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu**

Endotel kaynaklı maddelerin sentezi veya salınımında  $Ca^{+2}$  iyonunun gerekliliği indirekt araştırma yöntemleri ile belirlenmesine karşın, moleküler mekanizmalar mikrospektrofluorometrik, elektrofizyolojik ve moleküler araştırma tekniklerin geliştirilmesi ile kısmen de olsa aydınlığa kavuşturulmuştur. Son yıllarda geliştirilen patch-clamp ve mikrospektrofluorometrik araştırma teknikleri ile beraber flüoresan ışığına duyarlı çeşitli boyalar hücre içerisindeki iyonik akımları ve hücre içi serbest iyon seviyelerinin ölçülmesini mümkün hale getirmiştir (75).

[Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>, hem hücre dışı ortama, hem de hücre içinde Ca<sup>+2</sup> depolayan yapılara göre çok düşük seviyededir. Bu nedenle Ca<sup>+2</sup>'un hücre içinde sinyal molekülü görevi yapabilir. Öyle ki hücre dışındaki [Ca<sup>+2</sup>]'u yaklaşık olarak 10<sup>-3</sup> M, Ca<sup>+2</sup> depolarında, örneğin endoplazmik retikulumda (ER) 5 x 10<sup>-4</sup> M civarlarında iken, [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> bu değerlerden binlerce kez daha düşük olan 10<sup>-7</sup> seviyelerindedir. Bu yüzden, hem hücre içi ile dışı arasında, hem de ER ile sitoplazma arasında, çok yüksek bir Ca<sup>+2</sup> derişim farkı vardır. Bu fark, Ca<sup>+2</sup> için çok büyük bir sürdürücü kuvvet oluşmasına sebep olur. Hem hücre zarı, hem de ER zarından Ca<sup>+2</sup> geçişi, bu sürdürücü kuvvetin etkisi ile protein yapıdaki kanallardan olur. Bu kanallar, çoğunlukla kapalı durumda olup; voltaj, mekanik uyarı ya da ligand bağlanması ile aktive olur ve Ca<sup>+2</sup> geçirgenliği sağlarlar (76)

Hücresinin işlevini etkileyen hücre içi serbest Ca<sup>+2</sup> iyon artışı iki yolla oluşmaktadır (77):

1-Hücre dışından hücre içine kalsiyum girişi,

2- Hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyumun salınması,

1-Hücre dışından sitoplazmaya Ca<sup>+2</sup> girişi sağlayan kanal tipleri şunlardır:

*A-Voltaj Bağımlı Ca<sup>+2</sup> kanalları:* Membran depolarizasyonu sonucu aktive olur. Bu aktivasyon, kanalları Ca<sup>+2</sup>'a geçirgen hale getirir. Bu sayede hücre zarındaki elektriksel olaylar, hücre içindeki fizyolojik olaylarla çiftlenir (78).

*B- Ligand Bağımlı Ca<sup>+2</sup> kanalları:* Hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve Ca<sup>+2</sup>'a geçirgen hale gelirler. Bu kanallar aynı zamanda birer reseptör görevi görürler. Bu kanallara nikotinik Asetilkolin (ACh) reseptörleri örnek verilebilir (79).

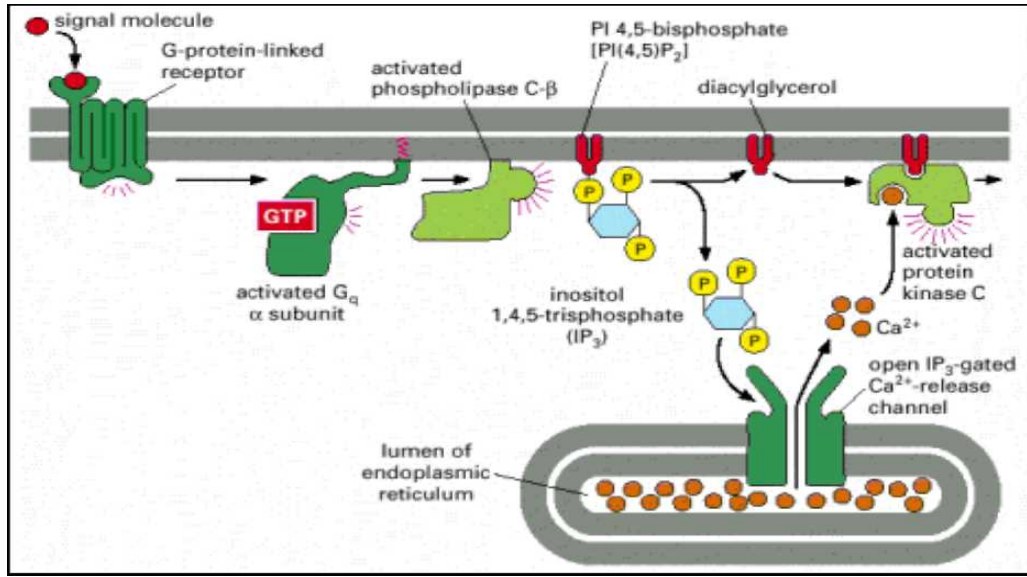
*C- Kalsiyumun sızarak hücreye girdiği kanallar:* Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre içi Ca<sup>+2</sup> depoları, Ca<sup>+2</sup> sinyali sonucu, ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya Ca<sup>+2</sup> girişine sebep olurlar.

*D- Na -Ca exchange (değiş-tokuş)*

2- Hücre içi Ca<sup>+2</sup> depolarından Ca<sup>+2</sup> çıkışını sağlayan yapılar

Ca<sup>+2</sup>'un hücre içi depolardan salınmasında Ca<sup>+2</sup> ve inositol trifosfat (İP3) ile uyarılan reseptörler rol almaktadır. Hücre membranında bulunan reseptörlere agonistlerin bağlanması ile aktive olan G proteininin uyardığı fosfolipaz C (PLC),

membran fosfolipitlerinde İP3 ve diaçilgliserol sentezine yol açmaktadır. Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PtdIns 4, 5P2) ve diaçilgliserol (DAG), protein kinaz C (PKC) yi aktive ederek bir seri fosforilasyon ve bunu izleyen aktivasyon veya inaktivasyona neden olurken; İP3 hücre içi depolardan heparinle bloke edilebilen  $Ca^{+2}$  salınımını sağlamaktadır. Hücre içi serbest  $Ca^{+2}$  artışının tetiklediği kalsiyum salınımı, pozitif geri-besleme mekanizması olarak iş görmektedir (Şekil 5).



Şekil 5. GPKR (G Proteini Kenetli Reseptör) etkili  $Ca^{+2}$  sinyali

3- Hücre içi depolara  $Ca^{+2}$ 'un alınması başka bir deyişle sitozolden  $Ca^{+2}$ 'un uzaklaştırılması üç yolla gerçekleşir:

A. Endoplazmik retikulum (ER) membranındaki Ca-ATPaz enzim aktivitesinin artmasıyla ER'a  $Ca^{+2}$  alımının artması.

B. Hücre membranındaki Ca -ATPaz yardımıyla hücre dışına  $Ca^{+2}$  atılması.

C. Diğer ikisine oranla daha az olmak üzere Na – Ca “exchange” (değiş-tokuş) yardımıyla olmaktadır. Dinlenme durumunda hücre dışı kalsiyum iyon yoğunluğu, hücre içine oranla 10000- 20000 kat daha yüksektir (77)



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1. Hasta-Kontrol Populasyonun Seçimi

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) İç Hastalıkları Romatoloji kliniği ile Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Tez projesi için gerekli olan 'etik kurul onayı' SDÜ Tıp Fakültesi Etik Kurul Başkanlığından alınmıştır. Ayrıca hastalar ile kontrol bireyleri araştırma hakkında ayrıntılı bilgilendirilmiş ve çalışmayı kabul edenlerden 'bilgilendirme ve onay formu' alınmıştır.

Çalışmaya SDÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Romatoloji kliniğinde tanı almış ve düzenli olarak izlenen AAA hastaları alındı. Hastalar Tell Hashomer kriterlerine göre kesin tanısı ( 2 major veya 1 major ile 2 minör kriter ) olan hastalardı (28).

Çalışmaya AAA tanısı olan 6 atak ve 12 atak dışı (kolşisin tedavisiyle hastalığı kontrol altında olan 6 hasta ile kontrol altında olmayan 6 hasta ) olmak üzere 18 hasta ile 6 sağlıklı kontrol grubu alındı. Atak dışı AAA hastaları kolşisin tedavisini 1-1,5 mg/gün dozunda almaktaydılar ve en son dozu da son 12 saat içinde almış olanlardı. AAA atak olan hastalar ise en az son 10 günde doktordan habersiz ilaçlarını almayan hastalardan oluşuyordu. Hasta gruplarında örnekleme yapıldığı sırada; akut enfeksiyon, diğer enflamatuvar ya da otoimmün hastalığı olan (AAA dışında), sistemik hastalığı olan (HT, DM), malignite, bilinen amiloidoz tanısı ve kronik böbrek yetmezliği, gebelik, sigara-alkol bağımlılığı olanlar dışlandı. Kolşisin dışı antienflamatuvar ve immünsüpresif ilaç alanlar da çalışmaya alınmadı. Kontrol grubu ise tamamen sağlıklı herhangi bir ilaç almayan olan yaş ve cinsiyet açısından uyumlu kişilerden oluşturuldu.

AAA akut atak kararı için kriter olarak; fizik muayene bulguları ile birlikte laboratuvar olarak akut faz reaktanları değerlendirildi. Akut faz reaktanı olarak lökositoz, CRP ve ESH yüksekliği esas alındı. Hastaların aldığı kolşisin ve diğer

tedaviler, sistemik hastalık ve AAA aile öyküsü sorgulandı. Hastalığın bulunma süresi ile kullandıkları kolşisin dozları kaydedildi.

Çalışmaya dahil edilen hastalar 3 gruba ayrıldı ve bir grupta kontrol grubu olarak belirlendi

Grup 1: Tamamen sağlıklı 6 birey ( kontrol grubu)

Grup 2: AAA tanılı ve akut atak ile başvuran 6 hasta (atak grubu)

Grup 3: AAA tanılı, düzenli kolşisin tedavisi alan, son 6 ayda atak geçirmemiş 6 hasta (remisyon grubu)

Grup 4: AAA tanılı, düzenli kolşisin tedavisine rağmen hastalığı kontrol altına alınamamış, son 6 ayda atak geçirmiş 6 hasta (aktif grup)

### **3.2. Metod**

Çalışmaya alınan bireylerden yaklaşık 45 cc venöz kan örneği alındı. Tüm hasta ve kontrol bireylerinde kan örnekleri aynı şartlarda ve aynı kişiler tarafından alındı. Kanlar uygun antikoagülan eklenmiş enjektörlerle alınıp kısa süre içinde çalışılmak üzere laboratuara ulaştırıldı. Daha sonra kanlar nötrofil izolasyonu bölümünde anlatıldığı şekilde santrifüj edilerek hücreler ve serum izole edildi.

