

**T.C**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA KARBONİK ANHİDRAZ**  
**OTOANTİKORLARI VE ANTİOKSİDAN ENZİMLER ARASINDAKİ**  
**İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ayşe AKYÜZ**

**TRABZON, 2008**

**T.C**  
**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA KARBONİK ANHİDRAZ**  
**OTOANTİKORLARI VE ANTİOKSİDAN ENZİMLER ARASINDAKİ**  
**İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

**Ayşe AKYÜZ**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09.07.2008**

**Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 23.07.2008**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç.Dr. Ahmet ALVER**

**Jüri Üyesi : Prof. Dr. Orhan DEĞER**

**Jüri Üyesi : Yrd. Doç.Dr. C.Kurtuluş BURUK**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Orhan DEĞER**

**Temmuz, 2008**

**TRABZON**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak yaptığım bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı öncelikle danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALVER olmak üzere bilgilerinden yararlandığım saygı değer hocalarım Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Doç. Dr. S. Caner KARAHAN, Doç. Dr. Yüksel Ali YAZICIOĞLU ve Doç. Dr. Birgül Vanizör KURAL'a, çalışmalarım da benden yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Ahmet MENTEŞE başta olmak üzere Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Biyokimya Anabilim Dalındaki bütün arkadaşlarıma, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalındaki Dr. Ö. Faruk BARCAK ve Dr. Ferhat GÖKMEN'e ayrıca beni bu günlere getiren benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz, 2008

Ayşe AKYÜZ

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>ÖNSÖZ</b>	<b>I</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>II</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>IV</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>V</b>
<b>KISALTMALAR</b>	<b>VI</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Karbonik Anhidraz	3
2.1.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	3
2.1.2. Karbonik Anhidraz I (CA I)	5
2.1.3. Karbonik Anhidraz II (CA II)	5
2.2. Otoimmünite ve Romatoid Artrit	6
2.2.1. Otoimmünite	6
2.2.2. Otoimmün Hastalıklarda İmmünopatolojik Mekanizmalar	7
2.2.3. Romatoid artrit (RA)	7
2.2.3.1. Romatoid Artrit Oksidan ve Antioksidan Dengeyle İlişkisi	9
2.3. Antioksidan Enzimler	10
2.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	10
2.3.2. Katalaz (CAT)	11
2.4. Karbonik Anhidrazın Otoimmün Hastalıklarla İlişkisi	11
<b>3. MATERYAL ve METOD</b>	<b>13</b>
3.1. Materyal	13
3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	13

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	14
3.2. Metodlar	15
3.2.1. Numunelerin toplanması	15
3.2.2. CA Otoantikörlerinin ELISA Yöntemiyle Tayini	16
3.2.3. Plazma Lipit Peroksid (MDA ) Tayini	18
3.2.4. Eritrosit MDA Seviyesi Tayini	20
3.2.5. Eritrosit Antioksidan Enzimler	23
3.2.5.1. Süperoksid Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	23
3.2.5.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini	25
3.2.6. Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Tayini	26
3.3. İstatistiksel Analizler	28
<b>4. BULGULAR</b>	<b>29</b>
4.1. ELISA Sonuçları	29
4.1.1. CA I Otoantikörleri için ELISA Sonuçları	29
4.1.2. CA II Otoantikörleri için ELISA Sonuçları	29
4.2. MDA Ölçümü Sonuçları	30
4.3. Eritrosit Antioksidan Enzimleri Ölçüm Sonuçları	31
4.4. TAS Sonuçları	33
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>34</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	<b>40</b>
6.1. Sonuçlar	40
6.2. Öneriler	40
<b>ÖZET</b>	<b>41</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>43</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>VII</b>

**TABLolar DİZİNİ**

	Sayfa No
<b>Tablo 1.</b> $\alpha$ -CA izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri, sülfonamidlere olan ilgileri ve hücre içi yerleşimleri	<b>4</b>
<b>Tablo 2.</b> Romatoid artrit tanı kriterleri	<b>8</b>
<b>Tablo 3.</b> Kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri	<b>13</b>
<b>Tablo 4.</b> Kullanılan kimyasal maddeler üretici firmalar ve ürün kodları	<b>14</b>
<b>Tablo 5.</b> RA tanısında kullanılan biyokimyasal parametreler ve demografik özellikler.	<b>15</b>
<b>Tablo 6.</b> Plazma MDA seviyesi ölçümü için reaksiyon karışımı.	<b>19</b>
<b>Tablo 7.</b> Eritrosit MDA seviyesi ölçümü için reaksiyon karışımı.	<b>21</b>
<b>Tablo 8.</b> SOD aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı.	<b>24</b>
<b>Tablo 9.</b> Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı.	<b>26</b>
<b>Tablo 10.</b> Serum TAS ölçümü için reaksiyon karışımı.	<b>27</b>

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	Sayfa No
<b>Şekil 1.</b> Plazma MDA seviyesi ölçümü için standart grafiği	<b>20</b>
<b>Şekil 2.</b> Eritrosit MDA düzeyi ölçümü için HPLC kromatogramı.	<b>22</b>
<b>Şekil 3.</b> Eritrosit MDA seviyesi ölçümü için standart grafiği.	<b>22</b>
<b>Şekil 4.</b> SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği	<b>25</b>
<b>Şekil 5.</b> SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği.	<b>25</b>
<b>Şekil 6.</b> TAS ölçümü için standart grafiği	<b>28</b>
<b>Şekil 7.</b> CA I Otoantikörleri için ELISA sonuçları.	<b>29</b>
<b>Şekil 8.</b> CA II otoantikörleri için ELISA sonuçları.	<b>30</b>
<b>Şekil 9.</b> Plazma ve eritrosit MDA seviyeleri.	<b>31</b>
<b>Şekil 10.</b> Eritrosit antioksidan enzim (SOD, CAT) aktivite seviyeleri.	<b>32</b>
<b>Şekil 11.</b> SOD aktivitesi ile CA II otoantikörleri arasındaki korelasyon grafiği.	<b>32</b>
<b>Şekil 12.</b> Serum TAS seviyeleri.	<b>33</b>

**KISALTMALAR**

CA	: Karbonik Anhidraz
CARP	: Karbonik Anhidraz Related Protein
ELISA	:Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
PBC	:Primer Biliary Cirrhosis
IgG	:Immunoglobulin G
RA	:Romatoid Artrit
AIH	:Autoimmun Hepatitis
SLE	:Systemic Lupus Erythematosus
AIC	:Autoimmun Cholangitis
SS	:Sjögren's Syndrome
HLA	:Human Leucocyte Antigen
CAT	:Katalaz
SOD	:Süperoksit Dismutaz
TAS	:Total Antioksidan Seviye
MDA	:Malondialdehit



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karbonik Anhidrazlar (CA, E.C. 4.2.1.1., Karbonat Hidroliyz), karbondioksitin hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizleyen ve aktif bölgelerinde  $Zn^{2+}$  iyonu ihtiva eden monomerik proteinlerdir. Bugüne kadar omurgalıların farklı organ ve dokularında, farklı hücre içi yerleşimleri olan 15 CA izoenzimi belirlenmiştir (1, 2). CA enzimleri, organizmada  $CO_2$ 'in taşınması, asit-baz dengesinin düzenlenmesi, elektrolit sekresyonu gibi fizyolojik birçok olayda rol oynar.

Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya bağlı olarak gelişen otoimmün hastalıklarda vücudun kendi proteinlerine karşı antikor oluşturduğu bilinmektedir (3). Sistemik Lupus Eritematos (SLE) ve Sjögren Sendrom'lu hastaların serumlarında yapılan çalışmalarda CA II otoantikorlarının varlığı gösterilmiştir (4). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda CA II immünizasyonu ile çeşitli otoimmün hastalıklar oluşturulduğu, benzer şekilde çeşitli otoimmün hastalıklarda CA II otoantikorlarının varlığı gösterilmiştir (5, 6, 7, 8, 9, 10). CA II safra kanalları, pankreatik kanallar, renal tubüller ve tükürük bezi kanallarının epitel hücrelerinde bol miktarda sentezlenir. Bu yüzden CA II' nin çeşitli ekzokrin bezlerin epitel hücrelerinden salgılanan yaygın bir hedef antijen olarak, otoimmün ekzokrinopati ve otoimmün epitelitis olarak isimlendirilen hastalık komplekslerinin patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir (11). Bugüne kadar, CA II otoantikorları SLE, sistemik sikleroz, dermatomyozit, polimiyozit, endometrioz, otoimmün hepatit, kronik viral hepatit, kronik pankreatit, ülseratif kolit, tip 2 diabet ve Graves' hastalıklarında da belirlenmiştir fakat bu hastalıkların patolojisinde CA II otoantikorlarının rolü anlaşılammıştır (11, 12, 13). Son dönemde yapılan bir çalışmada, eritrositlerde artmış oksidatif stresin CA II'ye karşı antikor oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir (14).

Romatoid artrit (RA) kronik seyirli, inflamatuvar otoimmün bir hastalıktır. RA'nın gelişimi sırasında vimentin, glukoz 6 fosfoizomeraz, tip II kollagen gibi çeşitli proteinlere, karşı otoantikör üretimi gösterilmiştir. Önceki yıllarda bölümümüzde yapılan çalışmalarda RA'lı hastalarda CA otoantikörlerini varlığı belirlenmiştir. RA'lı hastaların eritrositlerinde yapılan çalışmalarda SOD, CAT ve GSH-Px gibi antioksidan enzim miktarlarında azalma, lipid peroksidasyonunda artma belirtilmiştir. Eritrositler CA'nın en bol bulunduğu hücreler olduğu için burada oluşan oksidatif hasarın bu proteinlerde bazı değişikliklere sebep olması mümkündür. Bu çalışmada, RA hastalarının serumlarında CA otoantikörleri, MDA, TAS seviyelerinin tespit edilmesi, yine bu hastaların eritrositlerindeki SOD ve CAT aktivitesi tayin edilip, MDA seviyelerin ölçülmesi ve bu parametreler arasındaki ilişkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

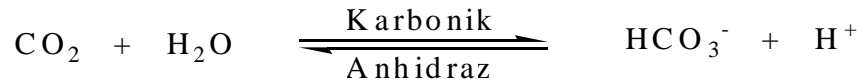
## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karbonik Anhidraz

#### 2.1.1. Dağılımı ve fizyolojik Önemi:

Karbonik anhidraz (CA, E.C. 4.2.1.1., karbonat hidrolizaz)  $Zn^{2+}$  iyonu içeren monomerik yapıya sahip bir proteindir. Prokaryotlardan ökaryotlara kadar çok geniş bir dağılıma sahip olup birbirinden bağımsız dört gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Bugüne kadar dört farklı tipi karakterize edilmiştir. Bunlar  $\alpha$ -CA (omurgalılar, bakteriler, algler ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında),  $\beta$ -CA (çoğunlukla bakteriler, algler, tek ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında),  $\gamma$ -CA (temel olarak archealarda ve bazı bakterilerde),  $\delta$ -CA'dır (bazı deniz diatomlarında) (15).

En iyi karakterize edilen enzimler memelilerde tanımlanmış olup  $\alpha$ -sınıfı enzimlerdir. Doku dağılımı ve hücre içi yerleşimi, katalitik özellikleri ve inhibitörlere karşı direnci birbirinden farklı olan 16  $\alpha$ -CA izoenzimi ve katalitik aktivitesi olmayan CA benzeri protein (CARP) bulunmuştur (16). İlk defa 1933 yılında memeli eritrositlerinden saflaştırılmışlardır. CA'nın temel fizyolojik fonksiyonu  $CO_2$ 'nin hidrasyonu veya bikarbonatın dehidrasyon reaksiyonlarını dönüşümlü olarak katalizlemesidir (17).



Bu reaksiyonla beraber;  $CO_2$  taşınması, bikarbonatın dokular ve akciğerler arasında metabolize olmasında, pH homeostazisinde, doku ve organlardaki elektrolit sekresyonu, birçok biyosentez reaksiyonunda (glukoneogenez, lipogenez, üregenez vs.), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu, idrar

asidifikasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması ve daha birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol almaktadır (17, 18).

**Tablo-1**  $\alpha$ -CA izoenzimleri, hidrataz aktivitesi, sülfonamid inhibitörleri için afinite ve hücre içi yerleşimleri (15).

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

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

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

Fizyolojik önemi bugüne kadar belirlenememekle beraber karbonik anhidraz karboksilik, sülfonik, karbonik ve fosforik esterlerin, aldehitlerin ve pirüvatın hidrolizini de katalizler (19).

### 2.1.2 Karbonik Anhidraz I (CA I)

CA I, konsantrasyonu 12 mg /gram hemoglobin olup eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir. İnsan eritrositlerinde CA II'den

yaklaşık 6 kat daha fazla bulunan, fakat aktivitesi CA II'nin % 15'i kadar olan bir izoenzimidir ( $K_{cat}=2.10^5 s^{-1}$ ). Sağlam yetişkin eritrositlerinde CA I, total CA aktivitesinin % 50'sini oluşturmaktadır (19). CA I insan fetal eritrositlerinde bulunmaz. CA I,  $Cl^-$  tarafından inhibisyonda CA II'den daha fazla ve sülfonilamid inhibitörlerinden de CA II'ye göre daha az etkilenir. CA I, kalın bağırsağın epitelyumunda, kornea epitelyumunda, lenste, ter bezlerinde, adipoz dokuda bulunur. Kırmızı kan hücrelerinde hemoglobinden sonra en çok bulunan protein olmasına rağmen hiçbir hematolojik anormallik onun eksikliği sonucunda ortaya çıkmamaktadır. CA I izoenziminin fizyolojik önemi belli değildir. Diğer CA izoenzimlerinin ve başka mekanizmaların CA I eksikliğini telafi edebildiği tahmin edilmektedir (20).

