

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**BEL FITİĞİ OLAN HASTALARDA PROLİDAZ  
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ VE OKSİDATİF  
STRES İNDEKSİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Hale ÇAKIR  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Uzmanlık Tezi**

**Danışman  
Prof. Dr. Nurten AKSOY**

**ŞANLIURFA  
2009**

## TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince hiçbir konuda desteğini esirgemeyerek beni teşvik edip yönlendiren başta tez danışmanım sayın Prof. Dr. Nurten AKSOY olmak üzere, anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT ve eğitim süremde büyük bir bölümünde emeği geçen Prof. Dr. Özcan EREL hocama en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Hasta popülasyonunun seçimi ve bel fitiği konularında değerli katkılarından dolayı Beyin ve Sinir Cerrahisi anabilim dalı başkanı Yrd. Doç. Dr. Ahmet Faruk SORAN ile Beyin ve Sinir Cerrahisi anabilim dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet Fuat TORUN'a ayrıca teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, çalışmamın istatistiksel analizinde değerli katkıları olan Öğr. Gör. Hakim ÇELİK'e teşekkür ederim.

Gerek iş gerekse özel hayatımda arkadaşlarım olan Necla ÇELİK, Niyet COŞAR ve Tevhide ARABACI'ya bana yaşattıkları güzellikler için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma laboratuvarımızın demir başı olan, bütün çalışmalarda olduğu gibi benim tez çalışmamda da büyük emeği geçen Biyolog kardeşim Abdullah TAŞKIN'a da her şey için teşekkür eder, emeklerinin karşılığını bir gün fazlasıyla alabilmesini dilerim.

Ayrıca laboratuvar hizmetlerinin sürdürülmesinde değişik kademelerde emeği olan tüm çalışma arkadaşlarıma laboratuvarımızı güzelleştirdikleri ve bana biyokimyayı sevdirdikleri için şükranlarımı sunarım.

Tez kanlarımın toplanmasında emeği geçen, Beyin ve Sinir Cerrahisi anabilim dalından değerli eşim Opr. Dr. Ahmet ÇAKIR'a hayatım boyunca bana gösterdiği destek, şevkat ve sabrından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

**Dr. Hale ÇAKIR**

**2009**

**ŞANLIURFA**

## TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince hiçbir konuda desteğini esirgemeyerek beni teşvik edip yönlendiren başta tez danışmanım sayın Prof. Dr. Nurten AKSOY olmak üzere, anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT ve eğitim süremde büyük bir bölümünde emeği geçen Prof. Dr. Özcan EREL hocama en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Hasta popülasyonunun seçimi ve bel fitiği konularında değerli katkılarından dolayı Beyin ve Sinir Cerrahisi anabilim dalı başkanı Yrd. Doç. Dr. Ahmet Faruk SORAN ile Beyin ve Sinir Cerrahisi anabilim dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet Fuat TORUN'a ayrıca teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, çalışmamın istatistiksel analizinde değerli katkıları olan Öğr. Gör. Hakim ÇELİK'e teşekkür ederim.

Gerek iş gerekse özel hayatımda arkadaşlarım olan Necla ÇELİK, Niyet COŞAR ve Tevhide ARABACI'ya bana yaşattıkları güzellikler için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma laboratuvarımızın demir başı olan, bütün çalışmalarda olduğu gibi benim tez çalışmamda da büyük emeği geçen Biyolog kardeşim Abdullah TAŞKIN'a da her şey için teşekkür eder, emeklerinin karşılığını bir gün fazlasıyla alabilmesini dilerim.

Ayrıca laboratuvar hizmetlerinin sürdürülmesinde değişik kademelerde emeği olan tüm çalışma arkadaşlarıma laboratuvarımızı güzelleştirdikleri ve bana biyokimyayı sevdirdikleri için şükranlarımı sunarım.

Tez kanlarımın toplanmasında emeği geçen, Beyin ve Sinir Cerrahisi anabilim dalından değerli eşim Opr. Dr. Ahmet ÇAKIR'a hayatım boyunca bana gösterdiği destek, şevkat ve sabrından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

**Dr. Hale ÇAKIR**

**2009**

**ŞANLIURFA**

# İÇİNDEKİLER

<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Lomber Disk Hernileri.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.1. Lomber Anatomi.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.2. İntervetebraal Disk.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2.1. İntervetebraal Diskin Yapısı.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2.1.1. Nukleus Pulpozus.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2.1.2. Annulus Fibrozus.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2.2. İntervetebraal Diskin Hücreleri.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2.3. İntervetebraal Diskin Kollajenleri.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2.4. İntervetebraal Diskin Proteoglikanları.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.3. İntervetebraal Disk Dejenerasyonu.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.3.1. İntervetebraal Diskin Biyomekaniği.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.3.2. Diskin Beslenmesi.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.3.3. İntervetebraal Diskte Enzimatik Aktivite.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.3.4. İntervetebraal Diskte Sitokinler.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3.4.1. Kıkırdak Metabolizmasında</b>	
<b>Rol Oynayan Sitokinler.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.3.5. Dejenere İntervetebraal Diskte Ekstrasellüler Matriks.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.3.6. İntervetebraal Diskin İmmünolojisi.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.3.7. İntervetebraal Disk Dejenerasyonu ve Genetik.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.4. İntervetebraal Disk Fizyolojisi.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.4.1. Disk Deformasyonu.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.4.2. Disk Dejenerasyonunun Patofizyolojisi.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.4.3. İntradiskal Hidrostatik ve Onkotik Basınç.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.5. Lomber İntervetebraal Disk Dejenerasyon Kliniği.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.5.1. Disk Herniasyonu.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.5.2. İnstabilite.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.5.3. Disk Hernilerinin Sınıflandırılması.....</b>	<b>14</b>

2.1.6. Etiyoloji-İnsidan.....	14
2.1.7. Semptom ve Nörolojik Muayene.....	15
2.1.7.1. Semptomlar.....	15
2.1.7.2. Fizik muayene .....	16
2.1.8. Ayırıcı Tanı.....	17
2.1.9. Görüntüleme Yöntemleri.....	18
2.1.10. Tedavi.....	20
2.1.10.1. Konservatif Tedavi.....	20
2.1.10.2. Cerrahi Tedavi.....	21
2.1.10.3. Cerrahi Tedavi Komplikasyonları.....	22
2.1.10.4. Prognoz.....	22
<b>3. PROLİDAZ.....</b>	<b>23</b>
3.1. Prolidazın Tanımı.....	23
3.2. Prolin.....	23
3.3. Prolidazın Yapısı.....	26
3.4. İnsan Prolidazının Primer Yapısı ve Gen Lokalizasyonu.....	27
3.5. Prolidazın İzoenzimleri.....	27
3.6. Prolidaz İnhibitörleri ve Aktivatörleri.....	30
3.7. Prolidazın Kollajen Yapım ve Yıkımında Önemi.....	30
<b>4. SERBEST RADİKALLER.....</b>	<b>33</b>
4.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	33
4.1.1. Süperoksit Radikalleri ( $O_2^{\cdot-}$ ) .....	34
4.1.2. Hidroksil Radikalleri ( $HO^{\cdot}$ ).....	34
4.1.3. Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ) ) .....	36
4.1.4. Hipoklorik Asit ( $HOCl$ ) .....	37
4.1.5. Singlet $O_2$ ( $O_2^{\uparrow\downarrow}$ ).....	37

4.2. Reaktif Nitrojen Türleri ( NO, NO <sub>2</sub> , NO <sup>+</sup> , NO <sup>-</sup> ).....	37
4.3. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....	38
4.4. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri.....	43
4.4.1. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri.....	44
4.4.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	45
4.4.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri.....	45
4.4.4. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri.....	45
4.5. Antioksidan Savunma Sistemler.....	47
4.6. Total Oksidatif Stres (TOS).....	55
4.7. Total Oksidatif Stres (TOS).....	55
4.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSI).....	56
<b>5. MATERYAL METOD.....</b>	<b>57</b>
5.1. Kullanılan araç ve Gereçler.....	57
5.2. Kullanılan Kimyasallar.....	58
5.3. Prolidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	59
5.3.1. Serum Prolidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi (Modifiye(Optimize)Chinard Metodu).....	59
5.3.1.1. Prolidaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Ayırıcılar.....	59
5.4. Prolidaz Aktivitesinin Hesaplanması.....	61
5.5. Total Antioksidan Kapasite (TAK) .....	62
5.6. Total Oksidant Seviye (TOS) .....	62
5.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) .....	63
5.8. Yapılan İstatistiksel Analizler.....	63
<b>6. BULGULAR.....</b>	<b>64</b>
<b>7. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>68</b>
<b>8. KAYNAKLAR.....</b>	<b>75</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> İnsan prolidaz I ve prolidaz II izoenzimlerinin doku dağılımları(%).....	<b>29</b>
<b>Tablo 2.</b> Oksijen türevi bileşikler.....	<b>33</b>
<b>Tablo 3.</b> Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler.....	<b>41</b>
<b>Tablo 4.</b> Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	<b>58</b>
<b>Tablo5.</b> Hasta ve kontrol gruplarının demografik ve karakteristik bilgileri.....	<b>64</b>
<b>Tablo 6.</b> Hasta ve kontrol gruplarında Prolidaz, Total Antioksidan Seviye, Total Oksidan Seviye değerleri.....	<b>64</b>
<b>Tablo 7.</b> Hasta ve kontrol gruplarında Prolidaz, Total Antioksidan Seviye, Total Oksidan Seviye arasındaki korelasyon.....	<b>65</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Omurganın anatomik yapısı.....	2
Şekil 2. İntervertebral diskin yapısı ve çevresel anatomik yapılarla ilişkisi.....	4
Şekil 3. Herniye olmuş disk.....	13
Şekil 4. Prolin ve diğer amino asidin genel yapısal görünümü.....	24
Şekil 5. Memeli kollajeninde bulunan prolin ve hidroksiprolin izomerleri.....	25
Şekil 6. Prolinin metabolik yollarla bağlantısı.....	26
Şekil 7. Prolidaz genini içeren kromozom 19.....	27
Şekil 8. Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri.....	31
Şekil 9. Araşidonik asit metabolizmasında serbest radikallerin sentezi.....	41
Şekil 10. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS veRNS) vücuttaki etkileri.....	43
Şekil 11. Prolidaz ve Total Antioksidan Seviye arasındaki korelasyon.....	65
Şekil 12. Kontrol ve hasta gruplarında serum prolidaz aktivitelerinin karşılaştırılması....	66
Şekil13. Kontrol ve hasta grupları arasında Total Oksidan Seviyenin karşılaştırılması.....	66
Şekil 14. Kontrol ve hasta grupları arasında Total Antioksidan Seviyenin karşılaştırılması.....	67
Şekil 15. Kontrol ve hasta grupları arasında Oksidativ Stres İndeksinin karşılaştırılması.....	67

## RESİM LİSTESİ

Resim 1. Lomber MRI’de sagittal kesitte L4-L5 disk hernisi.....	19
Resim 2 . Lomber MRI’de aksiyal kesitte L4-L5 disk hernisi.....	19



## KISALTMALAR

<b>IVD</b>	<b>İnter vertebral disk</b>
<b>IVDD</b>	<b>İnter vertebral disk dejenerasyonu</b>
<b>MMP</b>	<b>Matriks metallo proteinaz</b>
<b>TMPI</b>	<b>Doku metallo proteinaz inhibitörü</b>
<b>PDGF</b>	<b>Trombosit kaynaklı büyüme faktörü</b>
<b>b-FGF</b>	<b>Fibroblast büyüme faktörü</b>
<b>TGF</b>	<b>Transforme edici büyüme faktörü</b>
<b>IGF-1</b>	<b>İnsülin benzeri büyüme faktörü</b>
<b>IL</b>	<b>İnter lökin</b>
<b>TNF</b>	<b>Tümör nekroz faktör</b>
<b>NO</b>	<b>Nitroz oksit</b>
<b>PG</b>	<b>Prosto glandin</b>
<b>Mrna</b>	<b>Haberci ribonükleik asit</b>
<b>GAG</b>	<b>Glikoz amino glikan</b>
<b>MRI</b>	<b>Manyetik rezonans görüntüleme</b>
<b>EMG</b>	<b>Elektro miyelografi grafi</b>
<b>DUSG</b>	<b>Direk üriner sistem grafisi</b>
<b>BT</b>	<b>Bilgisayarlı tomografi</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenozin tri fosfat</b>
<b>DNA</b>	<b>Deoksi ribonükleik asit</b>
<b>DEAE</b>	<b>Dietil aminetik selüloz</b>

<b>kDa</b>	<b>Kilo Dalton</b>
<b>Fe</b>	<b>Demir</b>
<b>Co</b>	<b>Kobalt</b>
<b>Ni</b>	<b>Nikel</b>
<b>Cu</b>	<b>Bakır</b>
<b>Zn</b>	<b>Çinko</b>
<b>Cd</b>	<b>Kadmiyum</b>
<b>Ag</b>	<b>Gümüş</b>
<b>Hg</b>	<b>Civa</b>
<b>Pb</b>	<b>Kurşun</b>
<b>Mn</b>	<b>Mangan</b>
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	<b>Mangan klorür</b>
<b>HCl</b>	<b>Hidroklorik asit</b>
<b>GSH</b>	<b>Glutation</b>
<b>Gly-pro</b>	<b>Glisil Prolin</b>
<b>O<sup>2</sup></b>	<b>Dioksijen</b>
<b>O<sup>2·</sup></b>	<b>Süperoksit radikali</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Hidrojen peroksit</b>
<b>SOD</b>	<b>Süperoksit dismutaz</b>
<b>HO·</b>	<b>Hidroksil radikali</b>
<b>RSO<sub>2</sub>·</b>	<b>Oksi-sülfür radikali</b>
<b>HOCl</b>	<b>Hipoklorik asit</b>
<b>ROO·</b>	<b>Peroksil radikali</b>
<b>RO·</b>	<b>Alkoksil radikali</b>