#### **3.2.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler**

Çalışmamızda kullanılan malzemeler aşağıda sıralanmıştır.

1. Soğutmalı santrifüj: Kubato (Japonya )
2. Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)
3. Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
4. Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5. Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
6. Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7. Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8. pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

9. Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
10. Florasan spektrofotometre (Carry Eclipsy Marka, Varian Firması, Avusturalya)
11. CO<sub>2</sub> inkubator: Heal force (Japonya )
12. Laminar flow kabini: Javan (Belçika)
13. Sallamak su banyosu: Labart (Japonya )
14. Pipet-Otomatik, (1 adet 0–1000 mikrolitre. 1 adet 0-200 mikrolitre): Fagus (Türkiye)
15. 50 ml lik plastik falcon tüpleri. 1000/pk: Teknik (Türkiye)
16. 15 ml lik falcon tüpleri. 1000/pk: Rota (Türkiye)
17. 1B–103 Borasilicated kapillar tüp, 1000/pk: Fagus (Türkiye)
18. Ultrasantrifüj tüpü (şişmeli), MS–80 markalı santrifüj için, 2 ml. Sorvall-RotarTFT 80.2, 80000 rpm, kapakları ile birlikte: ABC (Türkiye)
19. Ultrasantrifüj tüpü (şişmeli), MS–80 markalı santrifüj için, 35 ml. Sorvall-RotarTFT 80.2, 50000 rpm, kapakları ile: ABC (Türkiye)
20. Hirschmann 0,1-200 ml şarjlı pipet Hirschmann pipettus akku: Fagus (Türkiye)

### 3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler aşağıda sıralanmıştır.

1. Promega Wizard Genomic DNA Proficication Kit A1125 (500 lük): Fagus (Türkiye)
2. N-Methyl-D-Glucamine, 100 gram 66930: Fagus (Türkiye)
3. RPMI–1640 Medium 1x. Lot: 0384S, CAT:FG1215 500 ml: MMS (Türkiye)
4. Tripsin EDTA. Lot: 0248S Cat: L2163 100 ml: MMS (Türkiye)
5. Patricin. Cat: A2812: Fagus (Türkiye)
6. Transfast (Transfection promega- 17.979.701): Fagus (Türkiye)

7. Penicillin-Streptomycin-Gibco Cat No: 15070–063: MMS (Türkiye)
8. DNA izolasyon kiti. Orogen: QI Aprep 8 Minirep kit (10) Cat No: 27142: MMS (Türkiye)
9. Cesium Hydroxide Monohydrate, 50 gram: Fagus (Türkiye)
10. 1.1.2-trichloro–1.1.2-trifluoroethane 100 gr: Fagus (Türkiye)
11. Hank's balanced salts solution. Cot: 02–015-1B Lot:803421: Dateks (Türkiye)
12. Collogenaze Tip 5. C9262-1B, 25 mg: Fagus (Türkiye)
13. Ficoll 400 Type 400 DL. 5 gram. F–8016: Fagus (Türkiye)
14. PE50 Cannula Tubing C313CT: Fagus (Türkiye)
15. Fura-2-AM luvitrogen
16. Gentamisin. Cat:L2163 100 ml Bay-Med (Türkiye)

### 3.2.3.Nötrofil İzolasyonu

50 ml hacimli steril bir şırıngaya, 7 ml ACD solüsyonu (pıhtılaşmayı önleyici) konuldu. İçerisine hasta veya sağlıklı bireyden 35 ml taze venöz kan çekilerek ve bu kan içerisinde 10,5 ml HES (eritrositleri çöktürmeye yarar ) olan 50 ml hacimli iki adet falcon tüplerine eşit miktarda bölünerek hafifçe karıştırıldı. Sonra bu karışım 30 dakika boyunca dik bir şekilde tutuldu. Bu arada iki tane vakumlu biyokimya tüpüne, serum elde etmek amacı ile yaklaşık 5'er ml kan alındı. 15 dakika dik bir şekilde bekletildi. 15 dakika sonunda 3000 rpm de 15 dakika boyunca santrifüj edildi.

Elde edilen serum, steril 15 ml hacimli bir falcon tüpüne konuldu. SER + 1x Phosphate buffer saline (PBS) solüsyonu hazırlandı. (47,5 ml 1xPBS + 2,5 ml SER) 30 dakika sonunda, iki farklı tabaka gözlendi (eritrositler tüpün dibine çökmüş olur) ve yaklaşık 40 ml olan bu üst kısım (süpernatant) alınarak ayrı, steril bir 50 ml hacimli falcon tüpüne konularak 350 g'de 10 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası süpernatant tüpün dibinde az bir miktar kalacak şekilde atıldı ve tüpün dibindeki çökelti (pellet) bu az miktar sıvı ile tekrar çözülmeye çalışıldı. Bir konsantre PBS solüsyonu ile 40 ml hacme kadar tamamlandı ve tekrar 350 g'de santrifüj edildi. Bu işlem yukarıda yazıldığı şekilde bir kez daha tekrarlandı.

Tüpün dip kısmında kalan pelletin içerisinde az miktarda da olsa eritrosit kalmış olabileceği ihtimalinden dolayı pelletin üzerine hızlı bir şekilde 10 ml enjeksiyonluk steril su döküldü ve 30 saniye durmasına müsaade edildi. 30 saniye sonrasında 2 konsantre PBS solüsyonu konuldu (son durum 1 konsantre PBS olmuş olur). Tekrar santrifüj işlemine götürüldü. Santrifüj sonrası kırmızı renkli bir solüsyon ve gri renkli pellet görülmesi beklendi. Bu pellet SER+1xPBS solüsyonu ile sulandırılarak çözüldü, ve santrifüj işlemi basamakları iki kere tekrarlandı. Steril 50 ml hacimli bir falcon tüpüne 15 ml Ficoll konuldu. Santrifüj işleminden çıkan pellet 10 ml SER+1xPBS ile tekrar sulandırıldı. Ve Ficoll solüsyonunun üzerine çok yavaş ilave edildi. 25 ml hacimli bu yeni solüsyonumuz 800 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Ficoll; santrifüj ve yoğunluğu etkisi ile sadece nötrofillerin tüpün dibine çökmesine izin verir.

Santrifüj sonrası supernatant atıldı ve tüpün dibindeki pellet tekrar SER+1xPBS ile sulandırıldı ve santrifüj işlemi basamağı iki kere tekrarlandı. Elde edilebilen hücre miktarına göre 10 ile 15 ml hacim arasında sulandırıldı ve FURA-2 AM flüoresan maddesi ile son konsantrasyon 2 mikrom olacak şekilde 37 C de 45 dakika boyunca sallamalı su banyosunda boyandı. Boyanma işleminden sonra fazla boyaların atılması için hücreler tekrar santrifüj ve yıkanma işlemine tabi tutuldular. Tampon solüsyonu içerisinde etrafı şeffaf plastik küvetlere konularak spektrofloreometredeki yerine yerleştirilerek okunma işlemine geçildi.

Nötrofiller izolasyon miktarlarına bağlı her biri  $10^7$  hücre olacak şekilde kısımlara ayrıldı. Bütün örneklerin PMNL'lerin bir kısmı, oksidatif stresle ilgili değerlerin (GSH, GSH-Px, MDA düzeyleri) ölçülmesi için donduruldu. MDA (Placer ve ark. 1966) (80) analizleri ise spektrofotometrik olarak yapıldı.

Kalan PMNL'ler fMLP ile aktive edilerek, izole edilip, carry eclipse fluorescence spectrophotometer cihazı ile hücre içi serbest kalsiyum  $[Ca^{+2}]_i$  düzey değişimleri ( $\Delta[Ca^{+2}]_i$ ) belirlendi. ( $\Delta[Ca^{+2}]_i$ )değerinin kinetik olarak izlenmesi, PMNL aktivasyonundaki erken etkileşimlerin belirlenmesi açısından önemlidir.

### 3.2.4. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü:

#### 3.2.4.1. GSH ve GSH-Px Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'in bildirdikleri yöntemle göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi (81). GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

%10 triklorikasetik asit (TCA) solüsyonu

Tris tamponu (0,4 M pH:8,9): 48.46 gram tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH 8.9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlandı.

*Deneyin yapılışı:* 0.1 ml kan homejenatı 0.4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 sn karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi, 0.1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0.9 ml distile su, 2.0 ml Tris tamponu ve 0.1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk tarafından bildirilen yöntemle göre spektrofotometrede belirlendi (82). Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

Kullanılan kimyasallar

- 1- Tris HCl tamponu (50 mM) pH:7.6
- 2- GSH ve DTNB solüsyonu
- 3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu
- 4- %10 TCA solüsyonu
- 5- Tris tampon 0.4 M pH: 8.9

**Tablo 4.** GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Doku homejanatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam 10 dakika beklendi		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı		
Üzerine Tris Tampon eklendi	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi	0.1 ml	0.1 ml

#### 3.2.4.2. Lipit Peroksidasyon (LPO) Analizi

LPO düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve ark. bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı (80).

Deneyin yapılışı: Tüm nötrofil grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100 °C' lik kaynar suda, su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1 cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler nanomol/gram protein olarak belirlendi.

### 3.2.5. İntraselüler Kalsiyumun Ölçülmesi:

Hücre içi  $Ca^{+2}$  miktarının ölçümü için nötrofil hücreleri oda ısısında 45 dakika boyunca  $4\mu M$  fura-2 AM flüoresan boyası ile boyandı. (87). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücre manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu  $2 \times 10^6$  olacak şekilde  $Na^+$ -HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7;  $CaCl_2$ , 1,2;  $MgCl_2$ , 1.1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7.4)] solusyonu içerisinde florasan spektrofotometrede (Varian Cary Eclipse, Australia ) haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, 505 nm emisyon dalga boylarında flüoresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  iyon düzeyi  $[Ca^{+2}]_i$  değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi ve Grynkiewicz ve ark.'nın metoduna göre hesaplandı (75).

### 3.2.6. Biyokimyasal Analizler

Tam kan düzeyleri, Bekman Coulter LH 70 analyser cihazında flowsitometri yöntemi ile çalışıldı. ESH, Tehermane cihazında Westergren yöntemi ile bakıldı. CRP değerleri Delta Seac Radım aleti ile nefelometrik yöntem ile bakıldı.