### 2.1.3.Karbonik Anhidraz II (CA II)

CA II, hemen hemen her doku veya organda bazı hücre tiplerinin sitozolünde bulunan  $CO_2$  hidrasyonu için maksimum turnover sayılı ( $1.10^6 s^{-1}$ ) ve en geniş dağılımlı yüksek aktiviteli bir izoenzimidir (21). CA II kemikte osteoklastlarda, beyinde, oligodendrositler ve beyin epitelyumunda, gözde lensler ve retina müller hücrelerinde, karaciğerde, böbrekte, salgı bezlerindeki asiner hücrelerde, pankreatik kanal hücrelerinde, gastrik parietal hücrelerde, uterusun endometriumunda, endotel hücrelerde, spermatozoada, eritrositlerde, trombositlerde bulunur. Bu hücre tiplerinde CA II'nin fiziksel rolü dönüşümlüdür. Bazı hücrelerde CA II asit-baz dengesi için temel rol oynar. Üriner asidifikasyon üretimi için  $H^+$  salgılayan renal tubuler, gastrik parietal hücreler tarafından  $H^+$  salgısına katkıda bulunur (17). CA II pankreas sıvısı için  $HCO_3^-$  katkısı yapan pankreatik kanal hücrelerine  $HCO_3^-$  temin eder. Dönüşümsüz körlüğe sebep olan glakomda CA II enziminin önemli rolü vardır. Glakom anormal derecede yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkmaktadır. Dünyada on milyonu aşkın kişinin yüksek göz içi basıncına sahip olduğu tahmin edilmektedir. Aköz humor göz içi basıncının sağlanmasında büyük rol oynamaktadır (22). Aköz humorun salgılanmasında da CA II enziminin uyarıcı etkisi vardır. CA II aynı zamanda böbrekte, eritrositlerde ve karaciğerde proksimal tübüllerde  $CO_2$  değişimine katkıda bulunur (23).

## 2.2 Otoimmünite ve Romatoid Artrit

### 2.2.1 Otoimmünite

İmmün sistemin temel fonksiyonu vücudun kendine yabancı antijenleri tanıma ve onlara karşı B, T tipi lenfositler vasıtasıyla immün cevap oluşturmaktır (3). Normalde vücut kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmamaktadır. Fakat bazı patolojik durumlarda hücre reseptörlerinin bozulması veya immün cevap ürünlerinden bazılarının değişik aktivite göstermesi sonucu organizmada değişen antijenlere karşı immün cevap oluşmaktadır. Organizmanın kendi doku antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaya otoimmünite, otoimmünizasyonun rol oynadığı hastalıklara da otoimmün hastalıklar denir. Bu hastalıklar, hastalığın bulunduğu organlar bakımından iki gruba ayrılır. I. grup hastalıklar bir organda görülmektedir ve organa özgül otoimmün hastalıklar denilmektedir. Örneğin; tiroid hastalıkları (Hashimoto ve Graves hastalığı), pernisiyöz anemi, adison, juvenil diabet gibi. II. grup, romatoid artrit, skleroderma, SLE gibi hastalıklarda olduğu gibi birden fazla organ tutulumu varsa bu tür hastalıklara organa özgül olmayan veya sistemik otoimmün hastalıklar denilmektedir.

Otoimmün hastalıkların oluşumunu tetikleyen ana faktörler:

- Genetik faktörler
- İmmünolojik faktörler
- Hümmoral immün cevap
- İmmün kompleksler
- Hüccresel immün cevap
- Viral faktörler

Otoimmün hastalıkların oluşma mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Bu tür hastalıkların tanısında organizmanın kendi dokularına karşı oluşan hüccresel tip immün cevap ve otoantikörlerin belirlenmesinden yararlanılmaktadır. Otoantikörler; hasar görmüş, antijenik olarak değişmiş dokulara cevap olarak

gelişebilir. Sistemik otoimmün hastalıklarda otoantikörler pek çok antijene karşı gelişmiş olabilir. Ve bu antikörler hastalığın klinik belirtileri ortaya çıkmadan yıllar önce pozitif bulunabilir (3).

### **2.2.2. Otoimmün Hastalıklarda İmmünopatolojik Mekanizmalar**

1- İmmün sistem araçlarıyla doğrudan temas halinde olmayan hücre içi maddeler organizma tarafından “kendisine ait” olarak tanınmamış olabilir. Bunlar dolaşıma karıştıkları takdirde bir immün cevaba yol açabilirler.

2- Organizmanın “kendisine ait” olarak tanıdığı antijenler; kimyasal, fiziksel veya biyolojik değişikliklere uğrayarak bu özelliklerini kaybedebilirler.

3- Yabancı bir antijen, organizmanın “kendisine ait” antijenleriyle çapraz reaksiyon meydana getirerek bir bağışıklık cevabının oluşmasına neden olabilir.

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

### 2.2.3. Romatoid Artrit

Romatoid artrit, birçok eklemi aynı anda tutabilen, kronik seyirli, etyolojisi bilinmeyen, sistemik iltihabi bir otoimmün hastalıktır. Eklem tutulumu, şekil bozukluğu (deformiteler) yaparak zaman içinde önemli sakatlıklara yol açabilmektedir (25).

RA'nın prevalansı yaklaşık olarak % 0,8'dir (%0,3-2,1). En çok 35-60 yaşlarında başlamakta ve kadınlarda erkeklere oranla 2-3 kat daha fazla görülmektedir. Prevalansı yaş ile artmakta ve cinsiyet farklılığı yaşlılarda azalmaktadır (25).

Hastalığın etyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı çok nedenli bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Hastalık aynı aile içinde birden çok kişide görülmektedir. Birinci derece akrabaları arasında romatoid artrit hastası olan bir kişide romatoid artrit gelişmesi riski, genel topluma oranla 16 kat artmış olarak bulunmaktadır. Tek yumurta ikizleri arasında hastalığın birlikte görülme sıklığı % 15-20 dir. Bu oran çift yumurta ikizlerine göre 4 kat daha yüksektir. HLA DR4 ve HLA DR1 romatoid artrite yatkınlık oluşturan genlerdir (26).

Hastalığın tanısında simetrik eklem tutulumu ve romatoid faktör pozitifliği tanıya yardımcı olsa da SLE, sedef artrit gibi değişik hastalıklarla karışabilir. Amerikan Romatizma Kolejinin 1987 yılında yayınladığı tanı kriterleri (Tablo-2) bugün için RA'yı tanımlayan en iyi araç olarak kabul edilmektedir (24, 26).

**Tablo-2:** Romatoid artrit tanı kriterleri-1987(ACR)

<b><i>Romatoid Artrit Tanı Kriterleri</i></b>	
<b>Sabah tutukluğu</b>	Eklem çevrelerinde ve en az 1 saat süreli*
<b>Üç veya daha fazla eklemde artrit</b>	Bir hekim tarafından tespit edilen en az 6 haftadır süregelen eklem şişliği veya sıvısı*
<b>El eklemlerinde artrit</b>	El bileği, MCF ve PİF eklemlerinde en az 6 haftadır



---

	süregelen şişlik*
<b>Simetrik artrit</b>	Vücudun her iki yanındaki eklemlerde simetri gösteren ve en az 6 haftadır süregelen tutulma (Bilateral PİF, MCF ve MTF tutulumu simetri göstermese de kabul edilir)*
<b>Romatoid nodül</b>	Eklem kenarları ve temas bölgelerinde bir hekim tarafından tespit edilen deri altı nodülleri*
<b>Romatoid faktör (Rf) olumluluğu</b>	Normal kontrollerde %5'den daha az pozitif bulunan bir yöntemle bakılmalıdır
<b>Radyolojik değişiklikler</b>	Ön-arka planda çekilmiş düz el grafilerinde görülen erozyonlar ve periartiküler osteoporoz

---

Tanı için en az dört koşulun bir arada olması gerekmektedir.

\*En az 6 haftadan beri devam etmesi gerekmektedir.

### 2.2.3.1. Romatoid Artritin Patogenezi ve Oksidan-Antioksidan Denge ile İlişkisi

Romatoid artritin patolojisinde hem humoral hem de hücre sel bağışıklık mekanizmalarının rol oynadığına ilişkin birçok kanıt vardır. Hastalığı başlatan olaylar bilinmemektedir. İmmunolojik mekanizmalarla uyarılan T lenfositler değişik proinflamatuvar sitokinleri salgılayarak sinovial proliferasyona ve sinovite neden olmaktadır. İlerleyen dönemlerde kıkırdak ve kemikte de harabiyet oluşmaktadır (24, 25).

Serbest radikaller birçok fizyolojik ya da patolojik olaylar sırasında oluşabilen eşlenmemiş elektronu bulunan atom veya moleküllerdir. Eşlenmemiş elektronlar bu molekülleri oldukça reaktif hale getirerek proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi önemli molekülleri tahrip edecek reaksiyonları başlatabilirler. Serbest radikallerin RA patogenezi üzerindeki etkilerinin araştırılması son 30 yıldır devam etmektedir. RA'lı hastalarda bazı antioksidan maddelerin kullanılması faydalı etkiler göstermiştir. Serbest radikaller ve serbest radikal ürünleri inflamasyonun önemli mediatörlerindendir (27). T hücrelerinin ve makrofajların aktivasyonu büyük miktarda oksijen tüketimi ile sonuçlanır ve ROS oluşumu artar.

Özellikle artan süperoksit ( $O_2^{\cdot -}$ ) miktarı hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot}$ ) oluşumuna sebep olarak hasarın daha da büyümesine ve matriks yıkımına sebep olur (28). Organizma enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemleri ile bu hasarı önlemeye çalışmaktadır. Özellikle SOD aktivesinin bu hasar önlemede önemli olduğu SOD knock out farelerde gösterilmiştir (14). Bu farelere dışarıdan SOD ve SOD'u taklit eden ajanlar (Tempol) verildiğinde hem hastalığın önlenmesinde hem de tedavi sürecinde faydalı sonuçlar elde edilmiştir. RA hastalarının eritrositlerinde yapılan çalışmalarda çoğunda, bu hücrelerde antioksidan enzimlerin miktarında azalma ve lipit peroksidasyonunda ise artma gösterilmiştir (28).

### 2.3. Antioksidan Enzimler:

Hücrede oluşan radikallerin detoksifikasyonu genellikle enzimlerle gerçekleştirilir. Bunlar; SOD, Kat ve GSH-Px gibi süperoksit radikali ve hidrojen peroksidi temizleyen enzimlerdir (29).

#### 2.3.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

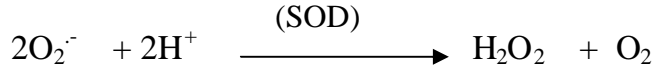
Süperoksit dismutaz [(SOD) süperoksit:süperoksit oksidoredüktaz EC 1.15.1.1] ilk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır (30). Endojen olarak oluşturulan süperoksit radikallerinin toksik etkilerinden hücreyi koruyan bir grup metalloenzimdir. Süperoksidin hidrojen perokside dönüşümünü katalizler ve oksiradikallere karşı primer koruyucudur.

Birçok dokuda ve oldukça bol miktarda bulunan süperoksit dismutazın iki izoenzimi vardır:

1. Sitoplazmik Cu-Zn SOD
2. Mitokondrial Mn-SOD

Ayrıca sadece *Escherichia coli* de bulunan Fe-SOD vardır.

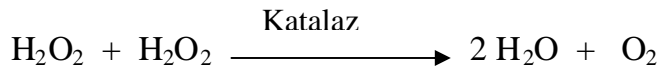
SOD enziminin asıl fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerinden korumaktır. Metabolik substrat olarak enzim süperoksit radikallerini kullanır ve onu daha az zararlı bir bileşik olan hidrojen perokside dönüştürür (31).



### 2.3.2 Katalaz (CAT)

Katalaz ( $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$  oksidoredüktaz E.C. 1.11.1.6) dört tane hem grubu içeren ve her bir alt birimin molekül ağırlığı 60kD olan tetramerik yapıya sahip bir enzimdir. Tüm aerobik mikroorganizmalarda, bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bir hemoproteindir (32).

En önemli fizyolojik fonksiyonu aşağıdaki reaksiyonu katalizleyerek gerçekleştirdiği  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin seviyesinin ayarlanmasında düzenleyici rol alması ve hücreleri  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin oksidasyonundan korumasıdır (31).



### 2.4. CA'ın Otoimmün Hastalıklarla İlişkisi

Sjögren sendromu, idiopatik kronik pankreatit, primer safra sirozu, primer sklerotik, renal tübüler asidoz'u içeren kuru gland sendromu veya otoimmün ekzokrinopati adı verilen hastalık grubunda farklı organların duktal epitel hücrelerinde exprese edilen yaygın bir antijene karşı otoimmün bir cevabın var olabileceği ileri sürülmüştür (33, 34). Bu organlardan elde edilen ekstraktların çeşitli hayvan türlerine farklı adjuvantlarla immünizasyonuyla bazı immun hastalıklar oluşturulmuştur. Ancak bu ekstraktlardaki uyarıcı antijenin yapısı tanımlanamamıştır (35, 36).

İlk kez 1991 yılında Inagaki ve arkadaşları tarafından sistemik lupus eritematos ve Sjögren sendrom (SS)'lu hastaların serumlarında CA II otoantikörlerinin varlığı gösterilmiştir (4). Nishimori ve arkadaşları SS 'lu

hastalarda pankreas, tükürük bezi, böbrek ve özefagus gibi ekzokrin organların ekstraktlarında, CA II'ye bağlanan monoklonal bir antikorun varlığını göstermişlerdir (37). Yine aynı araştırmacılar 1994 yılında yaptıkları bir çalışmada insan CA II ile PL/J ırkı fareleri immünize ederek otoimmün sialoadenitis oluşturmayı başarmışlardır (7). Daha sonraki yıllarda farklı araştırmacılar tarafından CA II immünizasyonu ile immün aracılıklı kolangitis ve pancreatitis oluşturulmuştur (38).

Bu çalışmaları takiben, polimiyosit, sistemik sikleroz, endometriyozis, otoimmün kolonjit, kronik viral hepatit, diabet gibi çeşitli hastalıklarda CA otoantikörleri belirlenmiş ve hastaların serumlarından saflaştırılmıştır (3, 4, 5, 6, 7, 8, 39). Bazı hastalıklar için bu antikörlerin güvenilir bir teşhis göstergesi olabileceği ileri sürülmüştür (40). Özellikle AIC ile antimitokondrial antijeni negatif PBC hastaların ayırımında kullanılabileceği ifade edilmiştir (41).