<b>RS ·</b>	<b>Tiol radikali</b>
<b>NOS</b>	<b>Nitrik oksit sentetaz</b>
<b>cGMP</b>	<b>Siklik guanozin mono fosfat</b>
<b>ONOOH</b>	<b>Oksidan peroksinitrit</b>
<b>ETS</b>	<b>Elektron transport sistemi</b>
<b>NAD</b>	<b>Nikotinamid dinükleotid</b>
<b>NADH</b>	<b>Nikotinamid dehidrogenaz</b>
<b>XOD</b>	<b>Ksantin oksidaz</b>
<b>XDH</b>	<b>Ksantin dehidrogenaz</b>
<b>PML</b>	<b>Polimorfonükleerlökosit</b>
<b>ROS</b>	<b>Reaktif oksijen türevleri</b>
<b>RNS</b>	<b>Reaktif nitrojen türevleri</b>
<b>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>Dinitrojen trioksit</b>
<b>HNO<sub>3</sub></b>	<b>Nitrik asit</b>
<b>GSH-Px</b>	<b>Glutation peroksidaz</b>
<b>GSH-Rd</b>	<b>Glutation redüktaz</b>
<b>PLGSH-Px</b>	<b>Fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaz</b>
<b>LDL</b>	<b>Düşük dansiteli lipoprotein</b>
<b>Toc-OH</b>	<b>Tokoferol</b>
<b>TOS</b>	<b>Total oksidan seviye</b>
<b>TAS</b>	<b>Total antioksidan seviye</b>
<b>OSI</b>	<b>Oksidatif stres indeksi</b>

## ABSTRACT

### **Determination of Prolidase Activity and Comparison with Oxidative Stress Index in Patients with Intervertebral Disc Hernia**

**Dr. Hale ÇAKIR**

#### **Medical Biochemistry Expertise Thesis**

25% of amino acids found in the composition of Collagen which forms of 30% of the body proteins and particularly a basic component component of the ekstrasellüler matrix are prolin and hydroxyprolin. Since prolidase is the only enzyme breaking di-and tri-peptides containing these two amino acids, it takes active role in the break-down of collagen and re-use of proline in the collagen turn-over. Therefore, it is expected that prolidaz activity is directly related to collagen break-down and re-synthesis (turnover). In IVD having condense collagen structure degeneration which increases together with aging and collagen damage due to this, is thought to be an important prediposan factor in lomber disc hernia. Beside that if there is an increase in oxidative stress, degeneration and collagen damage will be more severe.

In this study, we aimed to find out collagen damage in patients with lomber disc hernia which affects their life negatively, and additionally, to detect total oksidative-antioksidative status and also to determine correlations, if there is any, between the present parameters.

75 patients and 70 healthy person having similar age were included to the study. Prolidase enzyme activity with a photometric Chinard method manually and total oksidative status (TOS) and total antioksidative status (TAS) with a full automatic colorometric method (REL<sup>®</sup> Assay Diagnostics) were studied. Taking the ratio of TOS to TAS oksidative stres index (OSI) were found. As a result, a significant increase in prolidase enzyme activity and TOS, a decrease in TAS were detected in patients' group compared to the controls. OSI values were significantly high in patients' group compared to the controls.

In the light of these findings, it is possible to conclude that the patients with intervertebral disc hernia were exposed to seriuos oxidative damage and the collagen metabolism were increased. According to this conclusion, we thought that giving antioxidant vitamines or supplements may contribute to the treatment and the detection of prolidase enzyme activity may give an idea about the severity of the disease.

**Key Words:** Intervertebral disc, prolidase, total oksidative status, total antioksidative status, oksidative stres index

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bel fitiği; nukleus pulpozusun, annulus fibrozustaki yırtıklar yoluyla spinal kanala doğru uzanım göstermesidir. Bu durum dejeneratif ve/veya travmatik olaylar sonucu meydana gelebilir. Disk hernisi en sık lomber bölgede görülür ve bel ağrısının en sık nedenlerinden biridir. Bel ağrısı, iş gücü kaybına yol açan hastalıklar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Bel ağrısı şikayeti ile sağlık kuruluşlarına başvuran hastaların ortalama %2-5'inde disk hernisi saptanmıştır. Genç-orta yaş, erkek cinsiyet, ailesel yatkınlık, ağırlık kaldırma ve spinal travma yaygın olarak karşılaşılan risk faktörleridir. Lomber disk hernileri en sık 35-55 yaş grubunda görülür. Yoğun kollajen yapıdan meydana gelen intervertebral disk (IVD)'te yaş ile birlikte giderek artan dejenerasyon ve buna bağlı olarak gelişen kollajen hasarı lomber disk hernisi gelişiminde önemli bir predispozan faktör olarak görülmektedir. Ayrıca bel fitigi olan olgularda, pekçok dejeneratif hastalığın etiyopatogenezinde rol oynayan oksidatif stres artışının olması, IVD'te dejenerasyon ve kollajen hasarını daha da şiddetlendirdiğini düşündürmektedir.

Biz bu çalışmada, insanların yaşam kalitesini olumsuz etkileyen ve ciddi işgücü kaybına yol açan bel fitiği olgularında kollajen hasarını, bu güçlü proteinin metabolizmasındaki değişiklikler için biyokimyasal göstergelerden biri olan prolidaz enzim aktivitesini tayin ederek ve ayrıca total oksidatif-antioksidatif durumu belirleyerek oksidatif hasarın mevcut olup olmadığını ortaya koymayı, bunların yanısıra mevcut parametreleri birbirleriyle ve sağlıklı bireylerin değerleriyle karşılaştırarak disk hernisi etiyopatogenezindeki rolünü araştırmayı amaçladık.

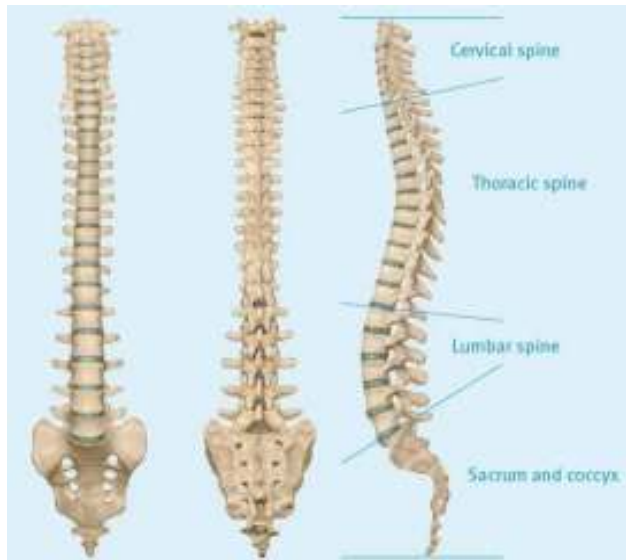
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. LOMBER DİSK HERNİLERİ

#### 2.1.1. Lomber Anatomi

İnsan omurga iskeleti 7 servikal, 12 torakal, 5 lomber, 5 sakral ve 4 koksigeal olmak üzere 33 omurdan oluşmuştur. Bu sistem, ligament, kas ve intervertebral diskler vasıtasıyla bir kolon şeklini oluşturur. Sakral ve koksigeal segmentler yetişkinde birbirleriyle kaynaşarak, sakrum ve koksiksi oluşturur. Lomber vertebralar, vertebral kolonun hareketli olan en büyük segmentidir. Büyüklüğü, transvers foramen ve kostal fasetlerinin olmaması nedeni ile diğer omurgalardan yapısal olarak ayrılır.

Kolumna vertebraliste, foramen vertebralelerin üst üste binmesiyle oluşan kanala, canalis vertebralis adı verilmektedir. İnsanda bu kanal içerisinde medulla spinalis, zarlar ve spinal sinir kökleri yer alır. Ayrıca ligamentum flavum, servikalden lumbosakral aralığa kadar sarı elastiki bir bağ olarak uzanır. Anterior longitudinal ligament, kraniumdan sakruma kadar vertebra cisimleri ön yüzünde, posterior longitudinal ligament ise, vertebra cisimleri arkasında intervertebral foramenler boyunca devam eder ve disk ile daha sıkı ilişkide bulunur.



Şekil 1. Omurganın anatomik yapısı

### **2.1.2. İntervetebral Disk**

İnsan omurgasında toplam 23 adet IVD bulunur. Vertebralar arasında eklemleşmeyi sağlayan intervertebral diskler, kompleks fibrokartilajinöz bir dokudur. Bunlar vertebraların amortisörü olup, spinal kolona binen yüklerin emilip dağıtılmasına ve omurganın düzgün olarak hareket etmesine olanak verir.

Sağlıklı erişkin bir insanda intervertebral disk yüksekliği, vertebra korpus yüksekliğinin %25'ini oluşturur. Diskler üst torakal bölgede ince, lomber bölgede ise kalındır. İntervetebral disk, en içte yarı sıvı olan nükleus pulposus, çevresinde fibröz liflerle çevrili annulus fibrozus ve annulusla çevrili nükleusu alt ve üstteki vertebra cisimlerinden ayıran iki kıkırdak uç plak (end-plate)'tan oluşur. Annulus fibrozus adından da anlaşıldığı gibi fibröz ve fibrokartilajinöz lamellerden oluşan sağlam bir yapıdır. Dış lamel, vertebra cismi epifizine yapışmıştır. Bunlara Sharpey fibrilleri denir ve Tip-I kollajen içerirler. Alt tabaka fibrilleri ise end plate kartilajına yapışır ve Tip-II kollajen içerirler.

Nükleus pulpozus, IVD hacminin %40'ını oluşturur ve daha çok diskin arka bölümünde lokalizedir. Tip-II kollajen içerir. Annulus fibrozustan daha jelatinöz yapıya sahiptir. Jelatinöz ve mukoid retikulum içinde protein, su ve mukopolisakkarit içeren elastiki bir yapıdır. Diskin içindeki bu elastiki gerginlik ve iç basınç vertebralar arasını açık tutar ve ayakta vücut ağırlığına karşı vertebraları birbirinden ayrı tutar. Ayakta çok durunca bunların şişkinliği azalır, akşama doğru insan boyu 1 cm kadar kısalmış olur. Vertebra üzerine binen yük, intervertebral disk matriksi tarafından paylaşılmaktadır.

İntervetebral diskin innervasyonu, sinovertebral sinir tarafından sağlanır. Sinovertebral sinir ayrıca annular fibrilleri, intervertebral diskin arka parçasını, durayı ve posterior longitudinal ligamenti innerve eder.

İntervetebral foramen; spinal sinirlerin çıktığı kemik yapıdır. Eliptik yapıda olan foramenin, lomber bölgede vertikal çapı 12-19 mm arasındadır (1-3).

#### **2.1.2.1. İntervertebral Diskin Yapısı**

##### **2.1.2.1.1. Nükleus Pulpozus**

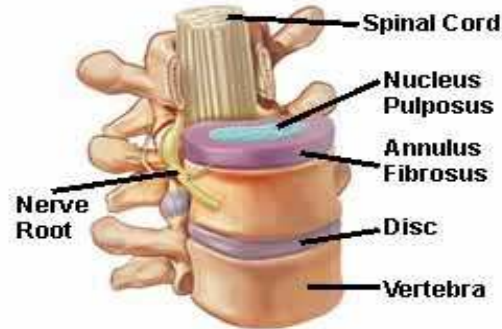
Nükleus pulpozus büyük oranda notokord kaynaklıdır. Çocuklarda erişkinlere göre daha yumuşak, daha akışkan ve oransal olarak daha büyüktür. Histolojik olarak miksoid veya

kondroid bazofilik bir proteoglikan matriks ve bu matriks içerisinde gelişigüzel dağılmış ince kollagen liflerden oluşur. Kitlesinin % 80-90'ını su oluşturur. Kuru ağırlığının % 65'ini proteoglikanlar, % 20'sini kollajenler ve kalanını da elastin oluşturur (4).

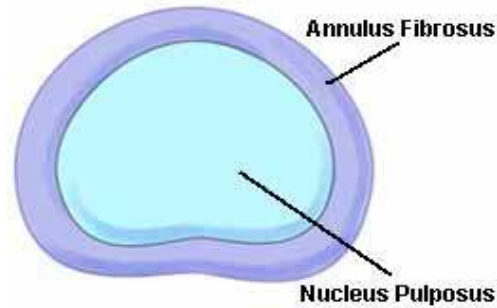
#### 2.1.2.1.2. Annulus Fibrozus

Histolojik olarak, kollajenöz yapıda fibröz doku ve kıkırdaktan oluşur. Hücreleri, kondrositlerden fibroblastlara kadar varan bir spektrum gösterir. Kitlesinin % 60-70'ini su oluşturur. Kuru ağırlığının % 60'ı kollajen, % 20'si proteoglikanlardan oluşur. Minör komponent olarak elastin içerir (1).

Normal koşullarda nukleusu hapseden annulus fibrozus ve kıkırdak uç plakları, büyük yüklenmeler karşısında onun engelleyecek güçtedir. Buna rağmen, bütün disklerde potansiyel olarak iki zayıf nokta bulunur: 1) Kıkırdak uç-plakları 2) Annulusun arka segmenti. Annulusun posterior bölümü ön bölümüne göre daha incedir ve kemiklere daha zayıf yapışır. İşte disk bu iki yerden fitiklaşır. Nukleusun ön ve yanlardan fitiklaşması çok nadirdir (5, 6).