### 3.3. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama  $\pm$  standart sapma [mean  $\pm$  standard deviation (SD)] olarak verildi. Nötrofil hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS for Windows 15.0 paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Gruplar arası fark olup olmadığı Mann-Whitney U testi istatistiksel analizi ile değerlendirildi. Tüm istatistikî karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  den küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

Hastalarda bakılan akut faz reaktanları ve diğer laboratuvar testlerinin gruplar arasındaki farklılığı değerlendirmek için Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi önemli farklılaşma gösterirse, hangi grubun diğerinden farklı olduğu Mann-Whitney U testi ile araştırıldı. Anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  kabul edildi.



## 4.BULGULAR

### 4.1. Genel Bulgular

Çalışmaya 18 AAA hastası ile 6 sağlıklı birey alındı. AAA hastaları atak durumları ve kolşisin tedavileri ile ilişkili olarak 6'şar kişilik 3 gruptan oluşturuldu. Bunlardan 6 tanesi atak dönemindeki hastalar olup 2'si (% 33,3) erkek ve 4'ü (%66,6) kadındı (grup 2). Yaş ortalaması  $28,6 \pm 11,8$  yıl şeklindeydi. Grup 3'de ise kolşisin tedavisiyle hastalığı kontrol altına alınmış, yani son 6 ayda atak geçirmemiş 4'ü (%66,6) erkek ile 2'si (%33,3) kadın 6 remisyon hastası vardı. Bu grubun yaş ortalaması  $31,5 \pm 9,7$  yıl şeklindeydi. Grup 4'te ise kolşisin tedavisiyle hastalığı kontrol altına alınamamış yani son altı ay içinde en az bir kez atak geçirmiş olan 4'ü (%66,6) erkek ile 2'si (%33,3) kadın 6 aktif seyirli hasta vardı. Bu grupta yaş ortalaması  $30,3 \pm 13,3$  yıl şeklindeydi. Kontrol grubunda ise (Grup 1) tamamen sağlıklı olan 4 (%66,6) erkek ile 2 (%33,3) kadın hasta vardı. Yaş ortalaması  $29 \pm 4$  yıl şeklindeydi.

Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalamaları  $\pm$  standart deviasyon (SD) değerleri Tablo 5'de görüldüğü gibi olup gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

**Tablo 5:** Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı

	Kontrol (Grup 1) n: 6	AAA Atak (Grup 2) n: 6	AAA Remisyon (Grup 3) n: 6	AAA Aktif (Grup 4) n: 6	P
Yaş Ortalaması Ort. $\pm$ SD (yıl)	$29 \pm 4$	$28,6 \pm 11,8$	$31,5 \pm 9,7$	$30,3 \pm 13,3$	$p > 0.05$
Cinsiyet (Erkek/kadın) %	4/2 (% 66,6-33,3)	2/4 (% 33,3-66,6)	4/2 (% 66,6-33,3)	4/2 (% 66,6-33,3)	$p > 0.05$

AAA atağı ile gelen 6 hastanın 2'sinde (%33,3) karın ağrısı, 2'sinde (%33,3) karın ağrısı + ateş, 1'inde (%16,6) karın ağrısı + plöritik göğüs ağrısı, 1'inde (%16,6) plöritik göğüs ağrısı + ateş vardı.

Hastaların tümünde ek bir hastalık yoktu. Hastalar 1-1,5 mg/gün arasında kolşisin almaktaydı. Kontrol grubunda kolşisin ve ek ilaç kullanımı yoktu. Atak hastalarında hastalar doktordan habersiz tedavilerini en az 10 gündür almayan hastalardan oluşturulmuştu ve bu hastalar pür AAA atak olan hastalardı. Hastalık süreleri ve aldığı kolşisin dozları ortalama  $\pm$  SD şeklinde Tablo 6'da görülmektedir. Hastaların aldığı tedavi dozları açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu.

**Tablo 6.** AAA hasta gruplarının hastalık süresi ve kolşisin dozları

Grup		Sayı	En Az	En Çok	Ortalama	S.D
AAA Atak (Grup 2)	Hastalık süresi (yıl)	6	1	20	8,5	7,5
	Tedavi (mg/gün)	6	1	1,5	1,3	0,5
AAA Remisyon (Grup 3)	Hastalık süresi (yıl)	6	1	26	10	8,6
	Tedavi (mg/gün)	6	1	1,5	1.25	0,5
AAA Aktif (Grup 4)	Hastalık süresi (yıl)	6	1	15	8,6	5,7
	Tedavi (mg/gün)	6	1,5	1,5	1,5	0

Çalışmaya alınan hastaların laboratuvar değerlerinin gruplara göre dağılımları ortalama  $\pm$  SD ile Tablo 7'de görülmektedir.

**Tablo 7.** Çalışmaya alınan bireylerin laboratuvar verileri

Grup	Parametre	Sayı	En Düşük	En Yüksek	Ortalama	SD
Kontrol grubu (Grup 1)	ESH	6	2	12	7,1	3,9
	CRP	6	2	4	2,6	0,8
	Lökosit	6	5600	10900	7933,3	1816,2
	Nötrofil	6	2200	5100	4066,6	1180,9
AAA Atak (Grup 2)	ESH	6	4	100	<b>39,1</b>	33,5
	CRP	6	10	158	<b>106,3</b>	51,9
	Lökosit	6	7700	16400	<b>11400</b>	3124
	Nötrofil	6	5000	11000	<b>8450</b>	2391,4
AAA Remisyon (Grup 3)	ESH	6	1	49	17,3	17,9
	CRP	6	2	25	7,1	8,8
	Lökosit	6	5600	11500	7966,6	2287,9
	Nötrofil	6	2900	8000	5050	2162,1
AAA Aktif (Grup 4)	ESH	6	3	14	7	4,2
	CRP	6	3	9	5,1	2
	Lökosit	6	6800	11800	8900	2141,9
	Nötrofil	6	3600	7400	5200	1533,6

**CRP:** C- Reaktif protein

**ESH:** Eritrosit Sedimentasyon Hızı

Gruplar arasında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunanlar aşağıda belirtilmiştir.

**CRP**

1-2  $\rightarrow$  p=0.002

1-4  $\rightarrow$  p=0.009

2-3  $\rightarrow$  p=0.004

2-4  $\rightarrow$  p=0.002

**NÖTROFİL**

2-1  $\rightarrow$  p=0.004

2-3  $\rightarrow$  p=0.041

2-4  $\rightarrow$  p=0.026

CRP değeri atak grubunda ve aktif olan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ( $p=0.002$  ve  $p=0.009$ ). Aynı zamanda atak grubunda remisyon ve aktif olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ( $p=0.004$  ve  $p=0.002$ ). Nötrofil sayıları atak grubunda hem kontrol grubuna göre ( $p=0.004$ ) hem de remisyon ( $p=0.041$ ) ve aktif olan ( $p=0.026$ ) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Diğer değerler gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi.

#### **4.1. Oksidatif Stres Bulguları**

Hasta ve kontrol grubundan izole edilen nötrofillerde ve serum örneklerinde oksidatif stres belirteci olarak; LPO göstergesi olan MDA ve antioksidanlardan GSH ile GSH-Px düzeyleri çalışıldı. Çalışılan oksidatif stres parametrelerine bakıldığında; hasta gruplarındaki serum ve nötrofillerde MDA değerinin yüksek olması ile GSH ile GSH-Px değerlerinin düşük olması oksidatif stres açısından anlamlı olarak kabul edildi.

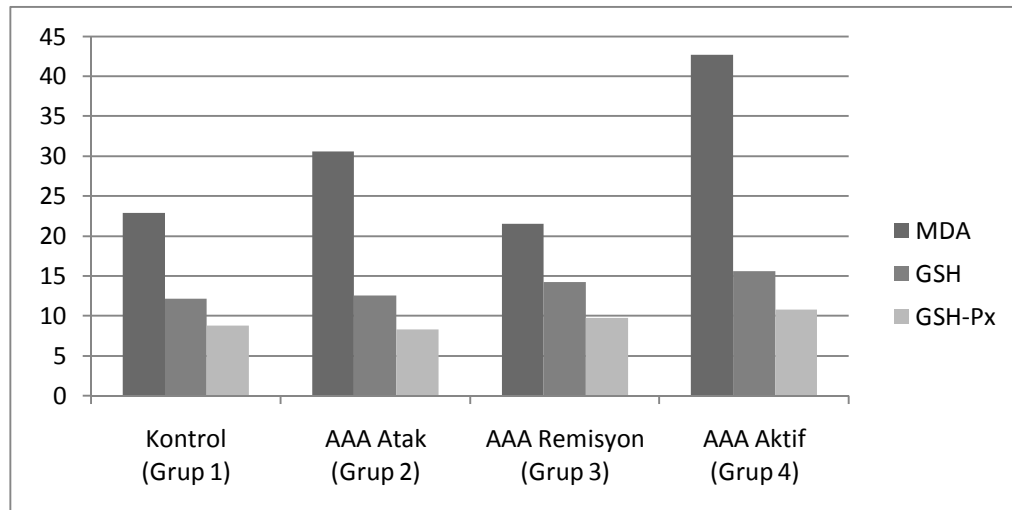
Hastalardan izole edilen nötrofillerde MDA düzeyleri AAA atak grubunda hem kontrol grubuna göre ( $p<0.05$ ) hem de kolşisin alan ve remisyonda olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı ( $p<0.05$ ). Kolşisinle remisyon sağlanamayan aktif gruptakilerde ise hem kontrollere göre ( $p<0.05$ ), hem kolşisinle remisyon sağlanan remisyon grubundakilere göre ( $p<0.05$ ), hem de AAA atak grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı ( $p < 0.01$ ).

Antioksidan seviyesi göstergesi olarak çalışılan GSH ile GSH-Px düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 8).