CA II otoantikörlerinin yukarıda bahsedilen hastalıkların patolojisindeki rolü anlaşılammıştır. Bazı araştırmacılara göre, hastalığın patolojik seyrine bağlı olarak oluşan doku harabiyetinin bir sonucu olarak CA II'ye karşı bir antikor oluşturulmaktadır. Farklı olarak bazı araştırmacılar ise, oluşan antikörlerin CA II'ye karşı oluşmadığını, ancak, moleküler taklit (molecular mimicry)'den dolayı farklı bir antijene karşı üretilmiş antikorun CA II ile çapraz reaksiyon verdiğini ve bu antijenin membrana bağlı diğer CA izoenzimleri (CA IV, IX, XII) olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Fuji ve arkadaşlarının 2007 yılında SOD geni çıkarılmış farelerde yaptıkları bir çalışmada, eritrositlerde artmış oksidatif strese bağlı olarak CA II'ye karşı antikor oluştuğunu ve bu antikor oluşumunu N-asetilsistein kullanımı ile azaldığını göstermişlerdir (14). Ancak bugüne kadar kesin bir mekanizma ortaya konulamamıştır.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. MATERYAL

##### 3.1.1 Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

**Tablo 3.** Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri.

Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler	Marka /model
Derin dondurucu	Vestel, Arçelik, Bosch
Hassas analitik terazi	Oertling NA 164
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
ELISA pleyti	Bioscience
ELISA yıkayıcısı	Diagnostics Pasteur LP 35
ELISA okuyucusu	VERSA max mikroplate reader
Etüv	Gallenkamp
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Saf su cihazı	Aguatron 4AD
Otomatik pipet, 10-100 µL	Socorex
Otomatik pipet,100-1000 µL	Socorex
Otomatik pipet,1-5 µL	Eppendorf
Otomatik pipet, 1-5 mL	Exelpette
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Santrifüj	Heraeus, Labofuge 200
Vorteks karıştırıcı	Nüve, NM 110
Soğutmalı santrifüj	Heraeus, Sepatech
Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1601
HPLC	Agilent 1100 Series
C18 Kolon	Hı-Chrom (4,6µ çaplı, 25 cm)
HPLC saf su cihazı	ELGA, Purelab UHQ
CBC cihazı	Beckman Counter, LH 750

### 3.1.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar, ürün kodları ve bazılarının saflık düzeyleri Tablo 4. da verilmiştir.

**Tablo 4.** Kullanılan kimyasal maddeler üretici firmalar ve ürün kodları

Kullanılan kimyasal maddeler	Satın alınan firma, kodu ve saflığı
Disodyum hidrojenfosfat heptahidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, A547474
Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Sigma, A6011
Süt tozu	Pınar
Sodyum bikarbonat( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck, >%99,5 (6329)
Sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	Sigma, Lot 2029A
Tween-20	Sigma, % 10, P8942
Sitrik asit ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma, C-1909, Lot 47H0808
Sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	Carlo Erba, %96 (d=1,84 g/mL) No:300057
Sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ )	Merck, >%99 (6462)
Hidroklorik asit ( $\text{HCl}$ )	Carlo Erba, %37 (d=1,25 g/mL) (7647-01-0)
Potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, 646 A-153371
Potasyum klorür ( $\text{KCl}$ )	Merck, %99-100 (711 TA299855)
Sodyum klorür	Merck, %99,5-100 (1.06400.1000)
Horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human IgG antikoru	Sigma, A-8792, Lot 103K4848
Orto-phenylene-diamine tabletleri	Sigma, P-1063, Lot 092K8205
Ksantin	Sigma, Lot 38H5007 (%99-100)
Sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ )	Riedel-de Haën, Lot 20720
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Carlo Erba, Code no:303227
Bakır (II) Klorür ( $\text{CuCl}_2$ )	Lancaster, (%98)
Nitro Blue Tetrazolium (NBT) tabletleri	Sigma-Aldrich, Lot 024K8201 N-5514
Ksantin Oksidaz (XOD)	Sigma, Lot 024K3783 X-4500
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Merck, L613080 409
Sodyum azid ( $\text{NaN}_3$ )	Sigma, Lot 52H0284 S-2002
Trolox	Fluka, 56510
1,1,3,3-Tetrametoksi propan	Sigma, Lot 76H3424, T-1642
1,1,3,3-Tetraetoksi propan	Sigma, Lot 062K0587 (%97) T-9889

### 3.2. METODLAR

#### 3.2.1. Numunelerin Toplanması

Çalışmaya, KTÜ Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Polikliniği'ne başvuran ve ACR kriterlerine göre romatoid artrit tanısı konmuş, yaş ortalaması  $49,25 \pm 12,8$  olan 7'si erkek 25'i bayan 32 hasta (hasta grubu) ve gönüllü olarak çalışmaya katılan, yaş ve cinsiyet yönünden hasta grubuyla eşleştirilmiş yaş ortalaması  $46,5 \pm 10,4$  olan 8'i erkek 24'ü bayan 32 kişi (kontrol grubu) katıldı. Çalışmaya katılan kişiler, daha önce tıp fakültesi insan etik kurulunda onaylanan 2007/82 nolu rapora uygun olarak çalışma hakkında bilgilendirildi ve aydınlatılmış onamları alındı. Sabah aç karnına biyokimya ve CBC tüplerine alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Serum ve plazmalar ayrıldı. RA tanısında kullanılan biyokimyasal parametreler ve demografik bulgular Tablo 5'te verilmiştir.

**Tablo 5.** RA tanısında kullanılan biyokimyasal parametreler ve demografik özellikler.

	Normal değer aralığı	Kontrol	Hasta
<b>N</b>	-	32	32
<b>Yaş</b>	-	$46,50 \pm 10,35$	$49,25 \pm 12,83$
<b>Cinsiyet (E/K)</b>	-	(8/24)	(7/25)
<b>ASO (U/mL)</b>	<240	*	$143,74 \pm 113,60$
<b>hsCRP (mg/dL)</b>	<0,3	*	$1,21 \pm 1,52$
<b>RF (U/mL)</b>	<19	*	$77,61 \pm 134,64$
<b>ESH (mm/saat)</b>	0-20	*	$20,22 \pm 12,89$
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	12-17	*	$12,60 \pm 1,77$

\* Ölçülmemiştir.

CBC tüplerinde plazmaları ayrılmış kanlara yaklaşık üç katı hacimde %0,9'luk NaCl eklenerek 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanarak plazma artıkları uzaklaştırıldı.

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

### 3.2.2. CA Otoantikörlerinin ELISA Yöntemiyle Tayini

Hosoda ve arkadaşları tarafından geliştirilen ELISA yöntemi bazı değişiklikler yapılarak çalışma gruplarındaki bireylerin CA I ve CA II otoantikörlerinin belirlenmesinde kullanıldı (42). Her numune için ölçümler üç kez tekrarlandı.

#### Cözeltilerin hazırlanışı

**1. Kaplama tamponu:** A çözeltisi: 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,12 g / 100ml), B çözeltisi: 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> (1,68 g/ 100ml) 8mL A çözeltisi ve 17mL B çözeltisi alındı. pH 9,6 ya ayarlanıp distile su ile hacim 100mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

**2. Birinci yıkama tamponu (PBS çözeltisi):** 0,8 g (0,14 M) NaCl, 0,02 g (2,7 mM) KCl, 0,02 g (1,5 mM) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 0,2169 g (8,1 mM) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O tartılıp bir miktar distile suda çözüldü 1N NaOH ile pH: 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**3. İkinci yıkama tamponu (Tween-20-PBS çözeltisi):** (0,14 M) 0,8 g NaCl, (2,7 mM) 0,02 g KCl, (1,5 mM) 0,02 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve (8,1mM) 0,2169 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O tartılıp bir miktar distile suda pH: 7,4'e NaOH ile ayarlandı. 50µL tween-20 eklendi. Hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

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

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



**6. Sitrat-fosfat tamponu:** 0,1 M (2,101 g) sitrik asit ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ), 0,2 M (3,12g) sodyum hidrojen fosfat ( $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ .) alınır. Distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. pH 4,8'e ayarlanır. Substrat çözeltisi hazırlamak için kullanıldı.

**7. Antikor (konjugat) çözeltisi:** Beş  $\mu$ L Horseradish peroksidaz takılı tavsan anti-human IgG antikoruna alınır ve bloklama tamponu ile 10 mL'ye tamamlanır.

**8. Substrat çözeltisi:** 10 mg orto-phenylene-diamine pH: 4,8 olan sitrat - fosfat tamponunun 25 mL'sinde çözülür. Kullanılmadan hemen önce çözeltiye 10 $\mu$ L, %30'luk hidrojen peroksit ilave edilir.

**9. 2 M sülfürik asit çözeltisi:** %98'lik  $H_2SO_4$ 'ten 10,8 mL alınıp deiyonize suyla 100 mL'ye tamamlanır. Reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

### **Deneyin Yapılışı:**

1. Kaplama tamponunda seyreltilen ve konsantrasyonu 10  $\mu$ g/mL olacak şekilde hazırlanan CA I veya CA II çözeltilerinden 50'şer  $\mu$ L ELISA pleytindeki kuyucuklara aktarıldı. 18 saat +4  $^{\circ}$ C'da inkübasyona bırakıldı (kaplama yapılırken her serum örneği için 4 kuyucuk ayrılır ve bu kuyucukların ikisi CA I veya CA II ile kaplanır, ikisi kaplanmaz. Sonuçlar değerlendirilirken kaplı olan kuyucukların absorbans değerlerinden kaplanmamış olan kuyucukların absorbans değerleri çıkartılır).

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

3. Yıkama işleminin ardından kuyucuklara 200  $\mu$ L bloklama tamponu ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.

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

5. Hasta (32 romatoid artritli) ve kontrol (32 sağlıklı birey) serumları seyreltme tamponunda 1/200 oranında seyreltildi. Her bir seyreltilmiş serum örneği 100'er µL 3'ü kaplanmış 3'ü kaplanmamış olmak üzere toplam 6 kuyucuğa pipetlendi ve 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi.

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

7. Kuyucuklara %1 süt tozu ihtiva eden seyreltme tamponuyla 1/2000 oranında seyreltilmiş antikor çözeltisinden ( horseradish peroksidaz takılı tavşan anti-human IgG antikor ) 100'er µL ilave edildi ve oda sıcaklığında 1,5 saat çalkalayıcıda bekletildi.

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

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

10. 100 µL 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bütün kuyucuklara pipetlenerek reaksiyon durduruldu. ELISA okuyucusunda 485 nm'de absorbans okundu.

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

### **3.2.3. Plazma Lipid Peroksit (MDA) Seviyesi Tayini**

Plazma Lipid peroksit seviyesi ölçümü Yagi (43) yöntemiyle yapıldı. Lipid peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit arasındaki reaksiyon sonucu

oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. TBA ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipitleri proteinle birlikte fosfotungstik asit/sülfürik asit sistemiyle çöktürüldü.

### **Cözeltilerin hazırlanışı:**

1. **0,084 N sülfürik asit:** 570 µL %98'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bir miktar su içeren balon jojeye pipetlenip hacim 250 mL'ye tamamlandı.

2. **%10'luk fosfotungstik asit:** 0.5 g H<sub>3</sub>(W<sub>3</sub>O<sub>10</sub>)<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O 4,5 mL deiyonize suda çözüldü.

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

4. **Standart çözeltileri:** 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 nmol (1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP)) /mL: 164,7 µL TMP 0,01 M HCl ile 100 mL'ye tamamlandı ve 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu 10 mM'lık stok çözeltilerden 10 µL alınıp 10 mL'ye deiyonize suyla tamamlanarak hazırlanan 10 µM'lık standarttan seri dilüsyonlar yaparak standart çözeltiler hazırlandı.

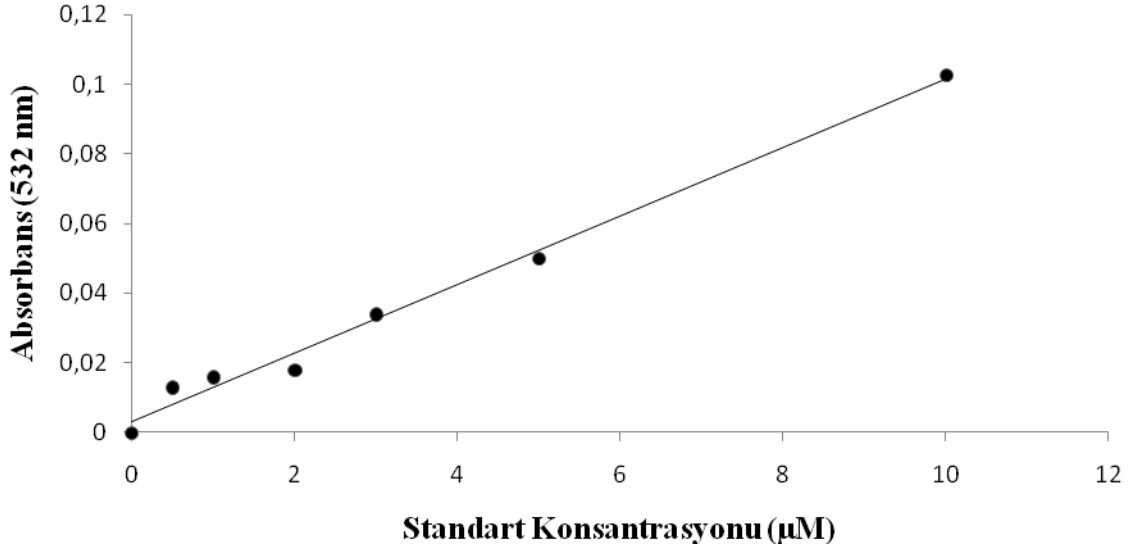
**Deneyin yapılışı:** Tablo 6'da ifade edildiği gibi pipetlemeler ve işlemler yapıldı.

**Tablo 6.** Plazma MDA seviyesi ölçümü için reaksiyon karışımı.

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

Tüpler vortekslenip n-bütanol karışımı sağlandıktan sonra 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. n-bütanol fazı ayrıldı ve 532 nm'de n-bütanol'e karşı absorbanslar spektrometrede okundu.

Sonuçlar MDA için hazırlanan Şekil 1'deki standart grafiğinden yararlanarak hesaplandı.