Axial (Overhead) View of Intervertebral Disc



Şekil 2. İntervertebral diskin yapısı ve çevresel anatomik yapılarla ilişkisi



### **2.1.2.2. İntervertebral Diskin Hücreleri**

İntervertebral disk, hücreden fakir bir dokudur. Hücreler hacminin % 1-5 kadarını işgal eder. Hücre sayısı kıkırdak uç plaktan nukleusa doğru hızla azalır. Uç plak hücreleri tipik kondrositlerdir. Annulusun dış tabakasındaki hücreler iğsi fibroblast iken iç tabakasındaki hücreler yuvarlak kondrosittir (7-10). Annulus hücrelerinin çoğu Tip I ve Tip II kollajen yaparken, nukleus hücreleri yalnızca Tip II kollajen sentez eder (11). Diskin kondrositik hücreleri morfolojik olarak eklem kıkırdağı kondrositlerine benzer (12). Scanning elektron mikroskopunda disk hücrelerinin çok sayıda sitoplazmik çıkıntı içerdiği ortaya konmuştur. İşlevi henüz bilinmeyen bu proseslerin diskin mekanik direncine katkısı olabileceği öne sürülmektedir (13).

Normalde disk dokusunun % 80'ini oluşturan su, disk komponentleri arasında heterojen bir dağılım gösterir. Suyun disk içinde ve disk dışında içeri ve dışarı doğru olan hareketleri hücreler için gerekli olan metabolitlerin taşınmasını ve katabolik ürünlerin disk dışına atılmasını sağlar. Negatif yükler kalsiyum ve sodyum gibi pozitif yüklü iyonları çekerek dokunun ozmotik basıncını artırır ve diske su girişini sağlar.

İntervertebral diskin hücre dışı yapısal makromoleküllerini kollajenler, proteoglikanlar ve kollajen olmayan proteinler oluşturur. Hücre dışı matriks, hücrelere olan uzaklıklarına göre perisellüler, teritorial ve interteritorial bölgelere ayrılmıştır. Teritorial ve interteritorial bölgeler kondrositleri çevreleyen ve yakın olan bölgelerdir. Bunlar hücrenin metabolik gereksinimlerini karşılar ve hücre zarını matriks proteinlerine bağlayarak hücrelerin mekanik yüklenmelerden zarar görmelerini önlerler. Perisellüler matrikste kollajen olmayan proteinler ve proteoglikanlar bulunur. Teritorial matriks perisellüler matriksi sarar ve içerdiği ince kollajen lifleriyle hücrelerin çevrelerinde koruyucu bir mekanik kafes meydana getirir. İnterteritorial matriks ise hücre dışı yapının büyük bölümünü oluşturur ve yoğun olarak içerdiği kollajen lifleriyle diskin bilinen mekanik özelliklerinin çoğunu üstlenir. Kollajen liflerin tipleri, yoğunlukları ve dizilimleri bölgesel farklılıklar gösterir (14).

### **2.1.2.3. İntervertebral Diskin Kollajenleri**

Normal erişkinlerde IVD'lerdeki kollajenlerin %80 kadarı fibriller kollajen Tip I ve II'dir. Annulus ve nukleusun kollajen içerikleri biraz farklıdır. Nukleus pulpozus annuler dokuya göre daha kıkırdaksıdır. Nukleusta hücreler başlıca Tip II kollajen ve daha az oranlarda; Tip VI (%15-20), Tip IX (%1-2) ve TipXI (% 3) kollajen sentez eder (4, 11, 12).

Annulus fibrozusta ise başlıca Tip I ve Tip II kollajen ve daha az oranlarda Tip III ve V (% 3), Tip VI (% 10) ve Tip IX (% 1-2) kollajen bulunur (15-17). Eklem kıkırdağına benzerlik gösteren kıkırdak uç plaklarında, temelde Tip II ve az miktarda Tip IX kollajen bulunur. Tip I ve Tip V kollajenler diskin fibroblast hücreleri tarafından üretilirken, Tip II kollajen genellikle kondrositler tarafından sentez edilir. Bu nedenle Tip I kollajen annulus dış bölgesinde, Tip II kollajen ise geçiş zonu, nukleus ve kıkırdak uç tablasında bulunur. Yaşlanma ve dejenerasyon sonucu disk kollajenlerinin nitelik, nicelik ve yerleşim yerlerinde önemli değişiklikler görülür.

#### **2.1.2.4. İntervertebral Diskin Proteoglikanları**

Eski yıllarda mukopolisakkarit olarak adlandırılan proteoglikanlar, bir protein çekirdek ve ona bağlanan polisakkarid zincirlerinden oluşur. Annulus fibrozus ve nukleus pulpozusta 5 farklı proteoglikan bulunur. Bunların başlıcaları, kondroitin sülfat, keratan sülfat, hyaluronik asit ve dermatan sülfattır. Diskte yoğun olarak ilk ikisi bulunur (18-20). İntervertebral diskte daha az oranlarda bulunan ve agregat olmayan küçük proteoglikanlar; dekorin biglikan, fibromodulin ve lumikandır (21-25). Kıkırdak uç tablasının proteoglikanları, eklem kıkırdağının özelliklerine sahiptir. Bunlar diske girip çıkan çözeltileri regüle eder ve ozmotik olarak aktif durumda bulunan disk proteoglikanlarının diskten kaçmasını engellerler (26). Disk dejenerasyonuna yol açan süreçler diskte metabolik değişikliklere neden olur. Bu arada yıkıma uğrayan proteoglikanların bazı komponentleri kana geçer. Serum keratan sülfat düzeyi ölçümünün disk dejenerasyonunun bir göstergesi olabileceği öne sürülmüştür (27).

#### **2.1.3. İntervertebral Disk Dejenerasyonu**

İntervertebral disk yaşlandıkça dejenerasyona uğrar. Klinisyenler anatomik değişiklik olan yaşlanma ile, aynı değişikliklerin klinik semptomlar ile birlikte görüldüğü dejenerasyonu ayırt etmelidirler. İntervertebral disk dejenerasyonu (IVDD) erişkinlerde bel ağrısı durumunda, radyolojik olarak gösterilebilse de, bel ağrısı ile dejeneratif değişiklikler arasında nedensel bir ilişki kurulamamaktadır. IVDD'nun ortak radyolojik özellikleri, bel ağrısı olmayan bir kişide de gösterilebilmektedir. Yaşlanma süresi içerisindeki dejenerasyonun anatomik değişiklikleri ile patolojik olarak değerlendirilen değişiklikler arasında fark yoktur. Büyük olasılıkla yaşlanma ve dejenerasyon aynı patolojik gelişim olup, dejenerasyonda oluşan bazı fiziksel özellikler klinik semptomlara neden olabilmektedir.

Disk hücreleri ve matriksinin yapısal bütünlüğü, intervertebral diskten beklenen biyomekanik işlevlerin yerine getirilmesi açısından önem taşır. Bu bütünlük farklı matriks komponentlerinin niteliksel ve niceliksel sürekliliğine bağlıdır (28-31). Büyüme faktörleri, interlökinler gibi çözünebilir mediatörler matriksin kompozisyonu, mekanik yükler, hidrostatik basınç değişiklikleri ve elektriksel yükler disk ortamındaki hücrelerin metabolik aktivitelerini etkiler. Yapım ve yıkım aktiviteleri arasındaki denge bozulduğunda matriksin biyomekanik özellikleri değişir ve bu da diskin yüklere karşı direncini bozarak disk dejenerasyonuna yol açar (32-36).

Genel olarak disk hernilerinin, yüklenme sırasında intranükleer basıncın, annulus fibrozus direncini aşacak kadar artmasına bağlı olduğu düşünülür. Ancak disk dejenerasyonunun disk herniasyonunun ön koşulu olduğu kabul edilir (4). Çalışmalar, fitiklaşmış disklerde degradatif enzimlerin fazla veya anormal yapıda olduklarını, annulus fibrozusu zayıflatarak posterior veya posterolateral prolapsusa hazırladıklarını göstermektedir. Kadavralar üzerinde yapılan çalışmalarda, aksiyal yüklenmenin posterior disk prolapsusu oluşturmak için yeterli olmadığı, aksiyal yüklenme ile annulusun yırtılmasından çok kırıldık uç tablalarının bombeleşerek kırıldığı, disk materyalinin vertebra korpuslarına herniye olduğu gösterilmiştir (37,38). Yalnızca diskin hafifçe dejenere olduğu durumlarda hiperfleksiyon sırasında posterior disk prolapsusu oluşturulabilmektedir (39).

### **2.1.3.1. İntervertebral Diskin Biyomekaniği**

Disk, viskoelastik bir yapıya sahiptir. Viskoelastisite, hücreler arası matriksin sıvı alışverişine ve yapısal makromoleküllerin varlığına bağlıdır (40, 41).

Diske dışarıdan bir yük uygulandığında matriks makromoleküllerinde bir deformasyon ve interstisyel sıvı kaçıışı olur. Bu olay proteoglikan yoğunluğunu ve osmotik basıncı artırarak dışardan gelen yükün dengelenmesini sağlar. Yük uygulandığında bir başlangıç deformitesi oluşur ve daha sonra doku semptomatik olmayan sınıra kadar yavaşça deforme olmaya devam eder. Yüklenme kalkınca disk dokularında önce erken bir düzelme görülür ve ardından disk yavaş yavaş başlangıçtaki halini alır. Sağlıklı bir diskte deformasyon ve düzelme hızları birbirine eşittir. Elektron mikroskobu ile disk hücrelerinde saptanan sitoplazmik uzantıların mekanik zorlanmaları karşılama yardımcı olabileceği öne sürülmektedir (13, 22). Dejenere diskte proteoglikan kaybı vardır. Bu durumda yük altında sıvı kaçışımının ve dolaylı olarak deformasyon oranının daha büyük boyutlarda olması doğaldır (41, 42).

### **2.1.3.2. Diskin Beslenmesi**

Normal erişkinde diskin yapısında kan damarları, sinir uçları ve lenfatik damarlar bulunmaz. Diskin beslenmesi kıkırdak uç plakları ve disk çevresindeki dokuların aracılığı ile diffüzyon yolu ile olur. İlaç ve antibiyotiklerin diske girişi de sahip oldukları yükler sayesinde benzer yolu izler (43-47). Kan damarlarının yokluğu nedeniyle oksijen yoğunluğu düşüktür ve disk hücreleri temel olarak anaerobik metabolizma gösterirler. Büyük matriks kitlesi içerisinde göreceli olarak çok az sayıda ve dağınık olan hücrelere ulaşmak zorunda bulunan sıvılar ve içerdikleri maddeler matriksi geçmek zorundadır. Matriks maddelerin boyutlarına, yüklerine ve moleküler konfigürasyonlarına göre geçişleri kısıtlıdır. Sinir uçları disk çevresinde ve ancak anulus fibrozusun en dış tabakalarında bulunduğundan sinirsel uyarıların diskin içlerine ulaşması beklenmez (37, 44).

Mononükleer hücreler ve immunoglobulinler de büyük boyutları nedeni ile diske giremediğinden normal diskte hücrel ve humoral immun yanıtlar da oluşamaz (48,49).

Disk hücrelerinde yaşla bağlantılı hızlı bir apoptozis görülür. Bu hücrelerin sentez kapasiteleri oldukça sınırlıdır. Disk hücrelerinin değişik etkenlerin oluşturduğu bozulmaların hepsini karşılayacak güçte olmadığı görülmektedir. Bu yüzden yaşlanan diskin dejenere olması kaçınılmazdır. Buna rağmen disk hücreleri çevreden gelen uyarılara çeşitli makromoleküllerin yapım veya yıkımı ile yanıt verirler. Bu uyarılar fiziksel yüklenme ve hidrostatik basınç gibi mekanik uyarılar şeklinde olabildiği gibi, matriks kompozisyonundaki değişiklikler, büyüme faktörleri, enzimler ve interlökinler gibi mediatörler de disk hücrelerini sentez ya da degradasyon yönünde harekete geçirebilirler (7, 9).

### **2.1.3.3. İntervertebral Diskte Enzimatik Aktivite**

Disk metabolizması ile ilgili proteinazlar arasında metalloproteinazlar öne çıkmış durumdadır. Etkin olabilmeleri için kalsiyum ve çinko iyonlarına ihtiyaç duymaları nedeniyle bu adla anılan üç farklı metalloproteinaz bulunmaktadır:

- 1.Kollajenaz (matriks metalloproteinaz-1; MMP-1)
- 2.Gelatinaz (matriks metalloproteinaz-2 ; MMP-2)
- 3.Stromelizin (matriks metalloproteinaz-3; MMP-3)

Metalloproteinazlar inaktif proenzim formunda hücre dışı matrkse salınmakta, orada aktive olmakta ve matrikste bulunan kollajen ve proteoglikanları degrade etmektedir. MMP-1 temel olarak Tip II ve X kollajenleri, MMP-2 Tip IV ve V kollajenleri, MMP-3 ise daha geniş

bir etki alanına sahip olup büyük matriks proteoglikanlarının çekirdek proteinini, Tip V ve IX kollajenleri degrade etmektedir. Aktive olmuş enzimler diskin kondrositik hücrelerinden salınan doku metalloproteinaz inhibitörü, sitokinler (İnterlökin-1) ve büyüme faktörleri gibi spesifik inhibitörlerle kontrol edilir.

Omurganın değişik bölgelerine ait dejenere veya herniye olmuş disk dokularında immünohistokimyasal, hücre kültürü veya doku ekstralarının biyokimyasal analizi gibi farklı yöntemlerle yapılan çalışmaların hepsinde, MMP-1 ve MMP-3 düzeyleri kontrollere göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Sonuçlar, disk dejeneresansının MMP'lar ile bunların inhibitörleri arasındaki denge bozukluğuna bağlı olabileceğini telkin etmektedir (4, 50, 51).