**Tablo 8.** Nötrofillerde MDA, GSH, GSH-Px düzeyleri (ort ± SD)

Değerler		MDA (nMol/gr protein)	GSH (nMol/gr protein)	GSH-Px (IU/gr protein)
Kontrol	(Grup 1)	22.88 ± 3.85	12.15 ± 0.65	8.76 ± 1.50
AAA Atak	(Grup 2)	30.59 ± 5.95	12.54 ± 0.99	8.30 ± 1.04
AAA Remisyon	(Grup 3)	21.55 ± 4.61	14.22 ± 1.39	9.75 ± 1.33
AAA Aktif	(Grup 4)	42.72 ± 3.66	15.62 ± 0.90	10.82 ± 0.74
Grup 2-Grup 1		<b>p&lt;0.05</b>	p>0.05	p>0.05
Grup 2-Grup 3		<b>p&lt;0.05</b>	p>0.05	p>0.05
Grup 4-Grup 1		<b>p&lt;0.01</b>	p>0.05	p>0.05
Grup 4-Grup 2		<b>p&lt;0.01</b>	p>0.05	p>0.05
Grup 4-Grup 3		<b>p&lt;0.01</b>	p>0.05	p>0.05

Şekil 6'de nötrofillerde çalışılan oksidatif stres göstergeleri grafik olarak görülmektedir.



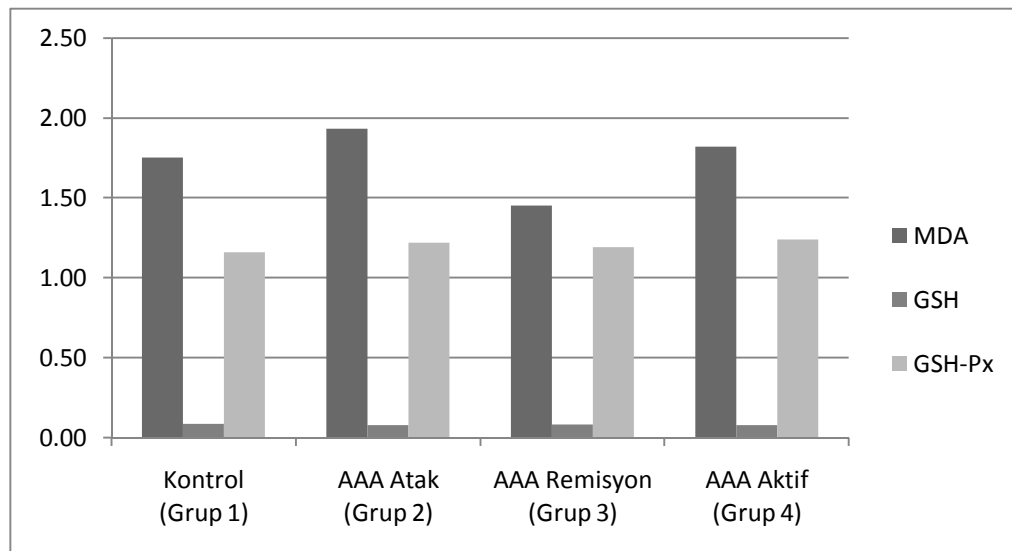
**Şekil 6:** Nötrofillerde oksidatif stres bulguları (MDA ve GSH için nMol/gr protein GSH-Px için IU/gr protein)

Hasta ve kontrol gruplarının serumlarında çalışılan MDA düzeyleri; AAA atak grubunda hem kontrol grubuna göre ( $p<0.05$ ), hem de kolşisin tedavisi alıp remisyonda olan gruba göre anlamlı yüksek saptandı ( $p<0.05$ ). AAA aktif grupta olanlarda kolşisin tedavisiyle remisyonda olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı ( $p<0.05$ ). GSH ile GSH-Px düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ( $p>0.05$ ) (Tablo 9).

**Tablo 9.** Serumda MDA, GSH, GSH-Px düzeyleri (ort  $\pm$  SD)

Değerler		MDA (nMol/gr protein)	GSH (nMol/gr protein)	GSH-Px (IU/gr protein)
Kontrol	(Grup 1)	1.75 $\pm$ 0.16	0.083 $\pm$ 0.004	1.16 $\pm$ 1.15
AAA Atak	(Grup 2)	1.93 $\pm$ 0.12	0.076 $\pm$ 0.007	1.22 $\pm$ 0.17
AAA Remisyon	(Grup 3)	1.45 $\pm$ 0.10	0.080 $\pm$ 0.005	1.19 $\pm$ 0.16
AAA Aktif	(Grup 4)	1.82 $\pm$ 0.12	0.078 $\pm$ 0.004	1.24 $\pm$ 0.12
Grup 2-Grup 1		<b>p&lt;0.05</b>	p>0.05	p>0.05
Grup 2-Grup 3		<b>p&lt;0.05</b>	p>0.05	p>0.05
Grup 4-Grup 3		<b>p&lt;0.05</b>	p>0.05	p>0.05

Şekil 7’de serumdaki oksidatif stres göstergeleri grafik olarak görülmektedir.



**Şekil 7:** Serumda oksidatif stres bulguları (MDA ve GSH için nMol/gr protein GSH-Px için IU/gr protein)

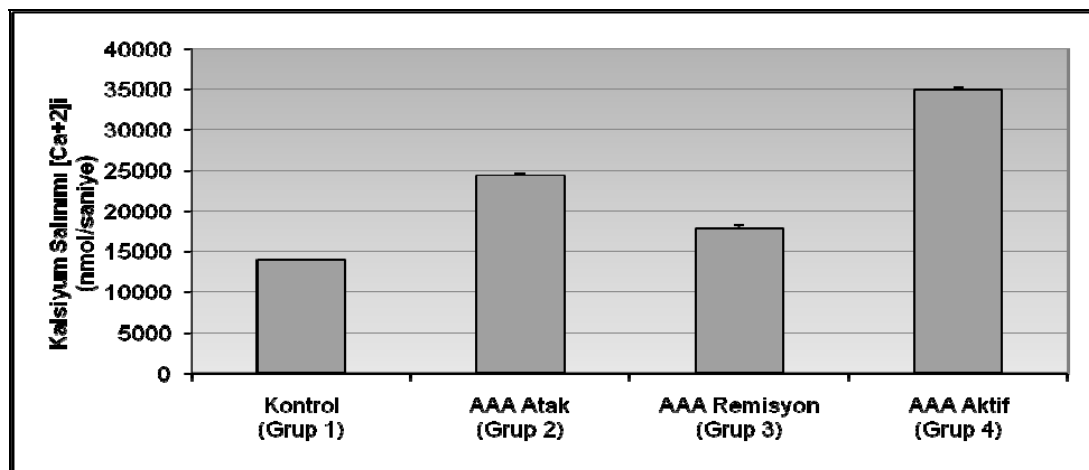
### 4.3. Kalsiyum Sinyali Bulguları

Nötrofillerde sitozole  $Ca^{+2}$  giriş değerleri AAA atak grubunda hem kontrol grubuna göre ( $p<0.05$ ) hem de remisyonda olan gruba göre anlamlı yüksek saptandı ( $p<0.05$ ). Kolşisinle remisyon sağlanamayan aktif gruptakilerde ise hem kontrollere göre, hem akut atak grubuna göre hem de remisyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı ( $p<0.01$ ) (Tablo 10).

**Tablo 10.** Sitozole  $Ca^{+2}$  salınımının tüm gruplardaki düzeyleri

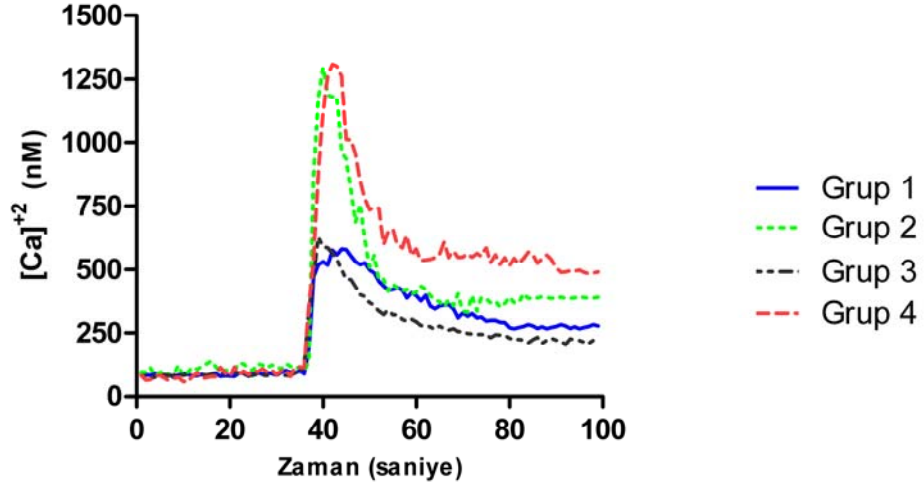
Değerler	[ $Ca^{+2}$ ]i nmol/saniye
Kontrol (Grup 1)	13962,49 ± 110,59
AAA Atak (Grup 2)	24487,53 ± 253,91
AAA Remisyon (Grup 3)	17986,55 ± 300,12
AAA Aktif (Grup 4)	34977,86 ± 241,04
Grup 2-Grup 1	<b>p&lt;0.05</b>
Grup 2-Grup 3	<b>p&lt;0.05</b>
Grup 4-Grup 1	<b>p&lt;0.01</b>
Grup 4-Grup 2	<b>p&lt;0.01</b>
Grup 4-Grup 3	<b>p&lt;0.01</b>

Şekil 8’de sitozole  $Ca^{+2}$  salınımı grafik olarak görülmektedir.



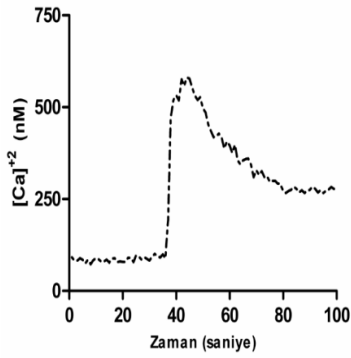
**Şekil 8.** Sitozole  $Ca^{+2}$  salınımının tüm gruplardaki düzeyleri

Hücre içine  $Ca^{+2}$  girişinin zamana karşı tüm grupların karşılaştırmalı ve gruplara spesifik tablo şeklinde çizimi şekil 9 ve 10'da gösterilmiştir.