Şekil 1. Plazma MDA seviyesi ölçümü için standart grafiği

### 3.2.4.Eritrosit MDA Tayini

Eritrosit MDA ölçümü Young ve Trimble'ın (44) metodu modifiye edilerek gerçekleştirildi. Metod, lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA)' in tiyobarbitürik asitle ısıtılmasıyla oluşan kompleksin 536 nm de uyarılması ve 555 nm'de yaydığı ışığın HPLC de floresan detektörle ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

#### Cözeltilerin hazırlanışı:

1. % 0,2'lik Bütillenmiş Hidroksi Toluen (BHT): 0,02 g BHT 10 mL saf etil alkolde çözüldü.

2. **0,46 M Fosforik asit:** % 85'lik fosforik asitten 1.551 mL alınıp 50 mL'ye tamamlandı.

3. **% 0,6'lık Tiyobarbitürik asit:** 0,3 g TBA 50 mL % 50'lik asetik asit çözeltinde ısıtılarak çözüldü.

4. **1 M sodyum hidroksit çözeltisi:** 4 g NaOH 100 mL deiyonize suda çözüldü.

5. **25 mM fosfat tamponu:** 2,9368 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0,5958 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 L HPLC saflığında suda çözüldü. pH'sı 6,4'e ayarlandı.

**Deneyin yapılışı:** Tablo 7'da gösterildiği gibi pipetlemeler ve işlemler yapılır.

**Tablo 7.** Eritrosit MDA seviyesi ölçümü için reaksiyon karışımı.

	Numune ( $\mu\text{L}$ )	Standart ( $\mu\text{L}$ )
Numune	100	-
Standart	-	100
% 0,2'lik BHT	10	10
Fosforik asit	600	600
Vortekslendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.		
%0,6'lık TBA	200	200
Vortekslendi. 90 <sup>0</sup> C'de su banyosunda 30 dakika ısıtıldı.		
Numune	400	-
Standart	-	400
Metanol	720	720
NaOH	80	80
5 dakika 18000g'de mikrofüjde santrifüjlendi ve süpernatant alındı.		

Süpernatant viallere aktarılıp HPLC'de C18 kolonda aşağıdaki ayarlamalar yapılarak florometrik olarak MDA tayin edildi.

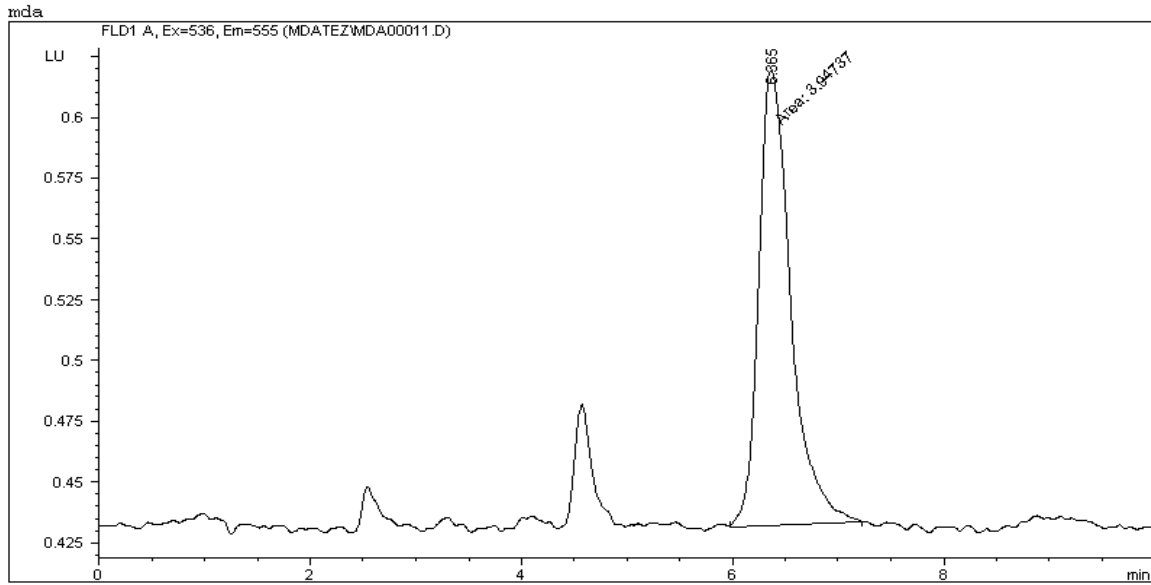
Akış hızı: 1 mL/dak

Enjeksiyon : 40  $\mu\text{L}$

Mobil Faz: Tampon:metanol (65:35)

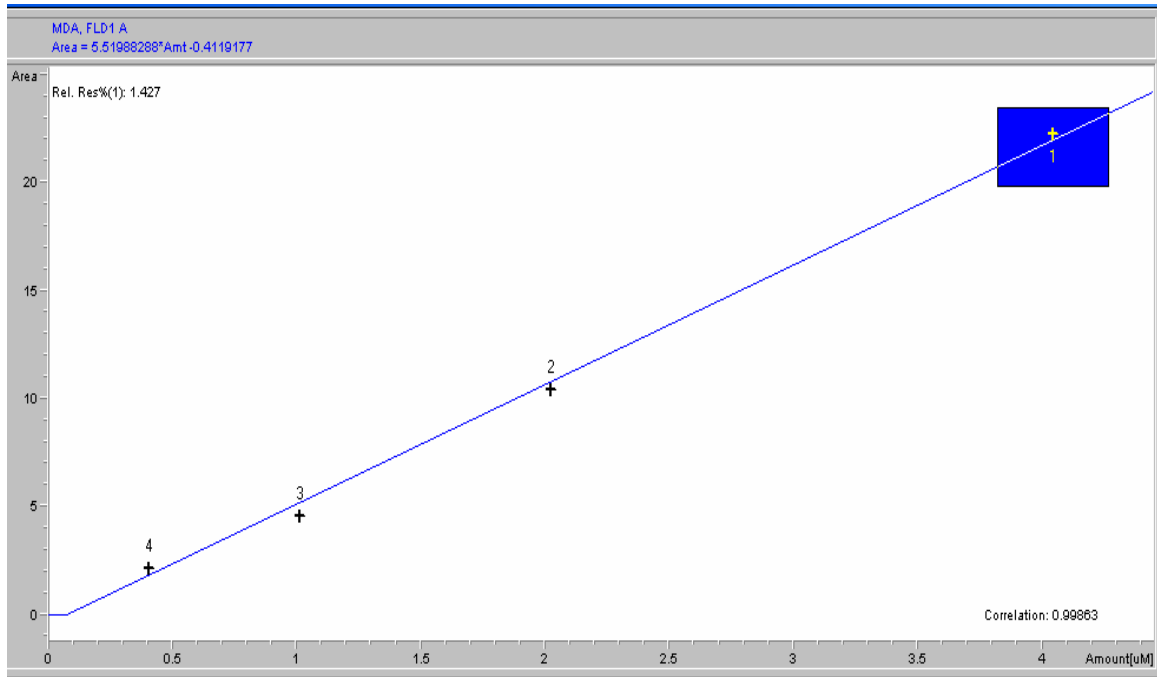
Sıcaklık : 45 <sup>0</sup>C

Detektör: Floresan detektör (Ex:536, Em:555)



**Şekil 2.** Eritrosit MDA düzeyi ölçümü için HPLC kromatogramı.

Yaklaşık 6,9'uncu dakikada elde edilen Şekil 2 görülen pik MDA ya aittir. Hazırlanan standartlara göre oluşturulan standart grafiğinden yararlanılarak numunelerin konsantrasyonları hesaplandı (Şekil 3). Sonuçlar hemoglobin değerlerine bölünerek  $\mu\text{M/g}$  Hb olarak ifade edildi.



**Şekil 3.** Eritrosit MDA seviyesi ölçümü için standart grafiği.

### 3.2.5.Eritrosit Antioksidan Enzimler

Deneylere başlamadan önce hasta ve kontrol gruplarındaki bireylere ait eritrosit paketlerindeki hemogloblin değerleri ölçüldü.

#### 3.2.5.1.Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini:

Süperoksit dismutaz aktivitesinin tayini, Sun ve Oberley'in (45) metoduna göre yapıldı. Bu metod, Ksantin-ksantin oksidaz sisteminin oluşturduğu süperoksit radikallerinin nitro blue tetrazoliumu (NBT) indirgeyerek oluşturduğu mavi-mor rengin 560 nm de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Eritrositlerdeki SOD'un ortamdaki süperoksit radikallerini uzaklaştırması sonucu optik dansitede meydana gelen azalmadan yararlanılarak SOD tarafından katalizlenen reaksiyonun % inhibisyonu hesaplandı. % 50 inhibisyona karşı gelen SOD miktarı bir enzim ünitesi olarak alındı.

#### Cözeltilerin hazırlanışı:

1. **0.3 mmol/L ksantin çözeltisi:** 0.0456 g ksantin 1 L deiyonize suda çözüldü.
2. **0.6 mmol/L EDTA çözeltisi:** 0,056 g EDTA mL deiyonize suda çözüldü.
3. **150 µL NBT çözeltisi:** 1,2265 mg NBT 10 mL deiyonize suda çözüldü. NBT günlük taze hazırlandı.
4. **400 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi:** 2,12 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mL deiyonize suda çözüldü.
5. **1g/L BSA:** 100 mL deiyonize suda 0,1 g BSA çözüldü.
6. **167 U/L ksantin oksidaz çözeltisi:** 27,3 U/mL'lik orijinal şişeden 12,2 µL alınıp 2 mL ye tamamlandı. Ksantin oksidaz günlük hazırlandı.
7. **0.8 mmol/L CuCl<sub>2</sub> çözeltisi:** 0,027 g CuCl<sub>2</sub> 250 mL deiyonize suda çözüldü. Günlük taze hazırlandı.

**8. 2 mol/L amonyum sülfat:** 13,2 g amonyum sülfat deiyonize suda çözüldü.

**9. Reaksiyon karışımı:** 80 tüp için; 80 mL 0,3 mM ksantin çözeltisi, 40 mL 0,6 mM EDTA çözeltisi, 40 mL 150 µM NBT çözeltisi, 24 mL 400 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi, 12 mL 1g/L BSA karıştırıldı.

**Deneyin yapılışı:** Tablo 8’de ifade edildiği gibi pipetlemeler ve işlemler yapıldı.

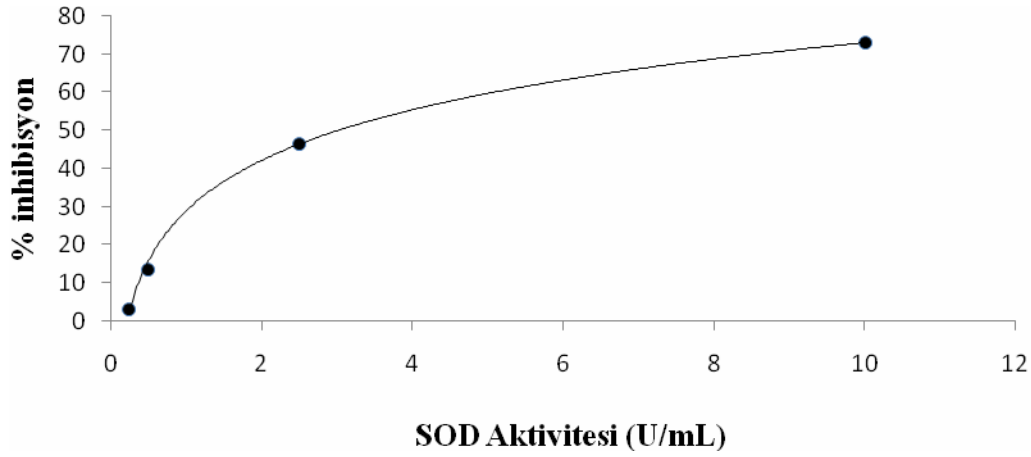
**Tablo 8.** SOD aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı.

Çözeltiler	mL
Reaksiyon karışımı	2.45
Numune	0.5
Ksantin oksidaz	0.05
25 <sup>0</sup> C da 20 dakika inkübasyona bırakıldı (karanlıkta).	
Bakır klorür	1.0
560 nm’de absorbans ölçüldü.	

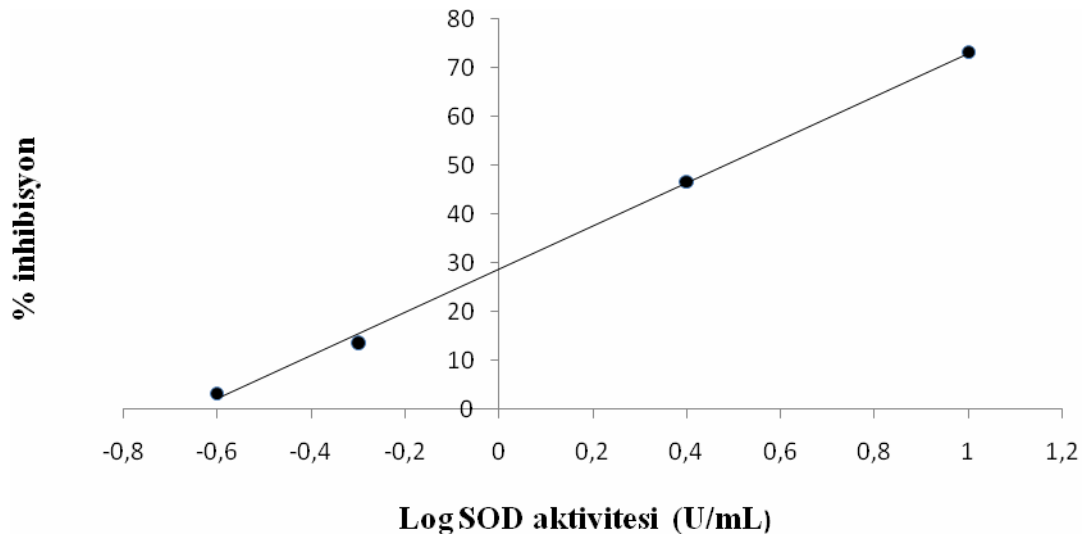
Hesaplamalar % inhibisyon olarak hesaplandı. Şekil 4’teki standart grafiği SOD aktivitesinin logaritması alınarak Şekil 5’teki lineer standart grafiğine dönüştürüldü. Bu standart grafiğinden yararlanılarak % inhibisyonlar SOD aktivitesine dönüştürüldü. Sonuçlar hemoglobin miktarına bölünerek U/g Hb olarak hesaplandı.