#### **2.1.3.4. İntervertebral Diskte Sitokinler**

##### **2.1.3.4.1. Kıkırdak Metabolizmasında Rol Oynayan Belli Başlı Sitokinler**

Kıkırdak metabolizmasında rol oynayan belli başlı sitokinler; trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), interlökinler (IL-1, IL-6) ve tümör nekrozis faktör (TNF)'dür. Fibroblast büyüme faktörü (FGF), kondrositlerde DNA sentezini uyarır ve doku onarımını hızlandırır. TGF lokal olarak proteoglikan sentezini artırır fakat Tip II kollajen sentezini azaltır. Ayrıca MMP-3'ün degradatif gücünü ortadan kaldıran doku metalloproteinaz inhibitörü (TMPI)'nün oluşumunu stimüle eder. IGF-1 DNA sentezini artırarak hücre çoğalmasını ve matriks yapımını uyarır. IL-1 ve IL-6 MMP yapımını artırarak matriks yıkımını hızlandırır.

Sitokinlere, intervertebral diskte ancak son yıllarda ilgi duyulmaya başlanmıştır. Sitokinlerin, disk dejenerasyonunun patogeneziindeki rolünü araştıran birkaç çalışma mevcuttur. Nagano ve arkadaşları (28, 29) 33 sıçanda yaptıkları deneysel disk dejenerasyonu araştırmasında; annulusun normalde iç biçiminde olan hücrelerinin yuvarlak kondrositik hücrelere değiştiğini ve kondrositik hücre proliferasyonunun normal annuler hücreleri aştığını ortaya koymuştur. İnsan servikal ve lomber disk hernilerinden hazırlanan hücre kültürleri ile yapılan iki çalışmada; kültür ortamında MMP-1, nitrik oksit (NO), prostoglandin E2 ve IL-6 aktiviteleri yüksek bulunmuştur. Ortamda IL-1 ve TNF reseptör antagonisti proteine rastlanmıştır. Spontan olarak artış gösteren maddelerin disk dejenerasyonunun biyokimyası ve radikülopatinin fizyopatolojisi ile sıkı ilişkisi olabileceği öne sürülmüştür. Bir deneysel

çalışmada annulus fibrozus hücrelerinin, IL-1'e yanıt olarak, degradatif ve inflamatuvar madde üretme kapasitesini araştırmak üzere tavşan annulus fibrozus hücreleri IL-1 ile kültür ortamında karşılaştırılmıştır. Bu sitokinin annulus hücrelerinin proteoglikan sentezini azalttığı, prostoglandin E2 yapımını artırarak hücrelerde Tip II fosfolipaz A2 salgısına neden olduğu ortaya konmuş ve annulus fibrozus hücrelerinin IL-1 tarafından lokal degradatif ve inflamatuvar süreçlere katkıda bulunan faktörler üretmek üzere uyarılabildikleri sonucuna varılmıştır (31).

#### **2.1.3.5. Dejenere İntervertebral Diskte Ekstrasellüler Matriks**

Antoniou ve arkadaşları, insan intervertebral diskinde, *in situ* olarak, matriksin oluşmasına ve turnover'ına yeni bakış açıları getirmiştir. Genç disk, gelişim sırasında aktif matriks yapımı ve Tip II kollajen denatürasyonu gösterir. Yaşlanma ve olgunlaşma, azalmış matriks sentezi ve azalmış Tip II kollajen denatürasyonu ile karakterizedir. Dejeneratif evrelerde azalmış agregan ve Tip II prokollajen yapımı, artmış Tip II kollajen denatürasyonu ve Tip I kollajen sentezi görülür. Bu çalışma; yaşlanma ve hastalıkla bir arada görülen biyokimyasal sentetik ve dejeneratif değişikliklerin anlaşılmasını önemli ölçüde kolaylaştırmıştır (52).

Olczyk, insan intervertebral diskinde yaşa bağlı proteoglikan değişikliklerini ve fitiklaşmış intervertebral disklerdeki makromoleküler değişiklikleri incelemiştir. Yazarın bulgularına göre; insanlarda yaşlanma sürecinde annulus fibrozus ve nukleus pulpozusun glikozaminoglikan (GAG) içeriğinde ilerleyici bir azalma görülmüştür. GAG/kollajen oranı önemli derecede düşmüştür. Disk matriksinin ana bileşenlerinden olan keratan sülfat ve kondroitin sülfat miktarlarında yaşlanmaya paralel bir azalma görülmüştür. Normal ve prolabe olmuş disklerin GAG içeriğinde anlamlı kantitatif fark bulunmuştur. Prolabe olmuş nukleus pulpozusun GAG içeriği aynı yaştaki normal nukleusa göre düşük, kollajen içeriği ise iki kat fazla bulunmuştur (53).

#### **2.1.3.6. İntervertebral Diskin İmmünolojisi**

İntervertebral disk, kan dolaşımından yoksun olduğu için immün sistem tarafından tanınmaz. Bu nedenle normal diskte inflamatuvar hücreler ve antijen antikor kompleksi bulunmaz. Fakat, fitiklaşmış disk dokularında antijen antikor kompleksleri bulunur. Ancak disk ortamını terk eden dokular vücudun immün sistemi ile karşılaşınca yabancı olarak tanır

ve savunma mekanizmalarının istilasına uğrar. Ekstrüde olan disk dokularının kenar bölgelerini infiltre eden mononükleer hücreler ortama yangısal mediatörler salıverir, neovaskülarizasyona yol açar ve kronik inflamasyonu kalıcı kılar (48, 49).

### **2.1.3.7. İntervertebral Disk Dejenerasyonu ve Genetik**

Disk dejenerasyonu ile kesin ilgisi bulunan genetik bir komponentin varlığı bilinmemektedir. Son yıllarda insan agregan geni bölgesinde bir polimorfizm belirlenmiştir. Kawaguchi ve arkadaşları (54)'nın yapmış oldukları çok yeni bir çalışmada, agregan geninin yapısında belirli bir değişiklik (polimorfizm) bulunan kişilerde omurganın birden fazla düzeyde ve şiddetli disk dejenerasyonu görüldüğünü bildirmektedir.

### **2.1.4.İntervertebral Disk Fiziyojisi**

İlk 2 yaşa kadar nukleus pulpozus translusentdir. İkinci dekattan itibaren iç annulus ve nukleusda fibröz doku artışı olurken, hem yükseklik hem proteoglikan kaybı olur. Üçüncü dekatta nukleer fragmantasyon ve fibrozis görülür. Dördüncü dekatta ise progressif miksomatöz dejenerasyon, şişme ve fissür formasyonu oluşur. Sonuçta nukleus pulpozus disorganize, dehidrate, çevresel ve radial yırtıklarla birlikte fragmente olabilir (55-58).

Radyografik incelemelerde dejeneratif disk değişiklikleri 4 evrede incelenir:

Evre 1: Normal disk

Evre 2: Minimal sklerozis ile birlikte disk aralığında daralma veya osteofit formasyonu

Evre 3: Orta derecede skleroz

Evre 4: Ciddi skleroz ile birlikte disk aralığında daralma veya osteofit oluşumu

Annulus fibrozus, fibröz doku lamellerinden oluşur. Fibröz bantlar zıt yönlere 30 derece açı yapacak şekilde oryante olmuşlardır. Annulus fibrozusun iç bantları kartilajinöz plağa, marjinal bölge ise vertebra korpusunun epifiz halkasına ve vertebra korpusunun kemik yapısına tutunur. Kemik yapıya tutunan fibröz bantlar kartilajinöz plağa tutunan bantlardan daha kuvvetlidir. Annulus fibrozus ventralde ve lateralde, dorsaldekilere göre daha güçlü ve dayanıklıdır. Posteriorıda annulus fibrozusun zayıf olması disk herniasyonu gelişiminde önemli bir etkidir. Nukleusu çevreleyen yakın retiküler bantlar mukoid maddeden oluşur. Su içeriği zamanla azalır. Nukleus pulpozusda bulunan su serbest değildir. Yoğun

hidroskopik özellikleri ile makromoleküllere geri dönüşümlü bağlanırlar. Basınca bağlı olarak sıvı hareketi gözlenir. Sıvı yarı geçirgen bir membrandan diskin içine ve dışına hareket eder. Küçük molekülü yapılar örneğin atık maddeler ve besinler de bu yolla disk içine veya dışına hareket edebilmektedirler. Disk içerisindeki sıvı miktarının basınca bağlı değişikliği disk aralığı fizyolojisinde hidrostatik basıncın etkili olduğunu göstermektedir.

#### **2.1.4.1. Disk Deformasyonu**

Annulus fibrozusun dışarı taşması bitişik vertebral korpus üzerindeki periostun kemikten ayrılmasına neden olur. Subperiostal kemik oluşumu (osteofit) görülür. IVD herniasyonu dorsal tarafa doğru olurken osteofitik spurlar genellikle anterior ve lateralde oluşur.

#### **2.1.4.2. Disk Dejenerasyonunun Patofizyolojisi**

Spondiloz, dejeneratif disk hastalığına bağlı vertebral osteofitozis olarak tanımlanmıştır (59). Otopsi serilerinde IVDD erkeklerde 2. dekatta görülmeye başlarken, kadınlarda 3. dekatta oluşmaya başlar. 50 yaşta % 97 oranında IVDD görülür. En sık L3-4 ve L4-5 disklerinde dejenerasyon saptanmıştır. IVD'de oluşan dejeneratif değişiklikler dört oluşumdan birini veya kombinasyonunu içerir:

- 1) Disk mesafesinde azalma
- 2) Disk end plate'inde düzensizlik
- 3) Disk mesafesinde sklerozis
- 4) Osteofit formasyonu

#### **2.1.4.3. İntradiskal Hidrostatik ve Onkotik Basınc**

İntradiskal basıncın kalıcı yükselmesi disk yüksekliğinde azalmaya neden olur. Sonuçta annulus fibrozusta distorsiyon ve gerilme ile dejenerasyonun hızı artar.

IVD'in sıvı içeriği ve vaskülarizasyonu zamanla azalmaktadır. Bunlar ve diğer faktörler diskin dejenerasyonunda önemli rol oynar. Dejenerasyonla birlikte kartilajenöz

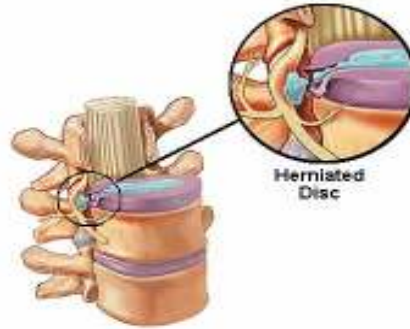


plakda fissürler oluşur. Sonuçta internal herniasyonlar (Schmorl's nodülü) oluşur (60). IVD içerisinde gaz birikir, buna vakum fenomeni denir. Yaygın IVD dejenerasyonu sonucu omurga instabilitesi gelişir.

## 2.1.5. Lomber İntervertebral Disk Dejenerasyonu Kliniği

### 2.1.5.1. Disk Herniasyonu

Disk hernisi, nukleus pulpozusun annulus fibrozusdaki yırtıklar yoluyla dışarı kaçmasıdır. IVD ~ 18 yaşına kadar arteryel kanla beslenir. 20-30 yaş arasında nukleus pulpozusun tümü, annulus fibrozusun çoğunun vasküler beslenmesi oblitere olur. Bu yaştan sonra disk çevreden difüzyonla beslenir. Nukleus pulpozusun su içeriği azalır ve diskin doğal elastikiyeti bozulur. Böylece kuvvetleri nonlineer ve asimetrik biçimde iletir. Annulusun zamanla frajil hale gelmesi ve nukleusun su kaybederek fragmanlar halinde parçalanması herniasyonu kolaylaştırır. Bu nedenle lomber IVD'de yaşla birlikte artan sıklıkta annulus fibrozus yırtıklarının oluşması ve 35-55 yaş grubunda IVD'e en fazla yüklenmenin olması, bu yaş grubunda yüksek oranda bel fitiği görülmesini açıklar. Dejenerasyon gelişimi disk oluşumuna direkt neden olmasa da, güçlü bir predispozan faktördür.



Şekil 3. Herniye olmuş disk

### 2.1.5.2. İnstabilite

Panjabi, dejenerasyon ile omurga instabilitesi arasındaki ilişkiyi *in vitro* çalışmıştır. Yaptığı çalışmada, dejenerasyonun omurga instabilitesine neden olabileceğini göstermiştir. IVDD ile birlikte olan instabilite "mekanik instabilite" olarak adlandırılır. Tanı hastanın

verdiği ağrı anamnezi ile mümkündür. Aktivite ile şiddetlenen, istirahat ile azalan ağrı karakteristiktir. Nöroradyolojik olarak dinamik düz grafilerde hareket segmentinin saptanması, Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) dejenere (siyah) disk görülmesi tanı için önemlidir (61-65).

Hareketli ve hareketsiz bölgeler arasındaki geçiş bölgesi hareket esnasında daha fazla strese maruz kalır. Böylece insanlarda alt servikal ve lomber intervertebral disklerde daha sık dejeneratif değişiklikler görülür.

Lomber dejeneratif disk hastalığında ilk semptom olarak bel ağrısı vardır. Annulusun kabarması posteriora yerleşen sinovtebral duyu sinirlerine bası yaparak ağrıya neden olur. Sinir kökündeki inflamasyon, semptomları artırır.

### **2.1.5.3. Disk Hernilerinin Sınıflandırılması**

**1.Bulging (taşmış) disk:** Komşu vertebral disk kenarlarını aşan hafif konveks görünümdür. Annulus fibrozus ve periferde yerleşen Sharpey lifleri intakttır.

**2.Protrüze disk:** Annulus fibrozusdaki defektten diskin posterior herniasyonudur. Periferdeki Sharpey lifleri veya posterior annulus lifleri intakttır.