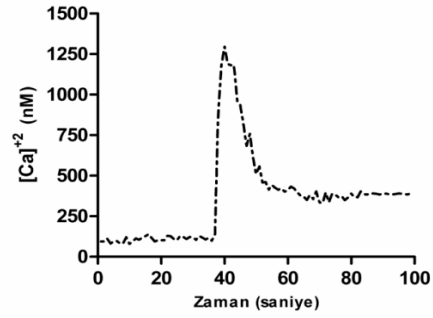


Şekil 9. Sitozole  $Ca^{+2}$  salınımının tüm gruplardaki zaman akım grafiği

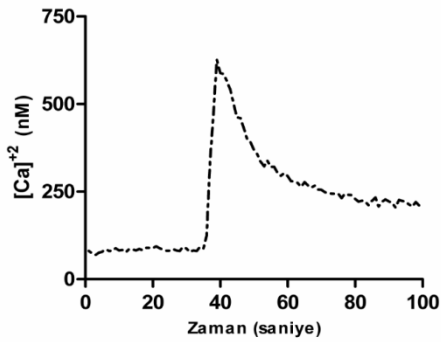
Kontrol (Grup 1)



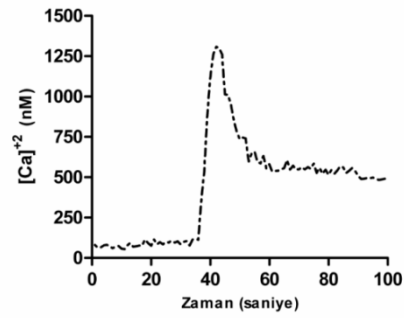
AAA Atak (Grup 2)



AAA Remisyon (Grup 3)



AAA Aktif (Grup 4)



Şekil 10. Sitozole  $Ca^{+2}$  salınımının gruplara spesifik zaman akım grafikleri



## 5.TARTIŞMA

AAA tekrarlayıcı, otozomal resesif geçişli bir otoinflamatuvar hastalık olup, karın, göğüs ve eklem ağrılarına ateşin eşlik ettiği, akut atak şeklindeki çeşitli serözit formlarıyla karakterizedir. En fazla Yahudiler, Ermeniler, Türkler, Araplar'dan oluşan dört etnik grubu etkiler. Evrensel değil, etnik kökene dayalı bir hastalıktır. Daha çok çocukluk yaşında ortaya çıkmakla birlikte ileri yaşlarda da görülebilir (9).

Hastalığın patogeneğinde MEFV genindeki mutasyon temel nedendir. MEFV geni, pyrin/marenostin isimli proteinin üretilmesinde etkili olan gendir. Bu proteinin eksternal patojenlere ve zararlı ajanlara karşı organizmanın savunmasında immün sistem üzerinde düzenleyici bir etkisi vardır (83). Bu proteinin eksikliğinde enflamasyonun baskılanamaması ve seröz zarlara olan nötrofil hareketiyle birlikte enflamasyon ve buna bağlı olarak da klinik bulgular gelişmektedir. Hastalarda ataklar esnasında belirgin nötrofili ile birlikte nötrofillerin kemotaktik aktivitesinde ileri derecede artış saptanmıştır. Tutulmuş olan dokularda belirgin nötrofil hakimiyeti mevcuttur (16). Hastalığın özellikle aktif döneminde belirgin olan nötrofil hiperaktivasyonunun nedeni kesin olarak bilinmemektedir. Bununla beraber AAA'de nötrofillerin fonksiyonlarını araştıran çalışmalar yapılagelmiştir.

Çalışmalar özellikle özellikle nötrofillerin kemotaktik aktiviteleri üzerine yoğunlaştırılmıştır. Bir çalışmada nötrofil kemotaksisi, AAA tanısı olan ve atak sırasında olanlar ile kendiliğinden ya da kolşisin tedavisi altında remisyonda olan toplam 35 hastada araştırılmıştır. Nötrofil kemotaksisinin atak dışı dönemdeki tedavisiz hastalarda değişmediği, atak sırasında %50 arttığı ve kolşisin tedavisi altında % 50 azaldığı gözlenmiştir (84). Bu çalışmadaki bulgular hastalığın özellikle akut atak dönemindeki nötrofillerin fonksiyonlarındaki artışı yansıtması açısından önemlidir.

Oksidatif stres, enflamatuvar birçok hastalığın patogeneğinde rol almaktadır. AAA kronik inflamatuvar bir hastalık olması nedeniyle, bu hastalarda nötrofillerin aktivasyonunu yansıtmak üzere oksidatif stres ile ilgili bazı değişikliklerin olması beklenebilir. Gerçekten de bu hasta grubunda yapılmış az sayıdaki çalışmada oksidatif stres ile ilgili anormalliklerin olduğu gösterilmiştir (85). AAA hastalarında

hem remisyon grubunda hem de atak döneminde oksidatif stres göstergelerinde artışı gösteren deliller giderek artmaktadır. Sarkisian ve ark. yaptıkları bir çalışmada AAA hastalarında nötrofillerde süperoksid radikal üretimini kontrol grubuna göre belirgin olarak daha yüksek düzeylerde saptamışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında aktif nötrofillerde artmış olan araşidonik asit metabolizmasının ve artmış  $O_2$  salınımının oksidatif stres ürünlerinde artışla sonuçlandığını belirtmişlerdir. Bu artmış oksidatif stresin AAA'deki semptomların nedeni olup olmadığı bilinmemektedir (86).

Biz de bu çalışmamızda hastalığın patogeneğinde önemli rolü alan nötrofil aktivasyonunda oksidatif stres ve  $Ca^{+2}$  sinyalinin rolünü araştırdık. Nötrofil aktivasyonunun arttığı durumlarda artmış oksidatif stres ile birlikte hücre içine  $Ca^{+2}$  girişinin de artabileceği beklenmekte, bu durumun da pozitif feed-back etki ile süreci ağırlaştırabileceği düşünülmektedir (87).

Çalışmamızda oksidatif stres göstergesi olarak çalıştığımız MDA düzeyini özellikle nötrofiller içerisinde akut atak döneminde ve kolşisine rağmen aktif devam eden grupta kontrol grubu ve remisyon sağlanan gruba göre yüksek olarak saptadık. Serumda bakılan MDA değerleri de akut atak döneminde remisyon ve sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek iken ilginç olarak aktif devam eden grupta sadece remisyon grubuna göre anlamlı yüksek idi. Akut atak ile başvuran grupta yüksek MDA değerleri gözlemlendi. Bu hastalarda nötrofil fonksiyonunda artışı yansıtabilecek şekilde özellikle nötrofil içi oksidatif stres göstergesi artarken kolşisinin bu parametreler üzerinde baskılayıcı etkisi olduğunu gözlemledik.

Oksidatif stres; organizmada oksidan maddelerin artması ve antioksidan maddelerin azalması ile meydana gelmektedir. Atomun yapısını oluşturan elektronlar; orbita adı verilen yörüngede çiftler halinde bulunurlar. Eksik elektronlu bu moleküller karşılaştıkları herhangi bir molekül ile aşırı şekilde reaksiyona girmeye eğilimli olup diğer moleküllerle elektron alışverişinde bulunurlar. İşte diğer moleküllerle kolayca elektron alışverişi yaparak onların yapısını bozan bu moleküllere radikal, serbest radikal veya oksidan moleküller denilmektedir (67, 68).

İnsan vücudunda karbonhidratların, protein ve yağların mitokondride değerlendirilmeleri ve fagositoz gibi fizyolojik olaylar ve iskemi, hemoraji, travma ve radyoaktivite gibi patolojik olaylar sırasında ROT ismi verilen ürünler meydana

gelmektedir. Bunların başlıcaları; superoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit radikali ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikalidir ( $OH^-$ ). Bu ürünler özellikle doymamış yağ asitlerinin yapılarını bozmaktadırlar (76). Bu radikallerin zararlı etkilerinin dolaylı yoldan hücre düzeyinde belirlenmesinde kullanılan yöntem; MDA esasına bağlı LPO düzeyi tayinidir. Bunların vücuttaki zararlı etkilerinin önlenilmesinde antioksidanlar rol oynamaktadır. Çalışmamızda da akut atakla başvuran hastalarda ve aktif seyreden hastalarda nötrofil içi ve serum MDA düzeylerinin yüksekliği AAA hastalarında nötrofil aktivasyonunda oksidatif stresin rolünü düşündürmektedir.

MDA lipid, protein ve karbonhidratların oksidasyonunu dolaylı yoldan göstermektedir. Nötrofillerde lipid, karbonhidrat ve yağlar plazmaya kıyasla daha yüksek oranda bulunmasından dolayı nötrofil içi yüksek düzeyde lipid peroksidasyonu meydana gelmiş olabilir. Bu sonucumuz plazmadan ziyade kan hücrelerinde oksidatif stres belirteçlerinin hastaların durumunu değerlendirmede kullanılmasını tavsiye eden araştırma sonuçları ile uyumludur

Oksidatif stres artışı ile birlikte fosfolipaz A2, D ve C'yi de içeren birçok enzimin aktivitesi de artmaktadır. Tirozin kinaz dahil protein kinazları mitojen aktive edici kinazları ve protein kinaz C'yi aktive eder. Oksidanlar daha sonra tirozin fosfatazları inaktifleştirerek tirozin fosforilasyonunu etkilerler (88).

Çalışmamız atak grubu ile birlikte kolşisine cevap verdiğini düşündüğümüz grupla tedavi altında atakları devam eden hastalardan oluşturuldu. Bu gruplar sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldı. AAA hastalığında günümüzde en yaygın kullanılan ve en etkin tedavi kolşisindir. Kolşisin nötrofillerin motilitesini inhibe etmektedir. Özellikle nötrofil kemotaksisini ve doku içine infiltrasyonlarını etkiler. Kolşisinin bir etki mekanizması da tirozin fosforilasyonunun ve bu suretle nötrofil içi superoksit anyon üretiminin inhibe edilmesidir. Kolşisinin tirozin fosforilasyonunu ve superoksit üretimini azaltarak antioksidan etki gösterdiği düşünülmektedir (89). Çalışmamızdaki kolşisin ile remisyondaki hastalarımızda azalmış oksidatif stres gösterge düzeyleri de bu bulguyu desteklemektedir.

AAA'de tüm bireylerde kolşisin tedavisine cevap aynı düzeyde olmamaktadır. Bir çalışmada 1-3/gün mg arasında kolşisin alan hastalar 15 yıl boyunca takip edilmiş. Hastaların %72'sinde iyi yanıt (altı ayda birden az atak), %15 hastada parsiyel cevap (3 ayda birden az atak), %13 hastada ise tedavi başarısız

olarak bulunmuştur (90). Kolşisin tedavisine cevap alınamayan hastaların özellikleri de çalışmalarda araştırılmıştır. Kolşisin tedavisine cevaplı 59 hasta ile cevap vermeyen 51 hasta incelenmiştir. Cevap vermeyen grupta olan hastalar sosyoekonomik ve eğitim seviyesi daha düşük olan hastalardan oluşmaktaymış. Aynı zamanda bu hastalar daha ciddi klinik seyri olan hastalarmış. Kolşisin için farklı cevaplara diğer bir açıklama da; kolşisinin nötrofil içerisinde konsantre olma oranlarının farklılığından dolayıdır. Otörler bunun genetik farklılığa bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Kolşisinin sindirim sisteminden emilimindeki farklılıklar da etki mekanizma farklılığından sorumlu tutulmuştur. Sonuç olarak nötrofillerdeki kolşisin konsantrasyonu plazma seviyesi değişiklikleri ile ilişkili olarak bildirilmiştir (91, 92). Kolşisinin maksimum seviyesine oral alımdan 2 saat sonra ulaşmakta olup, yarı ömrü 4 saattir. Ancak alındıktan 10 gün sonrasına kadar lökositlerde tespit edilebilmektedir (93). Kolşisin tedavisi kesildiği takdirde 24 saat ile birkaç gün arasında atak meydana gelir (94).