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





Şekil 4. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği.



Şekil 5. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği.

### 3.2.5.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini

Hidrojen peroksidin oksijen ve suya hidrolizini katalizleyen katalaz aktivitesinin tayininde Aebi'nin (32) metodu kullanıldı.

240 nm'de  $H_2O_2$ 'nin bozulması sonucu absorbanstaki düşüş takip edildi.

### Cözeltilerin hazırlanması

1. **50 mM fosfat tamponu (pH:7,06):** 81 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1L ve 8,90 g  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1L deiyonize suda çözüldü. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı. Gerekliğinde asit veya baz ilavesiyle pH 7,0'a ayarlandı.

2. **30 mM hidrojen peroksit:** 0,34 mL %30'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$  alınarak fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı. Günlük hazırlandı.

**Deneyin yapılışı:** Paket eritrositler Hb konsantrasyonu 5g/dL olacak şekilde seyreltilerek hemolizatlar hazırlandı. Ve Tablo 9'de ifade edildiği gibi pipetlemeler yapıldı.

**Tablo 9.** Katalaz aktivitesi ölçümü için reaksiyon karışımı.

	Kör(mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	1.00	--
Numune	2.00	2.00
$\text{H}_2\text{O}_2$	--	1.00

Hidrojen peroksit ilave edilir edilmez 30 s boyunca 240 nm'de absorbanslardaki düşüş izlendi.

Katalaz aktivitesinde birim olarak birinci derece reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. 15 s'lik zaman aralığı için aşağıdaki formülden yararlanılarak aktivite hesaplandı (32).

$$k = 0,153 \times \log \frac{A1}{A2} \text{ s}^{-1} \times g \text{ Hb}$$

A1=Başlangıç Absorbansı

A2=15 s sonraki absorbans

Seyreltme faktörü ile çarpıldı. Eritrositlerde gram Hb başına aktivite hesabı yapıldı (k / g Hb).

### 3.2.6.Total Antioksidan Seviyesi (TAS) Tayini

Hasta ve kontrol gruplarına ait serumlardaki total antioksidan durum EREL (46) metoduna göre hazır ticari kit (Abbot) kullanılarak yapıldı. Bu metod,  $Fe^{2+}$ -*O*-dianisidin kompleksinin hidrojen peroksitle verdiği fenton reaksiyonuyla oluşan hidroksil radikalının indirgenmiş renksiz *o*-dianisidin molekülünü oksitlemesiyle oluşan sarı-kahve renkli dianisidilin absorbandsınının 444 nm de ölçülmesi esasına dayanır. Standart olarak E Vitamini türevi olan Trolox kullanıldı.

#### **Standartların Hazırlanışı:**

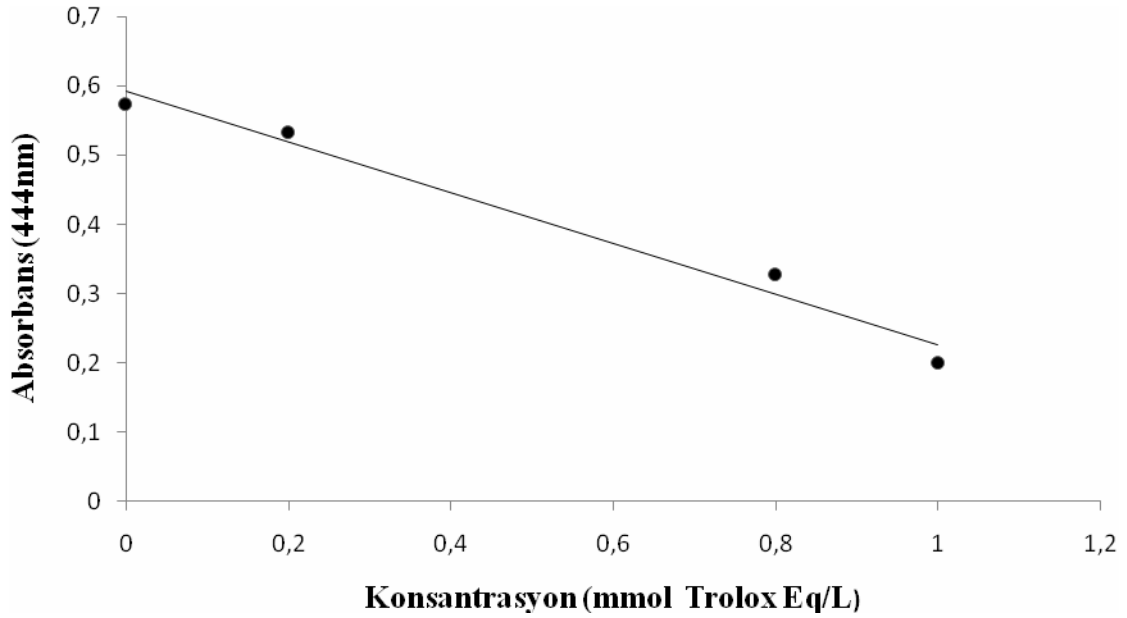
0,0025 g Trolox 10 mL etanolde çözüldü. Elde edilen 1mM'lık çözeltilerden seri dilüsyonlar yapılarak 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 mmol Trolox Eq/ L'lik standartlar hazırlandı.

**Deneyin yapılışı:** Tablo 10'da ifade edildiği gibi pipetlemeler ve işlemler yapıldı.

**Tablo 10.** Serum TAS ölçümü için reaksiyon karışımı.

	Numune( $\mu$ L)	Standart ( $\mu$ L)	Kör( $\mu$ L)
<b>Numune</b>	5	-	-
<b>Standart</b>	-	5	-
<b>Kör</b>	-	-	5
<b>Reaktif 1</b>	200	200	200
444 nm'de absorbands ölçümü yapıldı ( $A_1$ ).			
<b>Reaktif 2</b>	10	10	10
3-4 dakika inkübasyona bırakılır. 444 nm'de absorbands ELISA okuyucusunda ölçümü yapıldı ( $A_2$ ).			

$\Delta A = A_2 - A_1$  hesaplandı. Şekil 6'daki standart grafiğinden yararlanılarak numunelerdeki TAS belirlendi



Şekil 6. TAS ölçümü için standart grafiği.

### 3.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

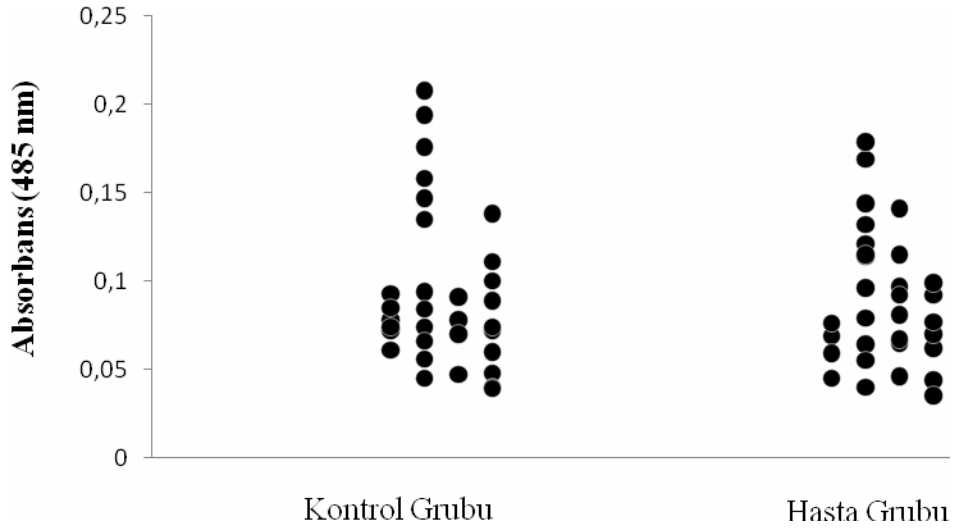
Hasta ve kontrol gruplarının ortalamaları ( $\bar{X}$ ) ve standart sapmaları (SD) hesaplandı. Normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. Grup ortalamalarının karşılaştırılmasında normal dağılıma uyan verilerde Studen-t testi kullanıldı. Parametreler arasındaki ilişkinin incelenmesinde Pearson ve Spearman korelasyon testi kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. ELISA Sonuçları

#### 4.1.1 CA I Otoantikorları İçin ELISA Sonuçları

ELISA metodu ile romatoid artritli 32 hasta ve sağlıklı 32 bireye ait serumlarda CA I otoantikorlarının düzeylerine bakıldı. Hasta grubunda CA I otoantikor düzeyi  $0,086 \pm 0,037$ , kontrol grubunda  $0,092 \pm 0,044$  olarak bulundu (Şekil 7). Gruplar arasında istatistiksel bir fark gözlenmedi.

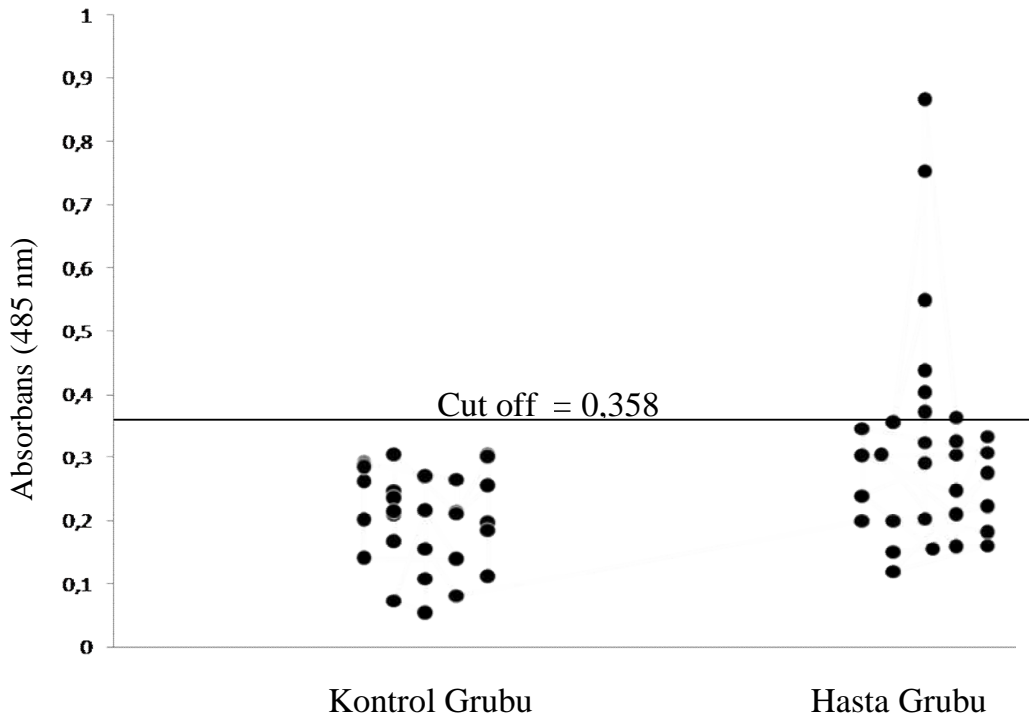


Şekil 7. CA I otoantikorları için ELISA sonuçları.

#### 4.1.2 CA II Otoantikorları İçin ELISA Sonuçları

RA hastalarda ve sağlıklı bireylerden elde edilen absorbans değerleri Şekil 8'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda CA II otoantikor titrelerinin ortalaması  $0,212 \pm 0,073$  olarak bulundu. Bu ortalama absorbans değerinin 2 SD üstü olan 0,358'den

büyük absorbansa (cut off değeri) sahip bireyler CA II otoantikoru yönünden pozitif olarak kabul edildi. Hasta grubunun ortalama CA II otoantikor titresi  $0,308 \pm 0,028$  olarak bulundu. Bu değer kontrol grubunun ortalamasından anlamlı seviyede yüksek bulundu ( $p < 0,05$ ). Serumlarında CA II otoantikoru içeren RA'lı 32 hastanın 7 tanesinde pozitif sonuç bulundu (% 21,9). Kontrol grubuna ait bireylerin serumlarında ise pozitif sonuç bulunamadı.