**3.Ekstrüde (patlamış) disk:** Annulus fibrozusdaki defektten diskin posterior herniasyonudur. Periferdeki Sharpey lifleri veya posterior annulus lifleri dejenere olmuştur.

**4.Sekestre (serbest fragman) disk:** Annulus fibrozusdaki defektten nükleus pulpozusun ekstrüde olması ve ekstrüde fragman ile herniye olmamış disk arasında ilişkinin olmamasıdır.

Dejenerasyonun ilerlemesi ile nükleus pulpozusda fibrozis oluşur, disk mesafesi daralır, omurga hareketleri azalır, annulusa kuvvetlerin dağılımı tamamen kaybolur. Bu nedenle disk herniasyonu yaşlılarda (60 yaş sonrası) çok nadirdir.

### **2.1.6. Etyoloji – İnsidans**

Lomber disk hernisi, bel ağrısının en sık sebeplerinden biri olup, iş gücü kaybına yol açan hastalıkların ilk sıralarında yer alır. Ayrıca 45 yaşından genç insanların hastalık nedeni ile çalışmadığı günlerin % 15'inden bel ağrısı sorumludur. Bel ağrısının toplumda görülme

insidansı % 5 iken insanların % 80'i yaşamlarının herhangi bir kısmında bel ağrısından yakınır (66-69). Teknolojinin ilerlemesine paralel olarak insanların aktivitelerinin azalması, bel ağrılı hastaların insidansında artışın en önemli nedenlerindedir. Çok sık görülmesine rağmen etiyolojik tanı sadece % 15 hastaya konulabilir. Hastaların % 90'nda hiçbir tedavi yapılmaksızın bir ay içerisinde ağrı şikayeti geçtiği ya da azaldığı için bir çok hasta hekime başvurmaz.

Bel ağrılı hastaların tüm yaşamları boyunca disk herniasyonu olma riski % 2-5'tir. Bel ağrısına radikülopati eşlik etmesi ise % 1'dir (70). Bununla birlikte cerrahi tedavi yapılsın ya da yapılmıyın hastaların % 80'inde radiküler ağrı geriler. Ağrı nedeni ile gerçek cerrahi aday hasta grubu % 2 ile sınırlıdır.

Genç-orta yaş, erkek cinsiyet, ailesel yatkınlık, çevresel faktörler ve geçirilmiş travma sık karşılaşılan risk faktörleridir. Yaşla birlikte bel ağrısı sıklığında belirgin artış görülmekle birlikte disk hernisi insidansı azalmaktadır (71). Bu durum annulustaki sıvı kaybı ve fibroze bağlanmaktadır. Yapılan geniş bir çalışmada kadın erkek oranı 1.6 iken, başka bir çalışmada ise eşit bulunmuştur (72).

## **2.1.7. Semptom ve Nörolojik Muayene**

### **2.1.7.1. Semptomlar**

**1-Bel ve bacak ağrısı:** Uzun süre herhangi bir pozisyonda (oturur, ayakta durur veya yatar) kalmak ağrıyı artırır, sık pozisyon değişikliklerini gerektirir. Öksürme, hapşırma veya ıkınma ile ağrı şiddetlenir. Diz ve kalçayı fleksiyona getirmekle ağrı azalır.

### **2-Alt ekstremitede motor, duyu ve/veya refleks değişiklikleri**

**3-Nörojenik kladikasyon:** Yürüme ile tek veya iki taraflı kalça, uyluk veya bacakta ağrı, karıncalanma ve uyuşmanın artması, bazen kuvvet kaybı, oturma, çömelme veya yatma ile semptomların hafiflemesi şeklinde belirti verir. Sıklıkla lomber stenozu olan hastalarda görülür ve sıklıkla 5. dekattan sonra başlar. Nörojenik kladikasyonun, egzersiz nedeniyle artmış metabolik gereksinim ile birlikte sinir kökünün etrafını saran yapıların basıncına bağlı olarak kanlanmasının bozulması sonucunda lumbosakral sinir köklerinin iskemisinden kaynaklandığı düşünülür.

**4-Üriner sistem semptomları:** Azalmış mesane duyusu en erken bulgu olup; daha sonra üriner sıkışma ve iritatif belirtileri görmek mümkündür. Radikülopatide daha az enürezis ve damlama inkontinansı tarif edilir.

a-Retansiyon semptomları; mesaneyi tam boşaltamama (motor defisit semptomu), mesanede gerginlik (duyu defisit semptomu)

b-İrritatif semptomlar; gündüz ve/veya gece sık idrara çıkma, urge inkontinansı

c-Obstüktif semptomlar; zayıf akma, duraksama, miksiyon sonrası damlama

**5-Kauda ekuina sendromu:**

a-Sfinkter bozukluğu; en sabit bulgu % 90 oranında görülen üriner retansiyondur. Ayrıca üriner ve/veya fekal inkontinans, anal sfinkter tonusunda % 60-80 azalma görülür.

b-Eyer şeklinde anestezi; en sık duyu defisiti, kalça üstünde, posterior-superior uyluklarda ve perineal bölgede görülür. Total perineal anestezili hastalar, kalıcı mesane paralizisine sahip olma eğilimi gösterirler.

c-Önemli motor kuvvetsizlik; genellikle birden fazla sinir kökünü tutar ve çoğunlukla iki taraflıdır.

d-Bel ve/veya bacak ağrısı; genellikle iki taraflı fakat tek taraflı da olabilir.

e-Aşil veya patella refleksinin bilateral kaybı

f-Seksüel disfonksiyon; genellikle geç zamana kadar tespit edilemez.

**2.1.7.2. Fizik Muayene**

1-Skolyoz: Disk hernisi sinir köküne lateralden bası yaptığında, hasta irrite sinirin karşı tarafına deviyebilir olur. Sinir köküne medialden (aksiler pozisyon) bası olduğunda hasta lezyon tarafına doğru deviyebilir olur.

2-Kifoskolyoz: Sinir köküne ciddi bası olduğuna işaret eder.

3-Hasta ağırlı bacağı fleksiyonda tutar.

4-Normal lomber lordozun kaybı ve paravertebral adale spazmı

5-Orta hatta lomber vertebranın palpasyonu lezyon seviyesinde ağrıyı artırır.

6-Sinir kökü sıkışmasını düşündüren bulgular;

A-Radikülopati bulgu ve belirtileri; ilgili sinir kökünün dağılım alanında ağrı, motor kuvvetsizlik, dermatomal duyu değişiklikleri ve refleks değişiklikleri görülür.

B-Sinir gerginliği bulguları;

a-Laseque testi (düz bacak kaldırma testi): Kalça ağrısını "siyatik"ten ayırır. Test;

hasta sırt üstü pozisyonda iken, etkilenmiş bacak ağrı ortaya çıkana kadar bilekten tutularak kaldırılır. 35-70 derece açıda bacak ağrısı veya ağrı sahasında parestezi olursa test pozitifdir. Laseque testi başlıca L5 ve S1 sinir köklerini gerer. Sinir kökü basısı olguların % 83'ünde pozitif Laseque bulgusunu geliştirir.

b-Kontralseque testi: Ağrısız bacağın Laseque testindeki gibi kaldırılması karşı tarafta bacak ağrısına neden olursa test pozitifdir. Aksiller veya santral yerleşimli disk herniasyonu ile uyumludur.

c-Femoral sinir germe testi (ters düz bacak germe testi): Hasta yan yatmış pozisyonda, alt bacağı fleksiyonda, üstteki bacağı ekstansiyonda tutarken muayene eden uyluğu kalçadan ekstansiyona getirir. Uylukta ağrı ortaya çıkması test için pozitiflidir. Çoğunlukla L2, L3 veya L4 sinir kökü basısında pozitifdir.

Kas gücü muayenesinde; hasta topuk üstünde, ayak parmak uçlarında yürütülmeli, yere çömelip kaldırılmalıdır. Topuk üstünde yürüyüş zaafiyeti L5 kök hasarını, ayak parmak uçlarında yürüyüş zaafiyeti S1 kök hasarını ve çömelip kalkmadaki zafiyet de L4 radiksindeki hasarı gösterir.

Refleks muayenesinde; Aşil refleksi daha çok S1 radiksinin etkilenmesini, patella refleksi daha çok L4 radiksinin etkilenmesini gösterir.

Duyu muayenesi; bacağın mediyal yüzü L4, dorsal yüzü L5 ve lateral yüzü de S1 radiksinin tarafından innerve edilir.

### **2.1.8. Ayırıcı Tanı**

Hikaye ve fizik muayene daha çok travma, neoplastik hastalıklar ya da enfeksiyon belirtileri üzerine odaklanmalıdır. Bazen küçük travmalar steroid kullanan ya da osteoporozlu yaşlı kişilerde vertebra fraktürlerine neden olabilir. 50 yaşın üzerinde ve kanser hikayesi olan

hastalardaki bel ağrısı metastatik spinal hastalıklarla bağlantılı olabilir. Göğüs, prostat, böbrek, tiroid ve akciğerde görülen pek çok neoplazm kemik metastazı yapabilir. Bu hastalarda ağrı daha çok geceleri yattıklarında görülür ve istirahat ile kaybolmaz. Ateş hikayesi diskitis için önemli bir bulgudur. C-reaktif protein (CRP), sedimantasyon ve kontrastlı görüntüleme yöntemleri kesin tanıyı koymada yapılması gerekli tetkiklerdir. Ayrıca faset eklem hastalığı, faset eklemi sinovyal kistleri, spondilolistezis de radiküler ağrı yapabileceklerinden disk hernisi ile karışabilir. Dejeneratif kalça eklemi hastalıklarında da bacağı vuran, bacak hareketleri ile artan ağrının olabileceği unutulmamalıdır. Özellikle yaşlı ve dejeneratif zemini olan hastalarda kalça eklem grafileri ve sakrum grafileri çektilmelidir.

Polinöropati, tuzak nöropatiler, özellikle asimetric nöropatiler ve vasküler hastalıklar da disk hernisi bulguları ile karışabilir. Ayırıcı tanı, Elektromiyelografi (EMG) ile yapılır.

Psikojenik kökenli bel ağrılarını organik ağrılardan ayırt etmek oldukça zordur, motor ve duyuşal bozukluklar saptanabilir. Ancak dikkatli yapılan muayene ile görüntüleme yöntemleri arasında korelasyon kurulamaz. EMG ve görüntüleme yöntemleri normaldir. Ciddi motor defisite rağmen derin tendon reflekslerinde korunma da tanıyı koymada önemli bir yol göstericidir. Lomber dar kanalda nörojenik kladikasyonun ön planda olması disk hernisinden ayırt etmede kullanılan önemli bir bulgudur.

### 2.1.9. Görüntüleme Yöntemleri

**1. Direkt Grafi:** Disk hernisinin tanısında kullanılan direkt bir yöntem değildir. Travma ve kalça ekleminden köken aldığı düşünülen ağrılarda tercih edilmesi gereken görüntüleme yöntemidir.

**2. Kemik Sintigrafisi:** Neoplastik bir hastalık şüphesi olduğunda tercih edilir.

**3. Myelografi:** Disk hernisinin tanısında Bilgisayarlı Tomografi (BT) ve Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI)'den sonra kullanılabilirliği azalmıştır.

**4. Bilgisayarlı Tomografi (BT):** Disk hernisinin tanısında ikinci sıklıkla kullanılan tanı yöntemidir. Kalsifikasyon ve kemik yapıyı tanımda MRI'den daha üstündür. Kapalı alan korkusu olan ve manyetik alana girmesi sakıncalı hastalarda BT tercih edilmelidir.

**5. Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI):** Yumuşak dokuları kemiğe göre daha iyi görüntüler. Birçok planda ve farklı sinyallerde görüntü elde edebilme, daha geniş bir alanı

inceleyebilme, sıvı dinamiğini tespit edebilme özelliklerinden dolayı en çok tercih edilen yöntemdir.



**Resim 1.** Lomber MRI'de sagittal kesitte L4-L5 disk hernisi



**Resim 2 .** Lomber MRI'de aksiyal kesitte L4-L5 disk hernisi

**6. Diskografi:** Annulus fibrozusdaki yırtık ve çatlakların tespit edilmesinde kullanılır.

**7. Elektromyografi (EMG):** BT ve MRI gibi görüntüleme yöntemleri sinir kökü basılarını her zaman göstermeyebilir. Bu gibi durumlarda kök basısının olup olmadığını ayırt etmede kullanılır.

## **2.1.10. Tedavi**

### **2.1.10.1. Konservatif Tedavi**

Lomber disk hernisine bağlı siyataljinin doğal seyirinde hastaların büyük çoğunluğunda birkaç ay içerisinde ağrılar kaybolur. Bu da radiklopatisi olan hastalardaki ilk basamak tedavinin konservatif olması gereğini ortaya koyar. Konservatif tedavi en az 6 hafta, en fazla 6 ay olmalıdır (73). Bu tedavi süresince kısa süreli yatak istirahati, önce pasif hareketler daha sonra ise kademeli olarak egzersiz programları uygulanmalıdır. Bir haftadan fazla süren yatak istirahatinin, kas gücünde zayıflamanın başlaması, psikolojik gerilim, depresyon gibi olumsuz sonuçlara yol açacağından faydası yoktur. Erken aktivite ise ağrının daha hızlı gerilemesine ve fonksiyonların daha hızlı kazanılmasına olanak sağlar. Ancak bu esnada hastalara ağır kaldırmaktan, eğilip bükülmek gibi zorlayıcı hareketlerden kaçınmaları önerilmelidir ve hastalar düzgün postür, uyuma pozisyonları ve kaldırma teknikleri ile ilgili hareketler konusunda eğitilmelidir. Yürüyüş, bisiklet sürmek ve yüzme gibi düşük kondisyonel egzersizler abdominal ve sırt kaslarının gclendirilmesi için uygun olan sporlardır. Bu hastalara akut dönemde ağrılarını hafifletmek amacı ile ilaç tedavisi de verilebilir. Fakat tolerans gelişmesi nedeniyle sınırlı kullanımı vardır. Başlangıçta kısa süreli narkotikler, nonsteroid antiinflamatuvarlar, miyorelaksanlar ve sedatifler kullanılabilir. Ancak 2-3 haftadan daha uzun süre kullanılmamalıdır. Bel ağrılı hastaların sık başvurduğu diğer bir yöntem ise korse kullanmaktır. Ancak adale zayıflığına neden olduğu ve ağrıyı arttırabileceği için günümüzde kullanımı önerilmemektedir.