Çalışmamızda atak grubundaki hastalar tedaviden en az 10 gün öncesinde tedavilerini kesmiş olan hastalardan seçilmişti. Sadece AAA tanısı olan ve tedavisiz hasta bulmanın güç olabilmesi nedeniyle bu hastaların tedavi almayan, sadece AAA kliniğini yansıtan hastalar olarak değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz. Bu grup hastalarımızdaki çalışma sonuçlarımız sadece AAA atak hastalarındaki (tedavisiz) bulgularımızı yansıtmaktadır.

Kolşisin alan, remisyona sağlandığı ve sağlanamadığı 3. ve 4. gruptaki hastalar ise kan alınmadan önce en son 12 saat içinde kolşisin dozlarını almışlardı. Bu durum da serum ve nötrofillerdeki kolşisin düzeyini yansıtabilecektir. Ancak kolşisin alan bu iki gruptan bir grupta remisyona sağlanırken, diğer bir grupta sağlanamaması da kolşisinin bu farklı cevabında oksidatif stres ve  $Ca^{+2}$  sinyaline etkisinin incelenmesi açısından önemlidir. Remisyona sağlanamayan aktif hasta grubunda oksidatif stres göstergesi olan MDA düzeyinde yükseklik olması ve buna paralel olarak sitozole  $Ca^{+2}$  girişinin fazlaca olması nötrofil aktivasyonunun patogenezinde bu mekanizmaların rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

Hastaların kolşisinle remisyona girdiklerinde oksidatif stres göstergelerinin hem nötrofil hem de serumda azaldığı görülmektedir. Kolşisin ile remisyondaki hastalarda özellikle nötrofillerde intraselüler olarak oksidatif stresin daha çok

baskılanması ilacın özellikle nötrofillerde yüksek konsantrasyonlara ulaşabildiğini ve oksidatif stres ile birlikte  $Ca^{+2}$  sinyalini baskılayabildiğini göstermektedir. Bu bulgular kolşisinin nötrofiller üzerinde diğer etki mekanizmalarına ek olarak bu mekanizmalar üzerinde de etki yapabildiğini düşündürmektedir. Literatürde aktif AAA etyopatogenezinde oksidatif değişiklikler ile ilgili sınırlı sayıda çalışma varken,  $Ca^{+2}$  sinyali ve bu yollar üzerine kolşisinin etkisi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Gürbüz ve ark. yaptıkları çalışmada; tedavilerine ara verilmiş proteinürisi olan ve proteinürisi olmayan AAA hastalarında GSH-Px, SOD ve MDA düzeylerini incelemiş ve aktif AAA hastalarında bizim çalışmamıza benzer şekilde serum MDA seviyelerinin yükseldiğini, GSH-Px seviyelerinin azaldığını, SOD düzeylerinin ise değişmediğini göstermişlerdir (95). Bu çalışmaların sonucunda daha ileri araştırmalarla aktif AAA etyopatogenezinde oksidan/antioksidan ilişkili mekanizmaların ve AAA hastalarında antioksidan ajanların etkilerinin araştırılması önerilmiştir. Bizim çalışmamızda Gürbüz ve ark.'nın tersine bakılan antioksidanlardan GSH ve GSH-Px grupları arasında belirgin farklılık gösterilemedi. GSH ve GSH-Px'in antioksidasyonda eritrositlerde daha etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca reaktif oksijen türlerinin inhibe edilmesinde enzimatik antioksidanlar kadar enzimatik olmayan antioksidanlarda rol oynamaktadır. Ayrıca çalışmalarda kullanılan antioksidan düzeylerinde aynı oranda azalma olmamaktadır. Bu nedenle diğer antioksidan parametrelerin kullanılması ile belki de bu azalmış düzeylere rastlanılabilecektir.

Hem akut atak, hem de atak halinde olmayan ancak son 6 ayda en az bir kez atak geçirmiş aktif hastalarda oksidatif stres göstergesi olan MDA yüksekliği olması dikkate değer bir bulguydu. AAA'de sürekli enflamasyon olduğuna dair veriler olsa da hastalar ataklar arasında genelde iyidirler. Son dönemde yapılan çalışmalarda AAA hastalarında akut faz reaktanlarının sadece atakta değil, ataksız dönemde ve asemptomatik AAA taşıyıcılarında da yükseldiği gösterilmiştir. Bu veri AAA hastalarında subklinik bir enflamasyonun sürdüğü yorumunu gündeme getirmiştir (96, 97). Çalışmamızdaki atak halinde olmayıp aktif olduğu düşünülen hastalardaki artmış oksidatif stres belirteçleri devam eden enflamasyonla ilişkili olabilir. Ayrıca tedavi ile tam olarak kontrol altına alınamayan ve ara ara atak yaşayan hastalarda bu

enflamasyonun daha belirgin olması da bu bulgumuza bir açıklama olabilir. Sürekli enflamasyon da artmış oksidatif stres ve hücre hasarının sonucu olabilir. Ataklarla birlikte aktif haldeki nötrofillerce sürekli oksidatif stresin uyarılması serbest radikal ve ROT oluşumunu tetikler ve sonuçta DNA hasarı karşımıza çıkabilir (98). Gerçekten de Kirkali ve ark. AAA'de subklinik fakat sürekli enflamasyonun varlığını ve biriken oksidatif ürünlerin oksidatif DNA hasarına yol açabileceklerini göstermişlerdir (85). Bizim çalışmamız da sürekli nötrofil aktivasyonunun fazla miktarda serbest radikal oluşumu ile gidebileceğini göstermektedir. Çalışmamızda MDA değerlerinin akut atak ve aktif AAA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptanması hastalığın aktivasyonunda ve remisyonda elde edilememesinde oksidatif stresin rolünü düşündürmektedir

Yapılan başka bir çalışmada eritrosit membran fosfolipitlerinde oksidatif stres bulguları 42 atak ve remisyonda hastası ile 21 sağlıklı kişide karşılaştırılmıştır. Oksidan olarak TBA ve antioksidan olarak  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini) bakılmış. AAA hastalarında sağlıklı kişilere göre oksidatif stres göstergesi olan TBA seviyesi anlamlı yüksek, antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ise anlamlı düşük saptanmıştır. AAA hastaları arasında, atak halinde olanlarda bu değerlerde remisyondakilere göre daha belirgin farklılık olduğu saptanmıştır. Hastalıkta ve aktivasyonda artmış LPO'na işaret edilmiş olup, tedavide antioksidan olarak  $\alpha$ -tokoferol kullanımını yararlı olabileceği ileri sürülmüştür (99).

Fakültemizden Sütçü ve ark.'nın yaptığı ve bildiri olarak sunulan bir çalışmada ise atak dışı dönemdeki AAA hastaları ile sağlıklı bireyler arasındaki oksidatif stres bulguları olarak, eritrosit GSH-Px, SOD, KAT ve MDA seviyeleri bakılmış. Bütün hastalar 0,5–1,5/ mg gün arasında kolşisin almaktaymış. Eritrosit MDA ve SOD aktivitesi atak dışı hastalarda bile sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş. Eritrosit GSH-Px ve KAT aktivitesi AAA hastalarından sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düşük saptanmış. Bu çalışmada aynı zamanda AAA hastalarındaki oksidatif stres mutasyon ilişkisi bakılmış ve aralarında ilişki olmadığı gözlenmiştir (100). Bizim çalışmamızda ise remisyonda olan ve atak dışı kabul ettiğimiz hastalarımızda ise MDA düzeyleri farklılık göstermiyordu. Ayrıca nötrofillerde ve serumda bakılan antioksidan savunma

göstergeleri olan GSH ve GSH-Px değerleri açısından da AAA hastaları ile sağlıklı popülasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterilemedi.

Oksidatif stres birçok kompleks ve birbiriyle ilişkili sinyal mekanizmalarının aktivasyonu ile sonuçlanır. Artmış oksidatif stres ile birlikte çalışmamızda da olduğu gibi hücre içi  $Ca^{+2}$  sinyallerinde de artış olabilmektedir. Oksidatif stres hücredeki çekirdekte ADP-riboz (ADPR) üretimini 3 yolla artırmaktadır ADPR üretimi G proteine bağlı reseptörlere ligand kanal aktivasyonu ile başlatılır. Reseptör aktivasyonu aynı zamanda intraselüler  $Ca^{+2}$  yoğunluğunun yükselmesi IP3 tarafından hücre içi organellerden  $Ca^{+2}$  serbest bırakılmasını sağlar. Voltaja duyarlı  $Ca^{+2}$  ve transient reseptör potansiyel melastatin 2 (TRPM2) kanalları hücreye doğru güçlenen TRPM2 aktivasyonu ile bir pozitif feed back ile  $Ca^{+2}$  girişi sağlar. Alternatif kaynaklar ADPR içeren mitokondri ve çekirdektir. ADPR polimerlerinin stimülasyon sonrası poli (ADPR) polimeraz-1 (PARP-1)'e ve sonrasında poly (ADPR) glikohidrolaz (PARG) tarafından ADPR'ye hidroliz edilir Bu olay hücreyi apoptozise gidinceye kadar uyarabilir (87).

Sitozole  $Ca^{+2}$  artışı mitokondride depolarizasyon ve porların açılması veya hücre dışından sitozole  $H_2O_2$ 'lerin gelişi ile daha fazla ROT üretilir. ADPR ve ROT geri bildirim mekanizması ile voltaja duyarlı  $Ca^{+2}$  kanalları ile TRPM2 kanallarının açılması yolu ile sitozole  $Ca^{+2}$  akışını artırır (101).