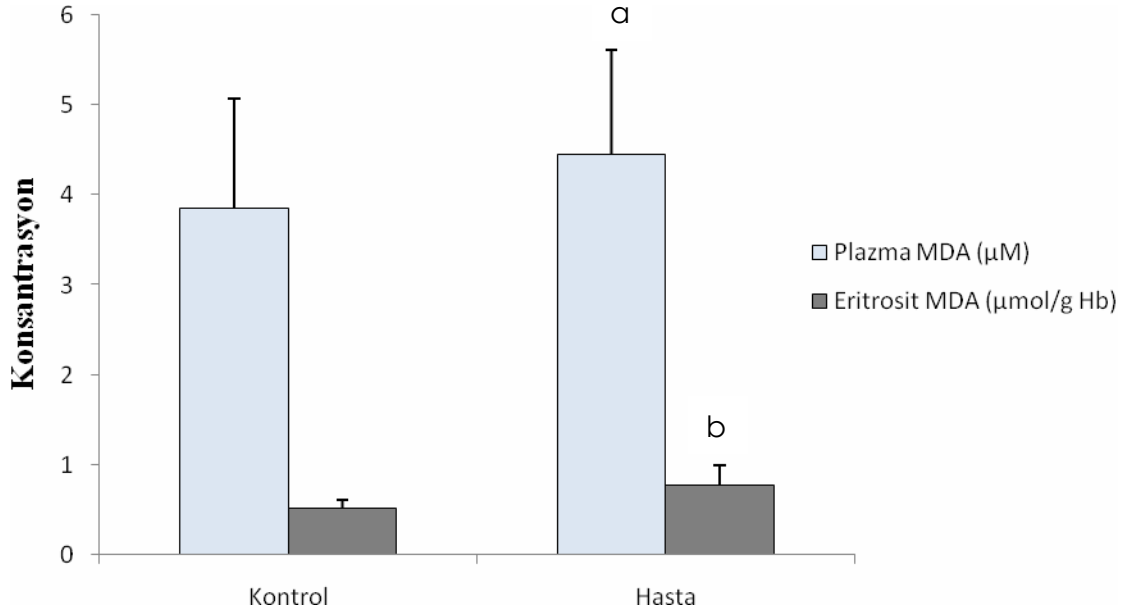


**Şekil 8.** CA II otoantikorları için ELISA sonuçları.

#### 4.2. MDA ölçümü sonuçları

Plazma ve eritrositlerde yapılan MDA ölçümleri sonucunda, RA hastalarının ortalama plazma MDA seviyesi  $4,46 \pm 1,16 \mu\text{M}$ , kontrol grubunun ortalaması da  $3,85 \pm 1,22 \mu\text{M}$  olarak bulundu. Yine hasta grubunun eritrositlerinde ortalama MDA seviyesi  $0,77 \pm 0,23 \mu\text{mol/g Hb}$ , kontrol grubunda ise  $0,52 \pm 0,09 \mu\text{mol/g Hb}$  olarak belirlendi. RA'lı hastalarda hem plazma MDA hem de eritrosit MDA

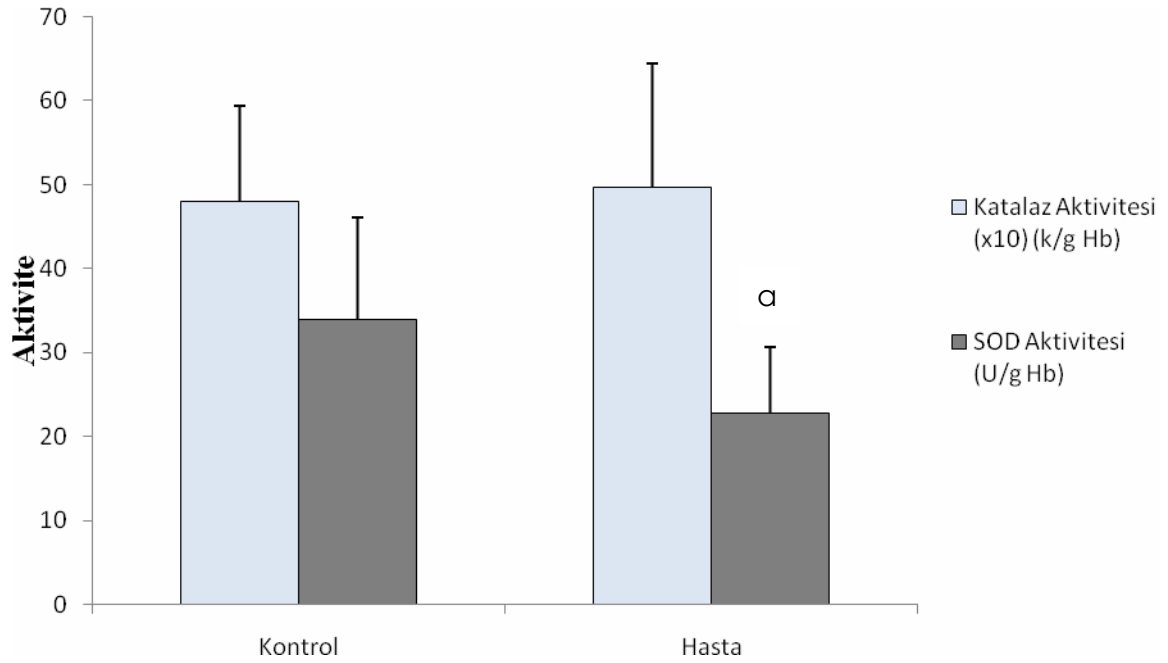
seviyeleri ortalaması kontrol grubuna göre Şekil 9'da görülebileceği gibi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu.



**Şekil 9.** Plazma ve eritrosit MDA seviyeleri. a: Hasta grubunun ortalama değeri kontrolden  $p < 0,05$  düzeyinde farklıdır. b: Hasta grubunun ortalama değeri kontrolden  $p < 0,001$  düzeyinde farklıdır.

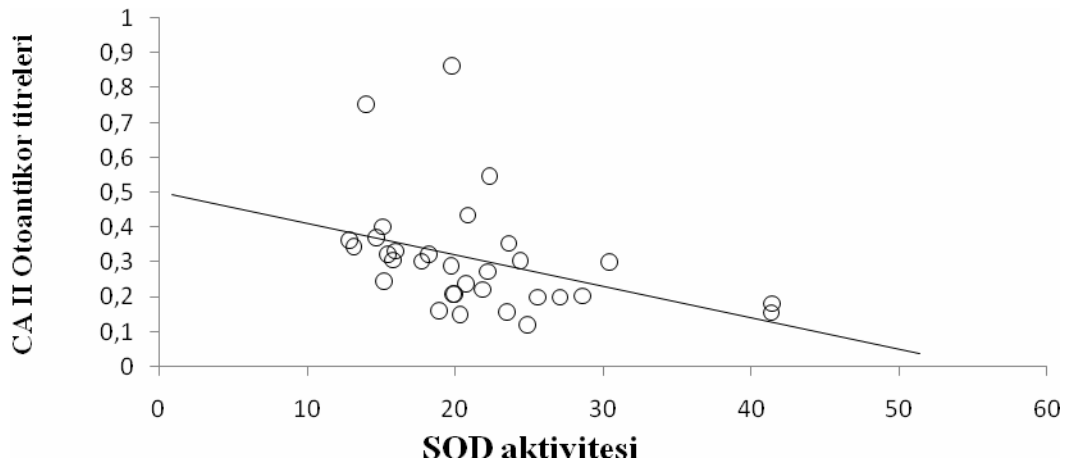
#### 4.4. Eritrosit Antioksidan Enzimleri Ölçüm Sonuçları

Eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri ölçümleri sonucunda, SOD aktivitesi hasta grubunda  $22,84 \pm 7,7$  U/g Hb, kontrol grubunda  $33,96 \pm 12,2$  U/g Hb, katalaz aktivitesi ise hasta grubunda  $496,16 \pm 149,5$  k/g Hb, kontrol grubunda  $479,67 \pm 115,5$  k/g Hb olarak bulundu. Grup ortalamaları karşılaştırıldığında SOD ortalamasının RA'lı hastalarda anlamlı seviyede düşük olduğu ( $p < 0,05$ ), CAT aktivitesi yönünden ise herhangi bir farkın olmadığı belirlendi (Şekil 10).



**Şekil 10.** Eritrosit antioksidan enzim (SOD, CAT) aktivite seviyeleri.  
a: Hasta grubunun ortalama değeri kontrolden  $p < 0,05$  düzeyinde farklıdır.

Hasta grubunda CA II otoantikör titreleri ile SOD değerleri arasında negatif bir ilişki ( $r = -0,376$ ,  $p = 0,031$ ) gözlemlendi (Şekil 11).

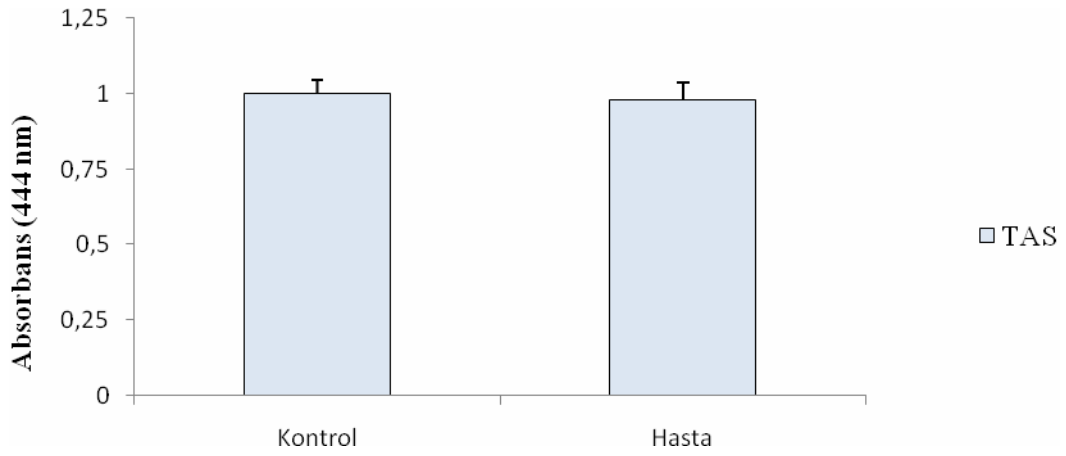


**Şekil 11.** SOD aktivitesi ile CA II otoantikör titreleri arasındaki korelasyon grafiği.



#### 4.5. TAS sonuçları

TAS ölçümleri sonucunda, RA'lı hastalarda TAS seviyesini  $1 \pm 0,045$  mM Trolox Equivalent, kontrol grubunda ise  $0,98 \pm 0,054$  mM Trolox equivalent olarak bulduk. Grup ortalamaları karşılaştırıldığında, Şekil 12'de görülebileceği gibi hasta grubunda TAS seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı seviyede düşük olduğu belirlendi.



**Şekil 12.** Serum TAS seviyeleri. Hasta grubunun ortalama değeri kontrolden ( $p < 0,05$ ) düzeyinde farklıdır.

## 5. TARTIŞMA

Romatoid artrit, periferik eklemlerde nonspesifik ve genellikle simetrik inflamasyon şeklinde kendini gösteren; eklemlerde ve eklem çevresindeki oluşumlarda ilerleyici harabiyetle sonuçlanma olasılığı yüksek olan, kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Toplumda prevalansı %1-3 ve kadın/erkek oranı 3/1dir. Kadınlarda 3 kat fazla görülmesi ve sıklıkla menarştan sonra menapozdan önce görülmesi, hamilelik esnasında artması hormonal faktörlerin önemli olduğunu göstermektedir (gürbüz). Bunun yanında genetik faktörler de önemlidir. RF pozitif olan hastalarda % 60-70 oranında HLA-DR4 geni bulunmuştur (26). İnfeksiyöz ajanlar da etiyolojide rol oynamaktadır. Buna rağmen RA'lıların sinovial sıvısında herhangi bir infeksiyöz ajan partikülü tesbit edilememiştir. Fakat *Proteus vulgaris*'in yüzey antijeni ile HLA-DR4 arasında çapraz reaksiyon geliştiği bilinmektedir. Hastaların eklem sıvısındaki B lenfositleri tarafından salgılanan anormal IgG ve bunlara karşı oluşan romatoid faktörler ki bunlar IgG'ye karşı oluşmuş IgM'dir, birleşerek immün kompleksler oluşturmaktadır (3). Bu immün kompleksler klasik ve alternatif yoldan komplemanı aktive ederek inflamasyonu başlatmaktadır. Eklem sıvısında oluşan immün kompleksler bir miktar kanda da oluştuğu için vaskülitlere ve SLE benzeri semptomlara neden olmaktadır. SLE'den farklı olarak immün kompleksler çok nadiren nefrite yol açar (47).

RA'nın kesin patolojisi bilinmemekle beraber, ROS'un patolojide etkili olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (48, 49, 50). ROS normal olarak tüm hücre ve dokularda oksidatif işlemler sırasında düşük miktarda üretilmektedir. Özellikle inflamasyon bölgelerinde nötrofil ve makrofajlardan kaynaklanan ciddi ROS üretimi gerçekleşmektedir. Bu ürünler membranlardan kolayca diffüze olarak kana, bazen de uzak organlara etki etmektedirler. Kan dolaşımında bulunun eritrositler oluşan bu ürünleri sahip oldukları SOD, CAT ve GSH-Px bağımlı mekanizmalar ile

temizlemektedirler (31). Ancak, bu mekanizmalardaki bozukluklar hücre içindeki antioksidan-oksidan dengenin oksidanlar lehine bozulmasına ve lipid ve proteinlerde hasara sebep olmaktadır (48, 51). Memeli eritrositleri çekirdek bulundurmadıkları için protein sentezleyememekte dolayısıyla hasar görmüş proteinlerini yenileyememektedirler. Ayrıca, bir çok doku SOD'un iki isoformuna sahipken, eritrositlerde sadece SOD1 bulunur (14). Bu durum, eritrositleri oksidatif hasara çok daha yatkın hale getirmektedir. Çalışmamızda hem eritrosit hem de plazma MDA seviyeleri RA'lı hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca, serum TAS seviyeleri de RA'lı hastalarda daha düşük olarak gözlenmiştir. Benzer sonuçlar daha önceki yıllarda birçok araştırmacı tarafından yayımlanmıştır (52, 53). Bu sonuçlar RA'lı hastalarda oksidatif hasarın artışının bir göstergesidir. Eritrositlerde yaptığımız antioksidan enzim aktivitesi ölçümleri sonucunda SOD aktivitesi RA hastalarında kontrole göre daha düşük bulunmuştur. Seven ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınlanan bir çalışmada, yukarıda bahsettiğimiz gibi serum MDA seviyeleri RA'lı hastalarda kontrollere göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca, eritrosit SOD seviyeleri de hastalarda düşük olarak gözlenmiştir (51). Ancak, CAT aktivitesi yönünden gruplar arasında bir farklılık bulunamamıştır. SOD endojen olarak oluşturulan  $O_2^-$  yi  $H_2O_2$  ye dönüştüren ve oksiradikallere karşı primer koruyuculuğu sağlayan enzimdir ve ürünü olan  $H_2O_2$  tarafından inhibe edilmektedir (27, 54). Aktivitesindeki düşüklüğün sonucu olarak eritrositlerdeki oksidatif hasar artmıştır. Eritrosit KAT aktivitesi yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Katalaz SOD tarafından üretilen  $H_2O_2$  yi suya dönüştüren bir enzimdir. CAT  $H_2O_2$  için Km değeri yüksek olan bir enzimdir ancak  $H_2O_2$  seviyeleri yükseldiği zaman aktivitesini göstermektedir (54). Eritrositlerde bulunan GSH-Px,  $H_2O_2$  için küçük Km değerine sahiptir (31). RA'lılarda  $H_2O_2$ 'nin detoksifikasyonunda bu enzimin daha önemli olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Farklı bir yaklaşım olarak, Mansour ve arkadaşları yaptıkları çalışmada RA'lı hastalarda SOD ve CAT enzimlerine karşı antikor geliştiğini ve hastalıkta gözlenen enzim aktivitesindeki düşüşlerin bu antikorların varlığına bağlı olarak gerçekleşen inhibisyon kaynaklandığını bildirmişlerdir (55).