Hastalara istirahat süresince ve sonrasında ağrı kesiciler, kas gevşeticiler, steroidler ve psikojenik yapıya sahip olanlarda trisiklik antidepressan ilaçlar verilir. Trisiklik anti depresanlar ağrı kesici ve kas gevşetici etkiye sahiptir. Aynı zamanda nöropatik ağrının ortadan kaldırılmasında da etkin bir gruptur.

### **2.1.10.2. Cerrahi Tedavi**

Lomber disk hernisinin cerrahi tedavi endikasyonları;

1-Kauda equina sendromu: Acil cerrahi endikasyondur. Genellikle orta hat L4-L5 disk hernilerinde görülür. Çoğunlukla önceden var olan bir spinal stenoz ile üst üste biner. Prevalans sadece cerrahi gelen disk herniasyonlarının % 1-2'sidir.



2-İlerleyici veya akut gelişen kuvvet kaybı: Acil cerrahi endikasyondur. Motor kuvvetsizliğinin akut gelişimi veya ilerlemesi süratli cerrahi dekompresyon için bir endikasyon olarak düşünülür.

3-Medikal tedavide yetersizlik:

- 2 hafta yatak istirahati ve uygun medikal tedaviden 4-6 hafta sonra semptomların belirgin olarak devam etmesi veya 3 ay sonra semptomların devam etmesi

- Siyatik ağrısının 2-3 hafta yatak istirahatine rağmen devam etmesi veya artması

- Şiddetli siyatikaljinin 1 hafta yatak istirahati ve yeterli narkotik ağrı medikasyonuna rağmen ağrısı tolere edilemeyecek şekilde devam eden antalgik postürdeki hastalar

4-Sık tekrarlayan disk hernisi atakları: Duyu ve refleks değişiklikleri teşhise yardımcı eder fakat cerrahi için bir endikasyon teşkil etmez. Ayrıca prognozu da belirlemez.

## **A. Cerrahi Teknik**

### **I. Standart Cerrahi Girişimler**

1-Lomber hemiparsiyel laminektomi ve diskektomi: Yaygın olarak uygulanmaktadır.

2-Mikrodiskektomi: Standart prosedüre benzer, bununla birlikte daha küçük insizyon kullanılır. Bu tekniğin avantajı, kozmetik, daha kısa hastanede kalış süresi ve daha az kan kaybının olmasıdır. Bir çok klinikte uygulanmaktadır.

**1. İntradiskal Prosedürler:** Kullanım alanı oldukça sınırlıdır.

1-Otomatik perkütan lomber diskektomi

2-Perkütan endoskopik diskektomi

3-Laser disk dekompresyonu

4-Kemonükleolizis

**2. İntervertebral veya Posterior Füzyon:** Kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Dejeneratif disk hastalığı, mekanik instabilite veya spondilolisteziste; posterior veya anterior interbody kafes füzyon, transpediküler vida ve plak/rod sistemi ile posterior füzyon yapılmaktadır.

Cerrahi teknik seçiminde önemli olan birinci husus cerrahın uyguladığı tekniğe olan yatkınlığıdır. İkinci husus ise doğu cerrahi endikasyondur. Bunlara dikkat edildiği takdirde

cerrahi başarı oranları da artacaktır. Cerrahi alternatifler düşünülürken disk hernisinin anatomik pozisyonu ve beraberinde eşlik eden başka bir patolojinin olup olmadığı mutlaka göz önüne alınmalıdır (74, 75).

### **2.1.10.3. Cerrahi Tedavi Komplikasyonları**

#### **A. Yaygın Komplikasyonlar**

1-Enfeksiyon; % 2 oranında yüzeysel yara enfeksiyonu gelişir. İleri yaş, uzun süreli steroid kullanımı, obezite ve diabetes mellitus predispozan faktörlerdir. Çoğu enfeksiyonda etken Stafilococcus aureus'tur. < % 1 oranında derin yara enfeksiyonu gelişir. % 0.5 diskitis ve % 0.67 epidural apse gelişme durumu sözkonusudur.

2-Motor defisitinin artması; % 1-8 oranında görülür.

3-Dural yırtılma; yeniden yapılan ameliyatlarda risk % 52'ye kadar çıkar.

#### **B. Yaygın Olmayan Komplikasyonlar**

Vertebral cisimlerin önünde uzanan yapıların (arter, ven, sinir vb.) yaralanması; diskektomi yapılırken kullanılan aletler disk mesafesinden öne ulaşırsa buradaki yapıları yaralayabilir.

**2.1.10.4. Prognoz:** Lomber laminektomi ve diskektomi yapılan hastaların % 90-95'inde başarılı klinik sonuç elde edilebilir. Semptom süresi 3-6 aydan kısa olanların sonuçları daha iyidir. Opere edilen olguların % 10 kadarında yeniden cerrahi girişim gerekmektedir.

Intervertebral disk yapısındaki öneminden dolayı kollajen metabolizması disk herniasyonunun etiyopatogenezinde üzerinde durulan risk faktorlerinden biri olarak moleküler biyokimyada güncelliğini koruyan konular arasında yer almaktadır. Bu yönde yapılan çalışmalarda özellikle matriks metalloproteinazlar üzerinde durulmuştur (4,50,51). Kollajen metabolizmasında meydana gelen değişiklikleri incelemek için özellikle yıkımı için çok esansiyel bir enzim olan prolidaz da pek çok araştırmaya konu olmuştur (76,77,78,79,80). Fakat bel fitiği hastalarında prolidaz aktivitesini araştıran herhangi bir araştırmaya bu güne kadar literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle bel fitiği olan hastalarda

prolidaz enzim aktivitesini ilk olarak inceleyerek bu hastalarda kollajen metabolizmasının etkilenip etkilenmediğini ortaya koymaya çalıştık. Bunun için de tezimizin bu bölümünde prolidaz enziminin yapı ve fonksiyonlarından bahsedeceğiz. Daha sonra da oksidatif-antioksidatif denge üzerine yoğunlaşarak bu hastalarda oksidatif stres indeksini inceleyeceğiz.

### **3. PROLİDAZ**

#### **3.1. Prolidazın Tanımı**

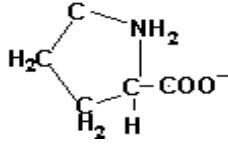
Prolidaz hidrolazlar sınıfına ait,  $Mn^{+2}$  ile aktive olan bir metalloenzimdir (81,82). Uluslararası sınıflandırmaya göre; EC 3.4.13.9 sınıfında yer alır. Hidrolazlar çeşitli bağların hidrolizini kataliz ederler. Bu bağlar; C-O, C-N, C-C ve fosforik anhidrit bağını da içeren bazı bazlardır. Prolidaz enzimi karboksil terminal pozisyonundaki prolin veya hidroksiprolin içeren dipeptitlerin hidrolizini katalizler.

Prolidaz, domuz intestinal mukoza artıklarında aminopeptidaz ve karboksipeptidaz aktivitelerinin araştırılması sırasında keşfedilmiştir. Prolidaz, bir alt grup olarak saflaştırılmış, domuz böbreği ve domuz, sığır ince bağırsağından elde edilmiştir. 1937 yılında Bergmann ve Fruton glisil-prolin'in önceden bilinen peptidazlardan farklı, intestinal mukozal bir enzim tarafından hidroliz edildiğini saptamışlardır. O tarihten itibaren prolidaz adı verilen bu enzimin pek çok memeli dokusunda varlığı gösterilmiştir (83,84). Enzim yaklaşık 70 yıl önce bulunmasına rağmen önemi 35 yıl önce eksikliği çalışmaları yapıldığında anlaşılmıştır (85).

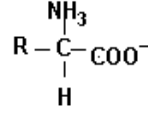
#### **3.2. Prolin**

Prolin esansiyel olmayan bir imino asittir. Glutamatın halka yapısındaki bir türevidir. Prolin sentezinde glutamatın  $\gamma$ -karboksi grubunun ATP ile tepkimeye katılması sonucu  $\gamma$ -glutamilfosfat oluşmaktadır. Bunun NADPH ile indirgenmesi sonucu oluşan glutamat  $\gamma$ -semialdehit sonra kendiliğinden  $\Delta$ -prolin-5-karboksilat oluşturmak üzere halkalaşmakta ve bu yapı indirgenerek prolini oluşturmaktadır. Prolin katabolizmasında prolin oksidaz ile prolinden oluşan  $\Delta$ -prolin 5-karboksilat, glutamat  $\gamma$ -semialdehit ile ornitine transamine olabilmekte veya glutamata oksitlenmektedir.

Prolinin diğere amino asitlerden farkı R grubunun hem amino grubu hemde  $\alpha$  karbon grubuna bağılı olarak siklik bir yapıya yol açmasıdır (Şekil-6).



prolin



amino asit

**Şekil-4.** Prolin ve diğere amino asidin genel yapısal görünümü

Benzersiz yapısal özellikten dolayı prolin bir peptit sekansına girdiği zaman önemli konformasyonel özellikler gösterir. Bu aminoasidin siklik yapısı polipeptit omurganın yapısal yönlerine temel sınırlamalar getirmektedir. Prolin siklik yapısının sonucu olarak hiçbir fonksiyonel grup içermez ki bu durumda hidrojen bağına veya peptit bir bağına rezonans stabilizasyonuna katılmayı engeller bu nedenle prolin  $\alpha$  helix veya  $\beta$  tabakalı sekonder yapılarına uyumlu olmayan tek amino asittir. Kemik, tendon ve destekleyici membran dokularını ana bileşeni olan kollejen, prolinin yapısal özelliklerine belirgin bir şekilde bağılıdır.

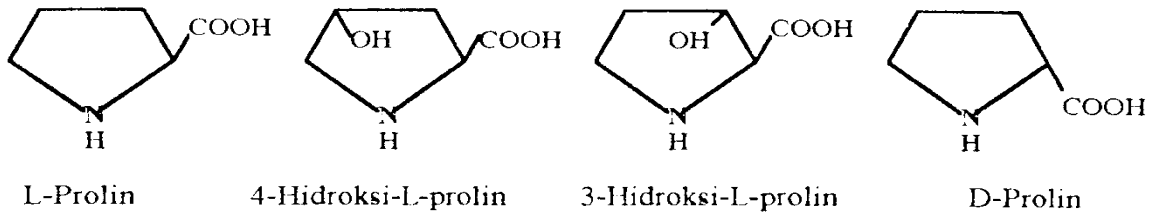
Prolinin siklik yapısı  $\alpha$  karbon ve Nitrojenin bir peptit bağındaki rotasyon açısını sınırlamaktadır ki normal olarak bitişik amino asitlerin reel grupları arasındaki siterik engelleme veya elektrostatik repulsiyona bağılıdır. Prolin potansiyel bir yapı kırıcı olan ve peptit zincirlerinin yönünü değıştirme eğilimine sahip, peptit zincir içine sabit bir eğim takdim eder. Proteinlerin yüzeyindeki ters bir dönüş veya saç tokası eğimi şeklinde önemli yapısal olayın proteinler içindeki en önemli sonucu prolin tarafından oluşturulmasıdır.

Prolin ve hidroksiprolin, kollajen yapısında yer alan en önemli amino asitlerdir. Prolin türevleri olan 3-hidroksiprolin ve 4-hidroksiprolin karışık fonksiyonlu oksijenazlar kullanılarak polipeptit zincirinde bulunan prolin kalıntılarından elde edilmektedir. Hidroksiprolinin hidroksiprolin oksidaz ile parçalanması sonucunda glioksalat ve pirüvat oluşmaktadır.

Prolin, biyolojik olarak aktif peptitlerin enzimatik degradasyonuna karşı korunmasını sağlamaktadır. Bu durum peptit veya protein prekürsörlerinin post transyasyonel modifikasyonlarının regülasyonunda açıkça bellidir. Polipeptit zincirinin içinde yerleşik olan prolin amino asitleri, zincirlerin enzimatik süreci öncesinde modifikasyon bölümünde

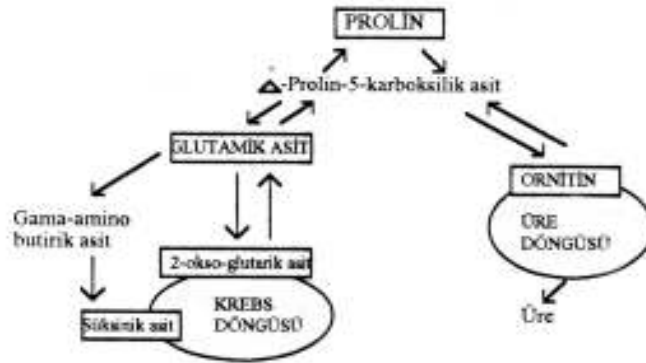
bulunur ve polipeptit zincirinin hassasiyetini proteolizle sınırlayan yapısal unsurlar olarak hareket eder. Bu durum peptitlerin post-translasyonel modifikasyonunda görev alan ekzopeptidazların özelliği ile ilişkili araştırmalarda gösterilmiştir. Pek çok biyolojik olarak aktif peptitlerin amino ucuna yakın yerlerde ortaya çıkan prolin gözlemiyle desteklenmektedir .