Çalışmamızda nötrofil fonksiyonları açısından incelediğimiz diğer parametre sitozole  $Ca^{+}$  girişiydi. Sitozole  $Ca^{+}$  giriş değerleri atak grubunda kontrol ve remisyon grubuna göre anlamlı yüksek saptandı. Bu bulgu aktif nötrofillerde  $Ca^{+2}$  sinyalinin de artmış oksidatif stres ile birlikte arttığını düşündürmektedir. Kolşisinle remisyon sağlanamayan aktif hasta grubumuzda ise hem kontrollere göre, hem remisyon grubuna, hem de akut atak grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı. Remisyona giren grupta nötrofillerde sitozole  $Ca^{+2}$  girişininin baskılanması, aktif grupta ise baskılanamaması kolşisine cevapta bu mekanizmanın da kullanılmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum aktif seyreden, enflamasyonun ve oksidatif hasarın devam ettiği AAA hastalarında kolşisine cevapsızlığı da açıklayabilir. Bu da nötrofil aktivasyonunun devam ettiğini, tedavi biçiminin ve dozajının yetersiz olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda gözlenen AAA hastalığının aktifliği ve atak döneminde LPO artışına paralel olarak sitozole  $Ca^{+2}$  akışının artması kendi arasında uyumluluk arz etmektedir. Çalışmamıza göre artan oksidatif strese bağlı olarak bir kısım katyon kanallarının açılması ve buna bağlı olarak da sitozole  $Ca^{+2}$  akışının artışı söz konusu gibi görünmektedir.

Sonuç olarak; AAA hastalığında oksidatif stres ve sitozole  $Ca^{+2}$  girişi aktivasyonda rol oynamaktadır. Bu mekanizmaları kolşisin baskılıyor ve bir etki mekanizması olarak da bu yolağın inhibisyonu gibi görünmektedir. Bu konuda daha ileri ve moleküller düzeyde araştırmalara ihtiyaç vardır. Hastalığın tedavisinde proflaktik antioksidanların kullanımı tartışılabilir. Ayrıca aktif hastalardaki sitozole  $Ca^{+2}$  girişinde olan artıştaki pozitif feed-back'ı kırmaya yönelik geliştirilebilecek tedaviler hastalığın aktivasyonun kontrol altına alınmasında faydalı olabilecektir.



## 6. SONUÇ

AAA hastalığının patogeneğinde çeşitli mekanizmalar rol almaktadır. En çok kabul edilen teori MEFV gen mutasyonudur. Hastalığın aktivasyonunun nedeni tam olarak belli değildir. Atak gelişmesinde artmış nötrofil aktivasyonu önemli mekanizmalardan biridir. Oksidatif stres ve sitozole  $Ca^{+2}$  girişinde artma, AAA hastalığın aktivasyonu ve remisyon sağlanamamasında, nötrofil aktivasyonu ile ilişkili olarak rol oynamaktadır. Ayrıca kolşisin bu değerler üzerinde baskılayıcı olarak rol almaktadır. Bu konuda kolşisinin etki mekanizmasını tam olarak aydınlatılabilmek için daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir. AAA hastalığında artmış oksidatif stres nedeniyle antioksidan kullanımı tartışılabilir. Sitozole  $Ca^{+2}$  akışını inhibe edebilecek yeni tedavi metotları araştırılabilir. Böylece nötrofillerin diğer mekanizmalara ek olarak bu mekanizmaların da inhibe edilmesi suretiyle aktivasyonları önlenir.

## ÖZET

### **Ailevi Akdeniz Ateş'li Hastalarda Nötrofil Fonksiyonlarının Göstergesi Olarak Nötrofillerde Kalsiyum Sinyali ve Oksidatif stres Üzerine Kolşisin Etkisi**

Ailevi Akdeniz Ateşi (AAA); tekrarlayan ateş, peritonit, sinovit, plörit ve nadiren perikardit atakları ile karakterize otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır.

Hastalığın ve aktivasyonların patogeneğinde birçok mekanizma ileri sürülmüşse de neden tam olarak bilinmemektedir. Ataklar esnasında nötrofillerin kemotaktik aktivitesi ileri derecede artmıştır. Tutulmuş olan dokularda belirgin nötrofil hakimiyeti mevcuttur. Bu durum hastalığın aktivasyonunda nötrofil aktivasyonunun rolünü düşündürmektedir. Ayrıca nötrofil aktivasyonunda oksidatif streste artış ve sitozole kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) girişi rol almaktadır.

Bu çalışmaya 6 AAA atak, 6 remisyon, 6 aktif hasta ile 6 sağlıklı birey olmak üzere 24 kişi alındı. Oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla lipid peroksidasyonu (LPO) göstergesi olan Malonildialdehit (MDA) ve antioksidanlardan Glutasyon (GSH) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) değerleri nötrofillerde ve serum örneklerinde çalışıldı. Ayrıca sitozole kalsiyum girişi gruplar arasında değerlendirildi.

Nötrofillerdeki MDA değerleri AAA atak grubunda kontrol ve remisyon grubuna göre anlamlı oranda yüksek saptandı ( $p<0.05$ ). Nötrofillerdeki MDA değerleri kolşisinle remisyon sağlanamayan grupta da diğer tüm gruplara göre anlamlı oranda yüksekti ( $p<0.01$ ). Serumdaki MDA düzeyleri de atak grubunda kontrol ve remisyon grubuna göre, kolşisine cevapsız grupta da remisyon grubuna göre yüksek saptandı. GSH ve GSH-Px değerleri, nötrofil ve serumlarda gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi. Sitozole  $Ca^{+2}$  girişi atak ve tedaviye cevapsız grupta MDA değerleriyle paralel olarak artış gösterdi.

Nötrofillerde oksidatif stres ve sitozole kalsiyum girişi aktif ve tedaviye cevap vermeyen AAA hastalarında artmaktadır. Kolşisine cevap veren hastalarda oksidatif stres ve nötrofillerde  $Ca^{+2}$  artışı bulunmamıştır. Kolşisin hem oksidatif stresi hem de nötrofil içi kalsiyum artışını önlemede etkili olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Ailevi Akdeniz Ateşi, Kalsiyum Sinyali, Nötrofil aktivasyonu, Oksidatif Stres, Kolşisin

## SUMMARY

### **The Effects of colchicine on calcium signaling and oxidative stress as a neutrophil function indicators in patients with familial Mediterranean fever**

Familial Mediterranean fever (FMF) is an autosomal recessive genetic disorder which is characterized by relapsing fever, peritonitis, synovitis, pleuritis and rarely pericarditis.

Despite, many etiological mechanisms have been proposed in pathogenesis of the disease itself and clinical activations, the etiology is not known exactly. Chemotactic activities of neutrophils are increased during the attacks. In the involved tissues neutrophil predominance is evident. It is suggested that the role of neutrophil activation may play a role in disease activation. Also increased oxidative stress and increase in the cytosolic calcium entry may play a role in neutrophil activation. In this study, we aimed to search the efficacy of colchicines on cytosolic calcium entry and oxidative stress in neutrophils and sera of the FMF patients.

Six FMF patients during attack, 6 in remission, 6 non-responsive to colchicine and 6 healthy, a total of twenty four subjects were included to our study. As oxidative stress indicators, malonyldialdehyde levels for lipid peroxidation, GSH and GSH-Px levels for antioxidant status were studied both from fresh neutrophils and sera. And, cytosolic calcium influx in neutrophils was also evaluated between groups.

MDA levels in neutrophils were significantly high in attack group than the control and remission groups ( $p < 0.05$ ). Also, MDA levels in neutrophils were significantly high in non-responsive group according to remission group ( $p < 0.01$ ). No differences were found between groups according to GSH and GSH-Px levels both in sera and neutrophils. The increase in cytosolic calcium entry was in parallel to the increase in MDA levels both found in attack and non-responsive groups.

Oxidative stress and cytosolic calcium influx in neutrophils are increase in patients with attack and non-responsive to colchicine. Colchicine may be effective both in preventing oxidative stress and calcium influx.

**Key Words:** Familial Mediterranean Fever, Calcium signaling, Neutrophil Activation, Oxidative Stress, Colchicine

## KAYNAKLAR

1. Boxer LA, Familial Mediterranean Fever; In Cecil Textbook of Medicine, 21st edition; Goldman L and Bennett JC eds, WB Saunders Company 2000; 916-917
2. Ben-Chetrit E, Levy M. Familial Mediterranean fever. *Lancet* 1998 ; 351:659-64.
3. Stehlik, C, Reed JC. The Pyrin connection: novel players in innate immunity and inflammation. *J Exp Med* 2004; 200:551.
4. Gilgil E, Arman M.İ. Ailesel Akdeniz Ateşi. In Göksoy T. Ed Romatizmal Hastalıklarda Tanı ve Tedavi. Yüce yayınları, İstanbul 2002; 711-20.
5. Ben-Chetrit E, Levy M. Colchicine: 1998 update. *Semin Arthritis Rheum* 1998;28:48-59.
6. Lidar M, Kedem R, Mor A, Levartovsky D, Langevitz P, et al. Arthritis as the sole episodic manifestation of familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 2005;32:859-62.
7. Pras M. FMF: Past, Present and Future. *Clin Exp Rheum* 2002; 20:66.
8. Gerateau G. The relation between familial Mediterranean fever and amyloidosis. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:61-4.
9. Doğan avşargil E, Keser G. Ailesel Akdeniz Ateşi. In Doğanavşargil E; ed. Klinik Romatoloji. Deniz matbaası; İstanbul 1999;467-74.
10. Turkcapar N, Tuncali T, Kutlay S, Burhan BY, Kinikli G et al. The contribution of genotypes at the MICA gene triplet repeat polymorphisms and MEFV mutations to amyloidosis and course of the disease in the patients with familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 2007; 27:545-51.
11. Yılmaz E, Özen S, Balcı B, et al. Mutation frequency of familial Mediterranean fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:553-5.
12. Gang N, Drenth JP, Langevitz P, Zemer D, Brezniak N, et al. Activation of the cytokine network in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 1999; 26:890-7.
13. Molad Y, Fridenberg A, Bloch K, Langevitz P, Mukamel M, et al. Neutrophil adhesion molecule expression in Familial Mediterranean fever: Discordance between the intravascular regulation of  $\beta 2$  integrin and L-Selectin expression in acute attack. *J Inves Med* 2004; 52:58-61.
14. Direskeneli H, Ozdogan H, Korkmaz C, Akoglu T, Yazıcı H. Serum soluble intercellular adhesion molecule 1 and interleukin 8 levels in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 1999; 26:1983-6.