RA'nın erken tanısı bu hastalığın tedavisinde kullanılan antiromatizmal ilaçların etkinliğini artırmakta ve eklem hasarının şiddetini azaltmaktadır. Bu yüzden hastalığın erken tanısı tedavinin başarısı yönünden oldukça önemlidir. Hastaların serumundaki otoantikolar hastalık belirtileri vermeden yıllar önce tespit edilebilmektedir. Bu yüzden, otoantikolar RA gelişimini önceden tahmin etmek için önemli belirteçler olarak ortaya çıkmaktadır (51). Şimdiye kadar Romatoid faktör (RF), sitrulinlenmiş peptidlere karşı oluşmuş antikolar diğerlerinden daha sensitif ve spesifik bulunmuştur. RA tanısında kullanılacak hedef proteinlere karşı gelişmiş otoantikoların belirlenmesi çalışmaları halen devam etmektedir (56). Çalışmamızda birçok romatoid hastalıklarda tespit edilen CA II antikoları varlığını RA hastalarında araştırılmıştır. Yaptığımız ELISA ölçümleri ile 32 RA'lı hastanın 7 tanesinde (%21,9) CA II otoantikoları pozitif bulunmuştur. RA'lı hastalarda Fabien ve ark. yaptıkları bir çalışmada CA III otoantikolarını %16,7 oranında pozitif bulmuşlardır (57). CA II otoantikolarını sadece CA III pozitif hastalarda taramışlar ve pozitif sonuç bulamamışlardır. Ancak, SLE'li hastalarda her iki otoantikorida pozitif bulmuşlardır (51). Bölümümüzde 2005 yılında yapılan bir çalışmada RA'lı hastaların yaklaşık % 50 sinde CA II otoantikoları pozitif bulunmuştur (58). Bu farklılık hastalığın şiddeti ile ilgili olabilir. Hastalarda ölçülen RF değerleri ile CA II otoantikor titreleri arasında pozitif bir ilişki gözlenmiştir. Tillemann ve ark. RA'lı hastaların sinovyalılarında 2-D elektroforez ve kütle spektroskopisi kullanarak yaptıkları çalışmada CA I 'in hedef bir otoantijen olabileceğini bildirmişlerdir (59). Ancak, bu çalışmada hasta grubunda bu proteine karşı herhangi bir immün cevap tespit edilememiştir. Daha önce yapılmış çalışmalarda CA II den bağımsız olarak CA I karşı oluşmuş otoantikolara sadece SLE hastalarında rastlanmıştır. Diğer hastalıklarda CA I otoantikoları ile CA II otoantikoları çok büyük ölçüde aynı kişilerde pozitif olarak bulunmuş ve bu durum çapraz aktiviteye bağlanmıştır (11). CA memelilerde oldukça geniş doku dağılımına sahip bir metalloenzimdir. Fizyolojik rolü CO<sub>2</sub> hidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizlemektir. Bu reaksiyon ve ürünleri aracılığıyla vücutta asit-baz dengesinin sağlanması, değişik enzimatik reaksiyonlar için gerekli bikarbonatın oluşturulması, kardiyovasküler tonusun regülasyonu ve hücre bölümleri arasındaki iyon

değişiminin kontrolü gibi çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal olay gerçekleştirilmektedir. Birçok otoimmün ve idiyopatik hastalıkta CA I ve CA II'ye karşı gelişmiş antikorlar gösterilmiştir (5, 8, 10, 11, 12, 13, 56, 60) . Deney hayvanlarına CA II nin immunizasyonu ile deneysel sialoadenitis, pankreatit ve kolanjitis oluşturulmuştur (7). CA II otoantikorlarının otoimmün hastalıkların patolojisindeki kesin rolü bilinmemektedir. Enfeksiyonlar otoimmüitenin tetiklenmesinde önemli çevresel faktörlerdir. Virüsler veya diğer mikrobiyal ajanların sebep olduğu doku yıkımlarına bağlı olarak spesifik enzimlere karşı moleküler taklit, çapraz bağlanmalar, otoreaktif T hücrelerinin aktivasyonu ve adjuvant etkisi gibi mekanizmalarla antikor oluşturulduğu bilinmektedir (37). Benzer mekanizmalarla romatoid artritli hastalarda CA II'ye karşı antikor oluşmuş olabilir. Yapılan çalışmalar CA II otoantikorlarının oluşumunda genetik faktörlerin de belirleyici olabileceğini göstermiştir. Uneo ve arkadaşları PBC'li hastalarda yaptıkları çalışmada, CA II otoantikoru pozitif olan hastalardaki HLA (Human Leucocyte Antigen) tiplerinin diğer PBC'li hastalardan farklı olduğunu göstermiştir. PBC'li hastalar genelde HLA DR3 geni ile ilişkili iken, CA II antikoru pozitif PBC'li hastalar HLA B51 geni ile ilişkili bulunmuştur (61). Tip 1 diabetli Japon hastalarda yapılan bir çalışmada HLA DR1B nin hastalıkla ve CA II otoantikorları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (62). Yine Tip 1 diabetli hastalarda yapılan çalışmalarda, ırklar arasında CA II otoantikorların prevalansı farklı bulunmuştur (63). Romatoid artrit ile HLA DR4 geni arasında çok sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Yukarıda bahsedildiği gibi bölümümüzde daha önceden yapılmış bir çalışmada hastalarda %50 gibi yüksek bir değerde CA II otoantikorlarının gözlenmesinde HLA tiplerinin de katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Fuji ve arkadaşları Cu/Zn SOD geni çıkarılmış farelerde yaptıkları çalışmada anemi ve CA II ye karşı antikor oluşumunu gözlemlemişlerdir. Yine aynı çalışmada bir antioksidan madde (N-acetylcysteine) uygulanması ile aneminin düzeldiği ve antikor oluşumunun baskılandığı bildirilmiştir. Eritrosit içinde artan oksidatif stres lipid peroksidasyonunu artırmakta ve oluşan son ürünler bazı proteinlere kovalent

olarak bağlanmaktadır (14). Uchida ve arkadaşları 1997 yılında eritrositler üzerinde yaptığı bir çalışmada membran lipidlerinin peroksidasyonu ile oluşan 4-hidroxy-2-nonenal'ın (HNE) CA II'ye enzimatik olmayan bir yolla kovalent olarak bağlandığını göstermiştir. Ancak bu bağlanma ile CA aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir (64). Aynı grup, 2007 yılında yaptıkları başka bir çalışmada HNE ile modifiye olmuş proteinlerin anti-DNA antikörlerinin endojen kaynağı olduğunu göstermişlerdir (65). CA II'nin en bol bulunduğu dokuların başında eritrositler gelmektedir. Yapılan birçok çalışmada ve bu çalışmada RA'lı hastaların eritrositlerde oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulduğu gösterilmiştir. Buna bağlı olarak CA II yapısında meydana gelebilecek modifikasyonlar CA II'yi antijenik hale getirebilir. Nitekim RA grubunda Cu/Zn SOD aktivitesi ve CA II otoantikörleri ile negatif ilişki bulunmuştur. SOD geni çıkarılmış farelerde de gözleendiği gibi RA'lı hastalarda da eritrosit ömrü kısalmıştır. Retikuloendotelial sistem tarafından yıkılan ve dolaşımında parçalan eritrositlerden açığa çıkan modifiye CA II'ler CD4+ T hücreleri tarafından B lenfositlere sunularak antikor oluşumuna sebep olmuş olabilirler. T hücreleri okside olmuş proteinlerine karşı tolerans göstermemektedir. İmmün sistem çocukluk döneminde gelişmekte ve bu dönemde okside yapıların az olması sebebiyle T hücreleri tarafından kendi antijeni olarak tanınmamaktadır (14).

Ono ve arkadaşları kalsifikasyon ve renal tubüler asidoz gibi kalıtsal CA eksikliği sendromunda görülen belirtilerin, CA II otoantikoru pozitif olan hastalarda da gözleendiğini ifade etmişlerdir (66). Hastalardan saflaştırılan anti-CA II antikörlerinin enzimin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyona neden oldukları da gösterilmiştir (60). CA II kemik dokusunda, kemik yapım ve yıkımında önemli bir enzimdir. Özellikle bu dokuda pH regülasyonu  $Ca^{2+}$  çözünmesi ve çökmesi yönünden oldukça önemlidir. Ayrıca damarlanması zayıf olan kıkırdak büyüme plağında  $CO_2$  taşınması ve alkali pH'nın sağlanmasında CA'nın rolü olduğu gösterilmiştir (67). Karaciğer epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada IgG, IgA ve IgM moleküllerinin reseptör aracılıklı transsitozis ile hücre membranlarını geçerek

doku hasarı oluşturdukları gösterilmiştir (68). Benzer şekilde romatoid artritli hastalarda kemik turnoverında oldukça önemli bir enzim olan CA II'ye karşı oluşmuş antikörler hücre içinde CA II'yi inhibe ederek eklem ve eklem çevresi dokularında zarara sebep olabilmektedir.

Sonuç olarak, RA'lı hastalarda oksidan-antioksidan dengenin bozulmakta ve buna bağlı olarak eritrositlerde oksidatif stres artmaktadır. Bunun sonucunda artan lipid peroksidasyon rnlerinin CA II'yi antijenik hale getirerek otoantikör oluşumunu tetiklediği kanısına varıldı.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 6.1. Sonuçlar

Romatoid artritli hastalarda;

1. CA II otoantikor düzeyi kontrol grubundan yüksek bulundu ( $p<0,05$ ). 32 kişilik hasta grubunun 7'sinde pozitif sonuç elde edildi (%21,9). Fakat CA I otoantikor düzeyinde anlamlı bir fark bulunamadı.

2. Antioksidan enzimler incelendiğinde SOD aktivitesinde azalma olduğu ( $p<0,05$ ) fakat CAT aktivitesinde herhangi bir farkın olmadığı belirlendi ( $p>0,05$ ). Ayrıca SOD aktivitesi ile CA II otoantikor titreleri arasında negatif ilişki ( $r= -0,376$ ,  $p= 0,031$ ) belirlendi.

3. Total antioksidan seviyede azalma olduğu belirlendi ( $p<0,05$ ). Bununla beraber hem plazmada hem de eritrositlerde MDA seviyeleri ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$  sırasıyla) yüksek bulundu.

4. Romatoid artritte oksidan stresin arttığı bununla beraber antioksidan savunmanın azaldığı artan oksidan stresin otoantikor gelişimine sebep olabileceği kanısına varıldı.

### 6.2.Öneriler

1. Hastalığın evrelerine göre gruplar oluşturulup benzer çalışma gerçekleştirilerek hastalığın evreleri ile oksidan stres ve otoantikor gelişimi arasındaki ilişki incelenebilir.

2. Benzer çalışma eritrositlerin strese yüksek oranda maruz kaldığı diyaliz hastalarında da gerçekleştirilerek oksidan stresin rolü daha iyi araştırılabilir.

3. In vitro olarak karbonik anhidraz II oksidatif modifikasyonu yapılarak deney hayvanlarında veya kültür ortamında antijenik etkinliği araştırılabilir.



## ÖZET

Romatoid artrit, periferik eklemlerde nonspesifik ve genellikle simetrik inflamasyon şeklinde kendini gösteren kronik inflamatuvar bir hastalıktır. RA'nın kesin patolojisi bilinmemekle beraber ROS'un patolojide etkili olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Eritrositlerde artan oksidatif stresin CA II'ye karşı otoantikor oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir. Bu çalışmada romatoid artritli hastaların eritrositlerinde oksidan-antioksidan durumla CA otoantikorları arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

32'şer kişiden oluşan (yaş ortalaması 49,25±12,8; 7 erkek/25 bayan) hasta ve (yaş ortalaması 46,5±10,4 8 erkek/24 bayan) kontrol grubu oluşturuldu. Bireylerin serumlarında CA I ve CA II otoantikor düzeyleri, plazma ve eritrositlerinde MDA düzeyleri, eritrositlerde SOD ve katalaz aktiviteleri, MDA düzeyleri ve serumda total antioksidan seviyeleri belirlendi.

Romatoid artritli hastalarda eritrositlerde SOD aktivitesinin azaldığı ( $p<0,05$ ) CAT aktivitesinin değişmediği, serumda CA II otoantikor düzeyi artarken ( $p<0,05$ ) CA I otoantikor düzeyinde bir değişme olmadığı belirlendi. Ayrıca hem plazmada hemde eritrositlerde MDA düzeyinde artma olduğu ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$  sırasıyla), serumlarda total antioksidan kapasitenin düştüğü belirlendi ( $p<0,05$ ). CA II otoantikorları ile SOD aktiviteleri arasında negatif bir ilişkinin olduğu bulundu ( $r=-0,396$ ,  $p<0,05$ ).

Sonuç olarak romatoid artritli hastalarda oksidan-antioksidan dengenin bozulmuş olduğu, artan oksidan stresin CA'ya karşı otoantikor gelişimine sebep olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler: anti-CA, romatoid artrit, SOD, CAT, MDA.

## SUMMARY

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease characterized by nonspecific and usually symmetric inflammation in periferic joints. Although the pathophysiological basis of RA is not yet fully understood, some investigations have been shown that ROS have implicated in its pathogenesis. It was shown that increased oxidative stress in erythrocytes triggers autoantibodies formation against CA II. In this study it was aimed to investigate the relationship between CA autoantibodies and oxidant-antioxidant status in the erythrocytes of patients with RA.

The study group was included 32 patients with rheumatoid arthritis (mean age  $49,25 \pm 12,8$ ; 7 male/25 female), and 32 healthy subjects (mean age  $46,5 \pm 10,4$  8 male/24 female). CA I and CA II autoantibodies and total antioxidant status in sera, MDA levels in plasma and erythrocytes, SOD and CAT activities in erythrocytes were determined.

SOD activity was decreased ( $p < 0,05$ ) but the CAT activity unchanged in erythrocyte. The level of anti-CA II titers were increased ( $p < 0,05$ ) but anti-CA I levels weren't altered in sera of patients with RA. The MDA levels were increased in both of plasma ( $p < 0,05$ ) and erythrocytes ( $p < 0,001$ ), while the total antioxidant status were decreased ( $p < 0,05$ ) in patients. Moreover a negativ correlation was found between the activity of SOD and anti-CA II titers ( $r = -0,396$ ,  $p < 0,05$ ).