Prolin ve hidroksiprolin prolidino halkasındaki azot atomuna bir hidrojen atomunun girmesi ile oluşmaktadır. Bunlar genelde imino asit ismiyle adlandırılır. L-prolin amino asitlerin hücre dışı havuzunun temel bileşenidir. Bunu sadece glutamin ve alanin amino asitleri takip eder. Hidroksiprolin öncelikle vücut sıvılarında oligopeptitlerde bulunmaktadır. İnsanlarda hidroksiprolinin yapısı 4-hidroksi –L-prolin şeklindedir ve vücut sıvılarında daha az bulunur. Protein yapısında bulunan hidroksiprolin peptide bağlı prolinin hidroksillenmesi ile oluşmaktadır (86).



**Şekil-5.** Memeli kollajeninde bulunan prolin ve hidroksiprolin izomerleri

Prolin ayrıca Krebs ve üre döngüleriyle metabolik olarak bağlantılıdır.  $\Delta$ -prolin-5-karboksilik asit prolin metabolizmasında iki döngüyü birbirine bağlayan bir pozisyondadır. Prolinin karbon zincirinden Krebs döngüsüne geçişi, tüm dokularda bilinen klasik yoldan 2-oksaglutarik asit metabolizması ile olur (87).



**Şekil-6.** Prolinin metabolik yollarla bağlantısı (Scriver 1978)

### 3.3. Prolidazın Yapısı

Prolidaz enzimi birçok memeli dokusunda ve mikroorganizmalarda dağılım gösterir. Doğal, sitoplazmik, homodimerik bir metalloenzimdir.  $Mn^{+2}$  prolidaz enzimi aktivitesini 5-10 kat arttırmaktadır (K.E.66).  $Mn^{+2}$ 'a ek olarak enzimin maksimum aktivitesi için aktif merkezinde arjinin ve anyonik amino asit artıklarının olması gerekir (86).

Proteazlar hep monomer yapıda olmasına rağmen tüm prolidazlar dimer yapı gösterirler ve ancak bu şekilde katalitik aktivite gösterirler (88). Prolidaz glikoprotein yapısındadır ve ağırlık olarak %5 karbonhidrat içermektedir. Prolidazın saptanan sekonder yapısında  $\alpha$ -heliks (%33),  $\beta$ -tabakalı (%41) ve 30 potansiyel beta bağlantı bölgelerine eşit bir şekilde dağılmış hidrofobik ve hidrofilik alanlar bulunmaktadır. Enzimin primer sırası bilinen proteinlere benzemez fakat bazı sıraları (%29'dan fazlası)  $F_1$ -ATP az'ın  $\alpha$  ve  $\beta$  subünitelerinin sırasına benzerlik göstermektedir (86,89).

Prolidaz enziminin aktif merkezinde tiyol grubu yer alır ve bu grup bloke edilirse aktivite düşer. Bu da sisteinin enzimin aktivitesi için gerekli olduğunu gösterir. Doğal enzim için optimum pH: 7.6-7.8'dir ve izoelektirik nokta pH:4.4-4.5 olarak saptanmış olup bu değer yapıdaki asidik amino asitlerin varlığını belirtmektedir (86). Enzimin karakteristiği araştırıldığında DEAE (Dietilaminetil) selüloz dizi kromatografisinde prolidazın iki pik verdiği görülür (88).

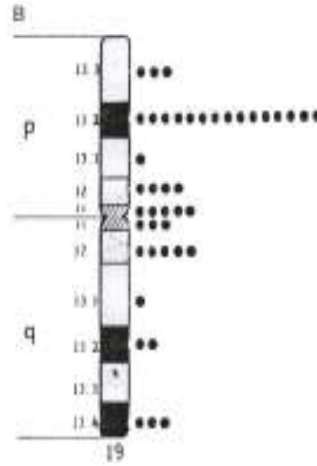
Bai Hu 1992 yılında yapmış olduğu çalışmada prolidazda her monomer için iki aktif bölgenin olduğunu saptamış ve enzimin duruma bağlı olarak bu iki aktif bölgenin substrat spesifikliği ve  $Mn^{+2}$  ile preinkübasyon ortamındaki aktivasyon bakımından da farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur (88).

### 3.4. İnsan Prolidazının Primer Yapısı ve Gen Lokalizasyonu

Prolidaz geni sembolü PEPD'dir ve insanda 19 numaralı kromozomun kısa kolunda lokalizedir (19p 13,2 bölgesi). İnsan cDNA 'sı 1482 baz çiftinin okunmasıyla oluşur bu da 493 amino aside karşılık gelmektedir (89). Enzimin komplementer DNA klonları insan karaciğeri ve plesental cDNA bankalarında izole edilmiştir.

Prolidazın nükleotit sırası saptanmıştır. Enzim amino asit olarak X-Ala-Ala-Ala sırası ile başlamaktadır (90). Prolidaz geni (PEPD) polimorfik allelleri içerir, bu aktiviteyi

engellemez ve nadir alleller prolidaz eksikliğine neden olmaktadır (86). Amino asit sırasının saptanması ve gen lokalizasyonu, enzimin eksikliğinin sebep olduğu kalıtsal hastalığın temelini anlaşılması bakımından önemlidir. Prolidazın genomik sırası oldukça geniştir. En az 130 kb ve 15 ekson içermektedir. Ekson intron bağlantılarındaki tüm konformasyonlar GT/AG kuralına uymaktadır. Kodlama sırası genomik sıranın % 2 'sinden oluşur.



Şekil 7. Prolidaz genini içeren kromozom 19 (Endo ve Taloue 1989)

### 3.5. Prolidazın İzoenzimleri

Dietilaminoetil selüloz dizi kromatografisi (DEAE) ile deri fibroblast kültürüleri ve normal insan eritrositlerinden ayrıştırılan prolidazın 2 formunun olduğu görülmüştür (91). Bunlar prolidaz I ve prolidaz II olarak isimlendirilmiştir. Bu iki izoenzim substrat spesifitesi ile bazı kimyasal özellikler bakımından farklılıklar gösterirler (92). Bu iki izoenzimi ilk izole eden Butterworth ve Priestman olmuştur (1985). Sonra Myara ve arkadaşları 1987 ve 1989 yılında (93,94), Ohhashi ve arkadaşları ise 1990 yılında izoenzimleri izole etmeyi başarmışlardır.

İzoenzimlerin molekül ağırlıkları saptanmış ve prolidaz I'in molekül ağırlığının 112 kDa olduğu ve birbirini tamamlayan eşit molekül ağırlığında 2 subüniteden oluştuğu (56kDa) bulunmuştur (92). Prolidaz II 'nin ise molekül ağırlığının 185 kDa olduğu ve birbirine eş iki subüniteden (95 kDa) oluştuğu gözlenmiştir (95,96).

Prolidaz I tüm insan dokularında bulunur. Yapılan çalışmalarda prolidaz I 'in tüm iminodipeptitlerle reaksiyona girmesine rağmen gly-pro dipeptidini tercih ettiği bulunmuştur. Cosson ve arkadaşları 1992 'de prolidaz II nin gly-pro dipeptidine karşı düşük bir aktivite gösterdiğini ve bu izoenzimin plazmada bulunmadığını kaydederek preinkübasyonun

uzaması ile aktivitenin önemli ölçüde düştüğünü göstermişlerdir. Prolidaz II'nin en yüksek aktiviteyi gly-pro yerine met-pro 'ya karşı gösterdiği saptanmıştır (92).

Prolidaz I'i *in vitro* tespit etmek için optimum şartlar; 1Mm MnCl<sub>2</sub> konsantrasyonunda 24 saat 37°C'de preinkübasyon olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Mn<sup>+2</sup> konsantrasyonunun yükseltilecek zamanın azaltılabileceğini ya da yüksek preinkübasyon ısısı, düşük MnCl<sub>2</sub> konsantrasyonu ve düşük preinkübasyon zamanı kullanılabileceği kaydedilmiştir (97). Cosson ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda prolidaz I ve prolidaz II'yi kromatografik olarak ayırdıktan sonra izoenzimlerin farklı doku dağılımları gösterdiklerini bulmuşlardır (Tablo 1) (98).

**Tablo-1.** Prolidaz I ve II izoenzimlerinin doku dağılımları (%) (Cosmos ve Myara 1992)

	<b>Prolidaz I</b>	<b>Prolidaz II</b>
<b>Karaciğer</b>	53	47
<b>Böbrek</b>	62	38
<b>İleum</b>	53	47
<b>Jejunum</b>	53	47
<b>Duadenum</b>	42	58
<b>Pankreas</b>	22	78
<b>Mide</b>	42	58
<b>Dalak</b>	52	78
<b>Beyin</b>	36	64
<b>Beyincik</b>	44	56
<b>Kalp</b>	37	63
<b>İskelet kası</b>	34	66
<b>Eritrositler</b>	51	49

Araştırmacılar karaciğer kaynaklı prolidaz II'nin karaciğerde inhibe edildiğini saptamışlardır. Bu inhibisyona ise plazma proteinlerinin sebep olduğunu belirtmişlerdir. Haptoglobilin, α<sub>2</sub> makroglobulin ve α<sub>1</sub> antitripsinin prolidaz II'nin aktivitesinde etkili olmadığı, fakat saf albuminin altı saatlik inkübasyondan sonra aktiviteyi ortadan kaldırdığı



görülmüştür. Albuminin bu inhibitör etkisine dayanarak insan plazmasında prolidaz II'nin aktivitesinin olmadığı açıklanmıştır (98).

Saf insan böbrek prolidaz I'in agaroz jel elektroforezindeki görüldüğü bölge  $\alpha_1$  globulin bölgesidir. İzoelektrik noktasının 4,65 olduğu titrasyon eğrisinden bulunmuştur. Bu nokta insan ve hayvan dokularındaki diğer prolidazlar içinde geçerli olmaktadır.

Çeşitli insan dokularından alınan prolidaz I izoenzimi tavşan immunglobulinleri ile çapraz reaksiyon verir fakat aynı immunglobulinler prolidaz II ile reaksiyon vermez. Bu durum hepatik fibrozis ve prolidaz eksikliği olan hastaların dokuları ve plazmalarından prolidaz I araştırmalarında bir spesifik immünoassay yöntem geliştirilebileceğini akla getirmiştir (97).

### **3.6. Prolidaz İnhibitörleri ve Aktivatörleri**

Yapılan çalışmalarda enzimin aktivasyonu için gerekli olan  $Mn^{+2}$  iyonu yerine başka metal iyonlarının ilavesi ile inhibisyon olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmalar domuz böbrek prolidazı üzerinde 1957 yılında yapılmıştır.  $Fe^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Ag^{+1}$ ,  $Hg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  ve  $Pt^{+4}$  iyonlarının prolidazı inhibe ettiği bulunmuştur. Ortalama 0,001-0,0004M aralığındaki konsantrasyonlarda glutasyon kullanıldığında optimal stabilizasyon ve aktivite sağlandığı ancak glutasyonun yüksek konsantrasyonunun inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur. Aynı araştırmacılar iyodoasetamin ve p-kloromerküri benzoatın da enzimi inhibe ettiğine değinmişlerdir (84).

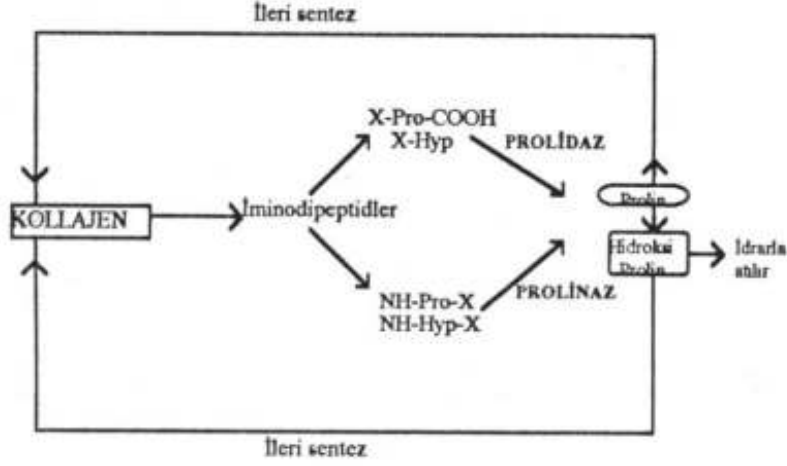
Prolidazın substrat analogu olan asetilprolin ve trans-1,2 siklopentadikarboksilikasit tarafından kompetatif inhibisyonunda  $K_1$  'in pH 'ya bağlı olarak izledikleri yolu araştırdıklarında enzimin fonksiyonel grubu ile substratın pKa: 6,6 'da bağlandığını bununla birlikte bu maddelerin inhibisyonunun farklı yollar izlediğini görmüşlerdir (99).