15. Zakhireh B, Malech HL. The effect of colchicine and vinblastine on the chemotactic response of human monocytes. *J Immunol* 1980; 125: 2143-53.
16. Ehrenfeld M, Levy M, Bar Eli M, Gallily R, Eliakim M. Effect of colchicine on polymorphonuclear leucocyte chemotaxis in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1980 ;10: 297.
17. Haringman JJ, Ludikhuizen J, Tak PP. Chemokines in joint disease: the key to inflammation? *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1186-94.
18. Matzner Y, Brzezinski A. C5a-inhibitor deficiency in peritoneal fluid from patients with Familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1984;311: 287-90. .
19. Onen F. Familial Mediterranean Fever. *Rheumatol Int* 2006; 26:489-96.
20. Livneh A, Langevitz P. Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Baillier's Clin Rheum* 2000; 14:477-98.
21. Tunca M, Akar S, Onen F, Ozdogan H, Kasapcopur O, Yalcinkaya F. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)* 2005; 84:1-11.
22. Balaban B, Yasar E, Ozgul A, Dincer K, Kalyon TA. Sacroiliitis in familial Mediterranean fever and seronegative spondyloarthritis: importance of differential diagnosis. *Rheumatol Int* 2005;25:641-4.
23. B'chir Hamzaoui S, Bouslama K, Abdallah M, M'rad R, M'rad M. Myalgia in familial Mediterranean fever. *Rev Neurol* 2007; 163:93-5.
24. Pras M. FMF: Past, Present and Future. *Clin Exp Rheum* 2002; 20(26):66.
25. Bakkaloglu A. Familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol* 2003; 18:853-59.
26. Livneh A, Langevitz P, Shinar Y, Zaks N, Kastner DL, Pras M, et al. MEFV mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Amyloid* 1999; 6:1-6.
27. Collard M, Sellal F, Hirsch E, Mutschler V, Marescaux C. Recurrent aseptic meningitis in periodic disease or Mollaret's meningitis? *Rev Neurol* 1991; 147:403-5.
28. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997; 40(10):1879-85.
29. Goldfinger S.E. Colchicine for Familial Mediterranean Fever. (Letter) *New Eng J Med* 1972; 287:1302.
30. Zemer D, Revach M, Pras M, Modan B, Schor S, et al. A controlled trial of colchicine in preventing attacks of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 1974; 291: 932-4.
31. Keven K, Sengul S, Kutlay S, Ekmekci Y, Anadol E, et al. Long-term outcome of renal transplantation in patients with familial Mediterranean fever amyloidosis: a single-center experience. *Transplant Proc* 2004; 36:2632-4.

32. Chetrit EB, Levy M. Reproductive system in familial Mediterranean fever: an overview. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:916–9.
33. Calguneri M, Apras S, Ozbalkan S, Ozturk MA, Ertenli I. The efficacy of continuous interferon- $\alpha$  administration as an adjunctive agent to colchicine-resistant familial Mediterranean fever patients. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22( 34):41-4.
34. Tunca M, Akar S, Soyturk M, Kirkali G, Resmi H, et al. The effect of interferon- $\alpha$  administration on acute attacks of familial Mediterranean fever: A double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22( 34): 37-40.
35. Ureten K, Calguneri M, Onat MA, Ozcakar L, Ertenli I, et al. Interferon alfa in protracted arthritis of familial Mediterranean fever: a robust alternative for synovectomy. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1527.
36. Onat AM, Ozturk MA, Ozcakar L, Ureten K, Kaymak SU, et al Selective serotonin reuptake inhibitors reduce the attack frequency in familial Mediterranean fever *Tohoku J Exp Med* 2007; 211:9-14.
37. Mor A, Pillinger MH., Kishimoto Abeles M, Livneh A, familial Mediterranean fever successfully treated with etanercept. *J Clin Rheumatol* 2007; 13:38-40.
38. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30(2):145-58.
39. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007; 18(9):567-79.
40. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *J Nutr* 2004;1 34(11):3143-63. .
41. Lam MA, Pattison DI, Bottle SE, Keddie DJ, Davies MJ. Nitric oxide and nitroxides can act as efficient scavengers of protein-derived free radicals. *Chem Res Toxicol* 2008; 21(11):2111-9.
42. Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: a review. *J Reconstr Microsurg* 1989 ;5(1):79-84.
43. Van Wijk R, Van Wijk EP, Wiegant FA, Ives J. Free radicals and low-level photon emission in human pathogenesis: state of the art. *Indian J Exp Biol* 2008; 46(5):273-309.
44. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*. 2002; 65(4):305-11.
45. Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci*. 1996; 1;172-90.
46. Sharpe MA, Robb SJ, Clark JB. Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. *J Neurochem* 2003; 87(2):386-94.

47. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep* 2002; 7(1):55-7.
48. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000; 149(1):43-50.
49. Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(26):12365-7.
50. Gutteridge JM, Maitt L, Poyer L. Superoxide dismutase and Fenton chemistry. Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II). *Biochem J* 1990; 269(1):169-74.
51. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* 1988; 240(4852):640-2.
52. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 1995; 82-83:969-74.
53. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12(10):1161-208.
54. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899:136-47.
55. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119(6):598-620.
56. Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, et al. The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev* 1999 ;31(1):117-39.
57. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41(12 ):1819-28.
58. Leutner S, Eckert A, Muller WE. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J Neural Transm* 2001;108(8-9):955-67.
59. Quinlan GJ, Gutteridge JM. Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids and carbohydrate in the presence of iron and copper salts. *Free Radic Biol Med* 1988; 5(5-6):341-8.
60. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 2003; 9 :179-94.
61. Peskin AV. Cu,Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. *Biosci Rep* 1997; 17(1):85-9.
62. Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med* 1990;8(2):201-9.
63. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(1):1-14.

64. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.
65. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200(2):248-54.
66. Pinchuk I, Lichtenberg D. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Prog Lipid Res* 2002; 41(4):279-314.
67. Klouche K, Morena M, Canaud B, Descomps B, Beraud JJ, et al. Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants. *Eur J Clin Invest* 2004; 34(9):619-25.
68. Comporti M. Introduction-serial review: iron and cellular redox status. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(7):565-7.
69. Kleinova M, Hewitt M, Brezova V, Madden JC, Cronin MT, et al. Antioxidant properties of carotenoids: QSAR prediction of their redox potentials. *Gen Physiol Biophys* 2007; 26(2):97-103.
70. Becker BF, Reinholz N, Leipert B, Raschke P, Permanetter B, Gerlach E. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest* 1991; 100(3 ):176-81.
71. Knight, J.A. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30(2):145-58.
72. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266(1-2):37-56.
73. Herrera DG, Yagüe AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M at al. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of antioxidant. *PNAS* 2003; 100:7919-24.
74. Hengstler JG, Bolt HM. Oxidative stress: from modification of cell-cycle related events, secondary messenger function, dysregulation of small GTPases, protein kinases and phosphatases to redox-sensitive cancer models. *Arch Toxicol* 2008; 82(5):271-2.
75. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260(6):3440-50.
76. Alberts B, Johnson A, Lewis J, *Molecular Biology of the Cell: Fourth Edition*. Garland Publishing Inc 2002; 1: 852-862.
77. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987; 56:395-433.
78. Catterall WA, Perez-Reyes E, International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4): 411-25.
79. Mckay BE, Placzek AN, Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol* 2007; 74(8):1120-33.



80. Placer ZA, C.L. Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biological fluids. 1966.
81. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25(1):192-205.
82. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71(4):952-8.
83. Papin, S, Duquesnoy, P, Cazeneuve, C, et al. Alternative splicing at the MEFV locus involved in Familial Mediterranean fever regulates translocation of the marenostri/pyrin protein to the nucleus. *Hum Mol Genet* 2000; 9:3001.
84. Bar-Eli M EM, Levy M, Gallily R, Eliakim M. Leukocyte chemotaxis in recurrent polyserositis (familial Mediterranean fever). 1981 Jan-Feb; *Am J Med Sci.*:281(1):15-8.
85. Guldal Kirkali, Mehmet Tunca, Sermin Genc, Pawel Jaruga, Miral Dizdaroglu. Oxidative DNA damage in polymorphonuclear leukocytes of patients with familial Mediterranean fever. *Free Radical Biology & Medicine* 2008;44 : 386–93.
86. Sarkisian T, Emerit I, Arutyunyan R, Levy A, Cernjavski L, Filipe, P. Familial Mediterranean fever: clastogenic plasma factors correlated with increased O<sub>2</sub>(-)-production by neutrophils. *Hum. Genet.*1997; 101: 238–42.
87. Nazıroğlu, M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochemical Research* 2007; 32:1990-2001.
88. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:323–33.
89. Gaudry M, C.J. Roberge, R. deMedicis, et al. Crystal-induced neutrophil activation. III. Inflammatory microcrystals induce a distinct pattern of tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *J. Clin. Invest* 1993; 91:1649–55.
90. Ben-Chetrit, E, Levy, M. Colchicine prophylaxis in familial Mediterranean fever: Reappraisal after 15 years. *Semin Arthritis Rheum* 1991; 20:241.
91. Lidar, M, Scherrmann, JM, Shinar, Y, et al. Colchicine nonresponsiveness in familial mediterranean fever: clinical, genetic, pharmacokinetic, and socioeconomic characterization. *Semin Arthritis Rheum* 2004; 33: 273.
92. Niel, E, Scherrmann, JM. Colchicine today. *Joint Bone Spine* 2006; 73: 672.
93. Molad, Y.M.D. *Curr. Rheumatol. Rep* 2000; 4(3): 252-6.
94. Eldad Ben-Chetrit, Micha Levy. Familial Mediterranean fever. *The Lancet* 1998; 351(28):659-64.
95. Gurbuz M, Yamanel L, Bulucu F, Inal V, Aydin A. Oxidative stress status in familial Mediterranean fever with or without proteinuria. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38(2):271-5.

96. Tunca M, Kırkali G, Soytürk A, et al. Acute phase response and evolution of Familial Mediterranean fever. *Lancet (Research letters)* 1999; 353(9162):1415.
97. Drenth PH, Poland D, van het Hof B, et al. Acute and chronic inflammation in FMF attacks and evidence for acute phase reaction in MEFV heterozygotes, *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:2.
98. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS, Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.* 2004; 567: 1–61.
99. Karaguezyan K G, Haroutjunian V M, Mamiconyan R S, Hakobian G S, Nazaretian E E. Evidence of oxidative stress in erythrocyt ephospholipid composition in the pathogenesis of familial Mediterranean fever *Clin Pathol* 1996; 49:453-55.
100. Sutcu R, Tunc E, Oktem F, Cure M, Hicyilmaz H, et al. Oxidative stress status in patients with familial mediterranean fever and its relation to genetic mutation. *Ann Rheum Dis* 2007; suppl 66: 252.
101. Nazıroğlu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress- induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res* 2009; 34:2181–91. .