In conclusion, it was suggested that balance between oxidant and antioxidant substances were destroyed and increased oxidative stress could caused autoantibody formation against CA.

Key words: anti-CA, rheumatoid arthritis, SOD, CAT, MDA.

## KAYNAKLAR

1. Kivela, A., Parkilla, S., Saarnio, J., Karttunen, T. J., Kivela, J., Parkilla, A., Waheed, A., Sly, W.S., Gruub, J.H., Türeci, Ö., Rajaniemi, H.: Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isoenzyme XII normal human gut and colorectal tumors. *American Journal of Pathology*. 156:577-584, 2000.
2. Chiang, W-L., Chu, S-C., Lai, J-C., Yang, S-F., Chiou, H-L., Hsieh, Y-S.: Alterations in quantities and activities of erythrocyte cytosolic carbonic anhydrase isoenzymes in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient individuals. *Clinica Chimica Acta*. 314: 195-201, 2001.
3. Ian, R., Mackay, M.D., Fred, S., Rosen, M.D.: Autoimmun diseases. *New England Journal of Medicine*, 345(5): 340-350, 2001.
4. Inagaki, Y., Jinno-Yoshida Y., Ueki H.: A novel autoantibody reactive with carbonic anhydrase in sera from patients systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome, *Journal of Dermatological Science*, 2:147-54,1991.
5. Kiechle, F.L., Quattrocioni-Longe, T.M., Brinton, D.A.: Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *American Journal of Clinical Pathology*;101:611-5, 1994.
6. Brinton, D.A., Quattrocioni-Longe, T.M., Kiechle, F.L.: Endometriosis: identification by carbonic anhydrase autoantibodies and clinical features. *Annals Clinical Laboratory Science*, 26:409-20, 1996.
7. Nishimori, I., Bratnova, T., Toshkov, I., Caffrey, T., Mogani, Y., Shibata, Y., Et al.: Induction experimental autoimmune sialoadenitis by immunization of PL/J mice with carbonic anhydrase II. *Journal of Immunology*, 154:4865-73, 1995.
8. Kino-Ohsaki, J., Nishimori, I., Momarita, M.: Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and sjögren syndrome. *Gastroenterology*, 110:1579-86, 1996.

9. Ito, T., Nakano, I., Koyanagi, S., Miyahara, T., Migita, Y., Ogoshi, K., et al.: Autoimmune pancreatitis as a new clinical entity. Tree cases of autoimmune pancreatitis with effective steroid therapy. *Digestive Diseases and Sciences*, 42:1458-68, 1997.
10. Gordon, S.C., Quattrocioni-Longe, T.M., Khan, B.A., Kodaaali, V.P., Chen, J., Silverman, A., et al. Antibodies to carbonic anhydrase in patients with immune cholangiopathies. *Gastroenterology* , 108:1802-9, 1995.
11. Nishimori, I., Akisawa, N., Miyaji, E., Kohsaki, T., Iwasaki, S., Onishi, S.: Serum antibody to carbonic anhydrase II in patients with chronic viral hepatitis: a review of its prevalence in liver diseases, *Hepatology Research*, Vol.30, 210-213, 2004.
12. Invernizzi, P., Battezzati, P. M., Crosignani, A., Zermani, P., Bignotto, M., Del papa, N., Zuin, M., Podda, M.: Antibody to carbonic anhydrase II is present in primary biliary cirrhosis (PBS) irrespective of antimitochondrial antibody status. *Clinical and Experimental Immunology*, 114:448-454, 1998.
13. Akisawa, N., Nishimori, I., Miyaji, E., Iwasaki, S., Maeda, T., Shimizu, H., Sato, N., Onishi, S.: The ability of anti-carbonic anhydrase II antibody to distinguish autoimmune cholangitis from primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *Journal of Gastroenterology*, 34:366-371, 1999.
14. Iuchi, Y., Okada, F., Onuma, K., Onoda, T., Asao, H., Kobayashi, M., Fujii, J.: Elevated oxidative stress in erythrocytes due to a SOD1 deficiency causes anaemia and triggers autoantibody production. *Journal of Biochemistry*, 402: pp.219-227, 2007.
15. Supuran C. T.: Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews, Drug Discovery*: 7:1-12:2008.
16. Supuran, C.T., Scozzafava, A., Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 4336-4350, 2007
17. Sly, S. W., Hu, Y. P.: Human carbonic Anhydrase and Carbonic Anhydrase Deficiencies, *Annual Reviews of Biochemistry*, 64: 375-401, 1995.

18. Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran T. C.: Carbonic anhydrases: current State of the art, therapeutic applications and future prospects, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19:199-229,2004.
19. Pocker, Y.:Molecular control of carbonic anhydrase activity: ionic effectors, differential modifiers and novel inhibitors. In the carbonic anhydrasefrom biochemistry and physiology and Clinical medicine. Botre, F., Storey, B. T., Gros, G.,(Eds.) Wienheim, VCH Pulishers, pp 75-85,1991.
20. Careter, M.J.:carbonic anhydrase : isoenzymes properties, distribution and functional significore, *Biological review*, 42:462-75,1972
21. Robyt, J.F., White, B.,J.: *Biochemical techniques Theory and Practise*, Press Inc., pp.95,1990.
22. Maren, T.H., Jankowska, I., Sanyal, G., Edelhauser, H.F.: The Transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion, *Experimental Eye Research*, 33:457, 1983.
23. Epstein, D. L.,Grant, W.M.: Carbonic anhydrase inhibitors side effects; Serum Chemical Analysis, *Archives of Ophthalmology*, 85:1387,1977.
24. Gümüşdiş, G.: Romatoid artrit. Klinik Romatoloji El Kitabı. Birinci Baskı. İzmir Güven Kiyabevi, 2003,pp.209-227.
25. Krane, S.M., Simon, L.:Rheumatoid arthritis:clinical features and pathogenic Mechanism, *The Medical Clinics of North America*, 30:263-283,1986.
26. Hamuryudan, V.:Romatoid artrit.İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri,34:s.19-29,2003.
27. Akdoğan, M., Akkuş, S., Akkuş, F., Koyu, A.: Romatoid artrit ve osteoartrozlu hastalarda eritrosit süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzim düzeyleri. *Van Tıp Dergisi*, 5: s.68-71,1998.
28. Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A.: Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*,74:324-329, 2007.

- 29 Gaetani, F.G., Galiona, S., Canepa, Ferraris, M.A., Kirkman, N.H.: Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 73:334-339, 1989.
30. Mc Cord, J. M., Fridovich, I.: Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (Hemoglobin). *Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049-6055, 1969.
31. Kulikowska-Karpinska, E., Moniuszko-Jakoniuk, J.: The antioxidative barrier in the organism, *Polish Journal of Environmental Studies*, 13(1):pp.5-13, 2004.
32. Aebi, H. E.: Catalase. In Bergmeyer, H. U., *Methods of Enzymatic Analysis*, 3:273-285, 1987.
33. Epstein, O., Chapman, R. W. G., Lake-Bakaar, G., Foo, A. Y., Rosalki, S. B., and Sherlock, S.: The pancreas in primary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 83:1177.
34. Strarand, V., and Talal, N.: Advances in the diagnosis and concept of Sjögren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Bulletin on the Rheumatic Diseases*, 30:1046, 1980.
35. Whaley, K., and MacSween, R. N. M.: Experimental induction of immune sialoadenitis in guinea pigs using different adjuvants. *Clinical and Experimental Immunology*, 17: 681, 1974.
36. White, S. C., and Casarett, G. W.: Induction of experimental autoallergic sialoadenitis. *Journal of Immunology*, 112: 178, 1974.
37. Nishimori, I., Okazaki, K., Yamamoto, Y., Morita, M., Tamura, S., and Yamamoto, Y.: Identification of autoantibodies to a pancreatic antigen in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *Journal of Clinical Immunology*, 13: 265, 1993.
38. Ueno, Y., Ishii M., Takahashi, T., Toyota, T., and Larusso, N.F.: Different susceptibility of mice to immune-mediated cholangitis induced by immunization with carbonic anhydrase II, *Laboratory Investigation*, 78:629-637, 1995.
- 39 Frederick, L., Kiechle, M. D., Therese, M., Quattrocchi-Longe, M. S., David A. Brinton, M. D.: Carbonic anhydrase antibody in sera from patients with endometriosis. *American Journal of Clinical Pathology*, 101: 611-615, 1994.

40. Kiechle, F.L., Quattrociochi-Longe, T.M., Brinton, D.A., Gordon, S.C., Sykes, E., Elkhalfa, M.Y.: Autoantibodies to specific enzymes, a review[review], *Annals Clinical Laboratory Science*, 26:195-207, 1996.
41. Kita, H.: Are antibodies to carbonic anhydrase disease specific marker? (Editorial). *Hepatology Research* 30 , 238-239, 2004.
42. Hosoda, H., Okawa-Takatsuji, M., Tanaka, A., Uwatoko, S., Aotsuka, S., Hasimoto, N., et al.: Detection of autoantibody against carbonic anhydrase II in various liver diseases by enzyme-linked immunosorbent assay using appropriate conditions. *Clinica Chimica Acta*, 342: 71-81, 2004.
43. Yagi, K., Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine free radicals in diagnostic medicine, Plenum Press, New York, pp.1-15, 1994,
44. Young, I.S. and Trimble, E.R.: Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Annual Clinical Biochemistry*, 28:pp.504-508, 1991.
45. Sun Y., Oberlay L.W., Li Y.: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*:34, pp.487-500, 1988
46. Erel, Ö.: A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry*, 37:pp.112-119, 2004.
47. Gata: <http://www.infeksiyon.org/Detail.asp?ctg=10&Article=256> (04.06.2005). Ortatılı, M.: GATA Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı.
48. Jaswal, S., Mehta, H.C., Sood, A.K., Kaur, J.: Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clinica Chimica Acta*, 338:123-129, 2003.
49. Aruoma, O.I., Kaur, H., Halliwell, B.: Oxygen free radicals and human diseases. *Journal of the Royal Society Health*, 111:251-255, 1991.
50. Gambhir, J. K., Lali, P., Jain, A. K.: Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*, 30:351-355, 1997.

51. Seven, A., Güzel, S., Aslan, M., Hamuryudan, V.: Lipid, protein DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*, 41:pp.538-543, 2008.
52. Sarban, S., Koçyiğit, A., Yazar, M., Isıkan, U.E.: Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical Biochemistry*, 38:pp.981-986, 2005.
53. Vijayakumar, D., Suresh, K., Manoharan, S.: Lipid peroxidation and antioxidant status in blood of rheumatoid arthritis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 21(1):104-108, 2006.
54. Kalpakçioğlu, B., Şenel, K.: The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, 27:pp.141-145, 2008.
55. Mansour, R.B., Lassoued, S., Gargouri, B., Gai, A.E., Attia, H., Fakhfakh, F.: Increased levels of autoantibodies against catalase and superoxide dismutase associated with oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 37:pp.103-108, 2008.
56. Mewar, D., Wilson, A.G.: Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60: pp.648-655, 2006.
57. Pachot, M. R., Desbos, A., Moreira, A., Becchi, M., Tebib, J., Bonnin, M., Aïtisselmi, T., Bienvenu, J., Fabien, N.: Carbonic anhydrase III: a new target for autoantibodies in autoimmune diseases. *Autoimmunity*, 40(5):380-389, 2007.
58. Mentşe, A.: Otoimmun hastalıklarda CA II otoantikörlerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Trabzon, 2005.
59. Tilleman, K., Union, A., Cantaert, T., Keyser, S. D., Daniels, A., elewaut, D., Keyser, F. D., Deforce, D.: In pursuit of B-cell synovial autoantigens in rheumatoid arthritis: Confirmation of citrullinated fibrinogen, Detection of vimentin, and introducing carbonic anhydrase as a passible new synovial autoantigen. *Clinical Proteomics*, 1:pp.32-46, 2007.



60. Itoh, Y., Reichlin, M.: Antibodies carbonic anhydrase in systemic lupus erythematosus and other rheumatic disease. *Arthritis Rheumatism*, 35(1):73-82, 1992.
61. Ueno, Y., Ishii M., Igarashi, T., Mano, Y., Yahagi, K., Kisara, N., et al.: Primary biliary cirrhosis with antibody against carbonic anhydrase II associates with distinct immunological backgrounds. *Hepatology Research*, 20:18-27, 2001.
62. Taniguchi, T., Okazaki, K., Seko, S., Okamoto, M.: Association of HLA and autoantibodies against the exocrine pancreas in type 1 diabetes. *Pancreas*, 29:2004.
63. Cesare, E. D., Previti, M., Lombardo, F., Mazzu, N., Benedetto, A.D., Cucinotta, D.: Prevalence of autoantibodies to carbonic anhydrase II and lactoferrin in patients with type 1 diabetes. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1037:131-132, 2004.
64. Uchida, K., Hasui, Y., Osawa, T.: Covalent attachment of 4-hydroxy-2-nonenal to erythrocyte proteins. *Journal of Biochemistry*, 122:pp.1246-1251, 1997.
65. Toyoda, K., Nagae, R., Akagawa, M., Ishino, K., Shibata, T., Ito, S., Shibata, N., Yamamoto, T., Kobayashi, M., Takasaki, Y., Matsuda, T., Uchida, K.: Protein-bound 4-hydroxy-2-nonenal an endogenous triggering antigen of anti-DNA response. *Journal of Biological Chemistry*, 282:pp.25769-25778, 2007.
66. Ono, M., Ono, M., Watanabe, K., Miyashita, Y., Inagaki, Y., Ueki, H.: A study of anti-carbonic anhydrase II antibodies in rheumatic autoimmune diseases. *Journal of Dermatological Science*, 21: 183-186, 1999.
67. Gay, C. V., Anderson, R.E., Schraer, H., Howell, D.S.: Identification of Carbonic anhydrase in chick growth-plate cartilage. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 30:pp391-394, 1982.
64. Rojas, R., Apodaca, G.: Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Natural Review of Molecular Cell Biology*, 3: 944-955, 2002.

## ÖZGEÇMİŞ

15.07.1984 tarihinde Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 2001 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü kimya öğretmenliği programını kazandı. 2006 yılında bu bölümden birincilikle mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı bu anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

Ayşe AKYÜZ