### **3.7. Prolidazın Kollajen Yapım ve Yıkımında Önemi**

Kollajenler, hayvansal bağ dokunun temel bileşeni olup vücutta en fazla bulunan proteinlerdir. Bağ doku iskeletinin yapısını oluşturan kollajen, inflamasyon ve yara iyileşmesinde temel rol oynar. Kollajenin aminoasit kompozisyonu %33 glisin, %20-25 prolin ve hidroksiprolin, %5-11 lizin ve hidroksilizinden oluşur. Farklı genler tarafından

kodlanan en az 15 tip kollajen vardır. Tip I,II,III,V ve XI fibriller kollajen olarak isimlendirilir. Kollajenler birçok dokuda fibroblastlar tarafından sentezlenirler. Ribozomlarda preprokollajen olarak başlayan sentez sitozolde prokollajen şeklinde devam eder ve hücre dışı alanda tropokollajen ve kollajen oluşumu ile sonlanır. Kollajen molekülleri alfa zincirleri adı verilen, birbiri etrafında üçlü heliks halinde sarılarak ip benzeri yapı oluşturan üç polipeptitten meydana gelir. Polipeptit yapılarının her üç pozisyondan birinde en küçük aminoasit olan glisin bulunur. Glisin heliksin üç zincirinin bir araya geldiği kısıtlı alana sığmaktadır. Glisin kalıntıları, Gli-X-Y olarak tekrarlayan, X'in genelde prolin ve Y'nin hidroksiprolin veya hidroksilizin olduğu zincirin bir parçasıdır. Kollajen diğer bir çok proteinde bulunmayan hidroksiprolin ve hidroksilizin içerir. Hidroksiprolin kollajenin üçlü heliks yapısının dayanıklılığını sağlamada önemlidir. Kollajenin yarı ömrü 50-300 gündür. Bu ömür; gelişme, büyüme, doku yapımı ve yara iyileşmesi gibi durumlarda uzar. Kollajenlerin yıkımı genellikle nötral pH'da aktif olan pek çok matriks metalloproteinazlarının (kollajenazlar) sinerjistik aktivitesinin bir sonucudur. Bununla birlikte jelatinaz, stromelizinler, polimorf elastaz ve katepsin gibi nonspesifik proteinazlar da bu yıkıma katılırlar. Kollajenazlar; fibroblast, kondrosit, osteoblast ve endotelial hücrelerden latent proenzim formunda salınırlar ve plazminle aktivasyonu takiben çapraz bağlı kollajeni parçalayarak dipeptitlere ayırırlar. Bu dipeptitler de prolidaz, prolinaz ve diğer dipeptidazlar tarafından serbest aminoasitlere parçalanırlar.

Prolidazın bütün biyolojik fonksiyonunun prolin döngüsüyle beraber kollajen dejenerasyon ürünleri ve diğer Xaa-Pro dipeptidlerin metabolizması olduğuna inanılmaktadır. Prolidaz, C-terminalinde amino asidi prolin veya hidroksiprolin olan dipeptidleri hücre içinde hidroliz eder. Prolin yeniden döngüye girer ve yeni protein sentezinde kullanılırken hidroksiprolin idrarla atılmaktadır (81,101). Kollajen yapısındaki amino asitlerin yaklaşık %25'ini prolin ve hidroksiprolin oluşturduğundan, prolidaz kollajen yıkımında önemli rol oynamaktadır (102). Prolidaz, hücre içi protein yıkımının son basamağında, özellikle yüksek miktarda prolin içeren prekollajenin yıkımı aşamasında rol oynamaktadır (97,98). Enzim için substrat kaynağı kollajen olup imminopeptidler kollajenin yıkımının son basamağında ortaya çıkmaktadır. Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri aşağıdaki şekilde görülmektedir (Şekil-6).



**Şekil 8.** Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri (Myara ve Myara 1984) (112)

Prolidaz, beslenme ile alınan proteinlerden ve vücuttaki depo kollajeninden imino asitlerin geri kazanılmasında önemli rol oynar (103). Prolidaz, C-ucunda prolin veya hidroksiprolinin imino azotunu içeren peptid bağı bulunduran bileşiklerin hızla hidrolizini katalizleyen tek enzim olduğu için spesifitesi yüksektir (88). Prolidaz eksikliği prolinin normal döngüsündeki bozulmayla sonuçlanır. Prolidaz eksikliğinde büyük miktarda hidroksiprolin üre ile dışarı atılır. Prolidaz enzim aktivitesi eritrosit, lökosit ve fibroblastlarda çok düşüktür. Etkilenen hasta bireylerde prolidaz enzim aktivitesi saptanamaz. İmino peptidüri, aynı zamanda raşitizm, hiperparatiroidizm ve paget hastalığı gibi durumlarda da tanımlanır. Fakat İmino peptidüri prolidaz eksikliğinde çok daha yüksektir.

Prolidaz eksikliği cilt ve diğer kollajen dokularda anormalliklerle karakterize bir sendromla sonuçlanır. Bu nadir görülen genetik prolidaz eksikliği otozomal resesif olarak geçmektedir. Prolidaz geni başka bir kalıtsal rahatsızlık olan miyotonik distrofi ile ilgili olması açısından önemlidir.

Prolidaz enzimi uzun zamandan beri bilinmesine rağmen önemi, son yıllarda eksikliği ile ilgili çalışmalarla iyice anlaşılmıştır (104-106). Bu yüzden bu konuda az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğu da eritrosit prolidazı ile ilgili olup serum prolidazı hakkında çok şey bilinmemektedir. Prolidaz enziminin genetik eksikliğinin sonucunda mental gerilik, tekrarlayan infeksiyonlar ve deri lezyonları ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıktığı bildirilmiştir (103,107). Prolidaz eksikliği

olan kişilerde prolidaz I aktivitesinin deri fibroblast kültüründe ve kan hücrelerinde azaldığı da gösterilmiştir (108).

Fetal büyüme sırasında kollajen turnoverinin yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Dismatür bebeklerde prolidaz aktivitesi (amniyotik sıvıda) anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu nedenle prolidaz aktivitesinin fetal matürasyonun derecesini gösterdiği düşünülmektedir. Amniyon sıvısında ölçülen prolidaz aktivitesinin fetal matürasyonun ve gelişme geriliğinin bir indikatörü olarak kullanılabilmesi öne sürülmektedir. Ayrıca kollajen metabolizmasında bozuklukla seyreden silikozis hastalığının tedavisinde de prolidaz enziminin kullanılması hedeflenmektedir. Böylece hızla kollajen yıkımı ile seyreden silikozis hastalarında prolidaz enzim aktivitesinin artırılması tedavide faydalı bir yaklaşım olarak düşünülmektedir (109).

#### **4. SERBEST RADİKALLER**

Bilindiği gibi atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar, belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya eğilimlidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momenti dengelenmemiş bu tek elektron; atoma (ya da moleküle) büyük bir aktiflik kazandırır. En dış yörüngede eşlenmemiş bir elektronu bulunan molekül ya da molekül gruplarına “radikal” adı verilmektedir ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle gösterilir ( $R\cdot$ ,  $R^-$ ) (110,111).

##### **4.1. Reaktif Oksijen Türleri**

Oksijen 8 atom numaralı doğada dioksijen ( $O_2$ ) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu, enerji düzeylerinde bulunan elektronlarının yapısıyla ilişkilidir. Oksijen molekülündeki, aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde “singlet oksijen” oluşur. Orbitallerden birine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse “oksijen radikali” elde edilir.

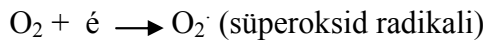
**Tablo 2.** Oksijen türevi bileşikler

<b>Radikaller</b>	<b>Radikal Olmayanlar</b>
Hidroksil ( HO <sup>·</sup> )	Hidrojen Peroksit ( H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Alkoksil ( RO <sup>·</sup> )	Singlet Oksijen ( O <sub>2</sub> <sup>↑↓</sup> )
Peroksil ( ROO <sup>·</sup> )	Ozon ( O <sub>3</sub> )
Superoksit ( O <sub>2</sub> <sup>·</sup> )	Hipoklorid ( HOCl )
Nitrik oksit ( NO <sup>·</sup> )	Lipid hidroperoksit ( LOOH )
Azot dioksit ( NO <sub>2</sub> <sup>·</sup> )	Peroksinitrit ( ONOO <sup>·</sup> )

Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdan kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Sonuçta nonradikal yapıyı radikal şekle dönüştürebilirler (110,112).

#### **4.1.1.Süperoksit Radikalleri (O<sub>2</sub><sup>·</sup>)**

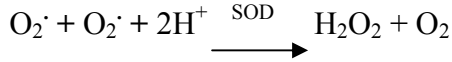
Süperoksit radikalleri (O<sub>2</sub><sup>·</sup>), hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu ile üretilmektedirler. Süperoksit oluşumu; a-) elektron taşıyıcısının redoks durumuna ve b-) ortamdaki oksijen derişimine bağlıdır. Zayıf bir oksidan olan süperoksit radikalinin kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak süperoksit radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir (113). Bu reaksiyonların en önemlilerinden biri Haber-Weiss reaksiyonudur. Bu reaksiyonda O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan HO<sup>·</sup> radikallerini oluşturmaktadırlar.



Üretilen bu OH<sup>·</sup> radikalleri oldukça reaktif olup DNA gibi yapılarla reaksiyonlara girerek önemli hasarlara yol açabilmektedir (114).

O<sub>2</sub><sup>·</sup> radikalleri, hücre içi demir depolarından demiri serbest hale getirir. Serbest hale geçen demir iyonu Haber-Weiss gibi radikal üreten reaksiyonlarda veya diğer serbest radikal aracılıklı hücre hasarında rol oynayabilir. Süperoksit radikalleri çok kısa bir yarı ömre sahip

olup dismutasyon reaksiyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve oksijen üretirler. Dismutasyon reaksiyonu spontan olarak meydana gelmekte ve reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile katalizlenmektedir.

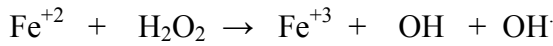


#### 4.1.2. Hidroksil Radikalleri (HO<sup>·</sup>)

Hidroksil radikali (HO<sup>·</sup>), biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldir. Dokular radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorblanır ve radyasyon oksijen-hidrojen arasında kovalent bağa neden olur. Sonuçta şekilde görüldüğü gibi iki radikal meydana gelir. Bu radikallerden biri hidrojen (H<sup>·</sup>) ve diğeri ise hidroksil radikalidir (OH<sup>·</sup>).



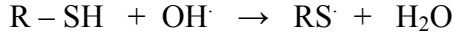
Hidrojen peroksitin (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Fe<sup>+2</sup> veya Cu<sup>+2</sup> ile reaksiyona girmesiyle de OH<sup>·</sup> oluşmaktadır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksisitesinin büyük çoğunluğunun temelinde bu oluşan OH<sup>·</sup> olduğu düşünülmektedir. Bu reaksiyon ilk defa 1894 yılında Fenton tarafından gözlenmiş ve günümüzde de Fenton reaksiyonu olarak bilinmektedir.



OH<sup>·</sup> radikalleri başta lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) olmak üzere hemen hemen bütün hücresel moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler. OH<sup>·</sup> DNA da bulunan deoksiriboz molekülüne etki ederek çeşitli ürünler oluşturduğu ve bu oluşan ürünlerin bazılarının mutajenik oldukları görülmüştür. Yine OH<sup>·</sup> aromatik halkaya katılma özelliği gösterdiklerinden DNA ve RNA'da bulunan pürin ve pirimidin bazlarına katılarak radikal oluşumuna neden olurlar. Örneğin: Timine katılarak timin-radikalini oluşturur ve bu radikal oksijenle reaksiyona girerek son derece reaktif olan timin peroksil-radikaline dönüşmektedir. Bu gibi bir dizi reaksiyona katılabilen OH<sup>·</sup> DNA'nın baz ve şekerlerinde ciddi hasarlar oluşturarak DNA iplik kırılmalarına neden olurlar. Hasar çok kapsamlı olursa

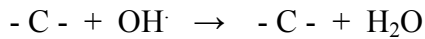
hücrel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir (113,115).

DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşmenin yanısıra tiol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu da koparabilmektedir.

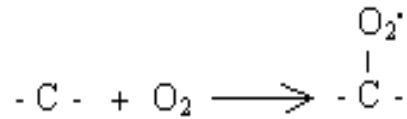


Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O<sub>2</sub> ile kombine olabilir ve oksisülfür radikallerini oluşturur. RSO<sub>2</sub><sup>·</sup> ve RSO<sup>·</sup> gibi bunların bir çoğu da biyolojik moleküllerde hasara neden olurlar.

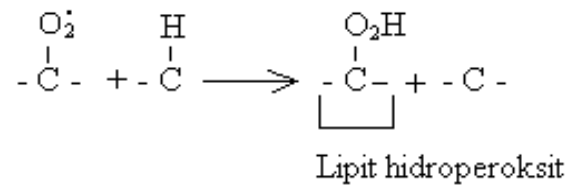
OH<sup>·</sup>'ın sebep olduğu en iyi karakterize edilmiş olan biyolojik hasar lipid peroksidasyon olayıdır. OH<sup>·</sup> membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle araşidonik asit gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinden -C atomunun birinden H atomunun çıkartılması ve su oluşumu şeklinde gerçekleşir.



Bu reaksiyon sonunda membranda -C<sup>·</sup> radikali kalır. Bu -C<sup>·</sup> radikali oksijen ile kombine olarak peroksil radikalini oluşturur.



Peroksil radikaller reaktiftir ve yakınındaki doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerine saldırır;

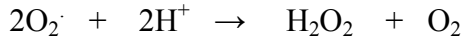


Böylece OH<sup>·</sup>, yüzlerce yağ asitlerinin yan zincirlerini lipit hidroperoksitlere dönüştürür. Membranda lipit hidroperoksitlerinin birikimi membran fonksiyonunu bozar. Peroksil radikaller ve sitotoksik aldehitler, membran proteinlerinde ciddi bir hasara neden olurlar ve membrana bağlı bazı enzimleri ve reseptörleri inaktive ederler (112, 116,117).

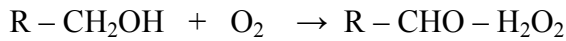
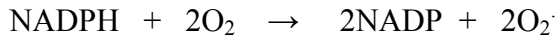
#### 4.1.3. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından aslında bir radikal değildir. Süperoksit anyonunun (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) hidrojenle yaptığı reaksiyona dismutasyon reaksiyonu adı verilir ve dismutasyon hızı asidik pH değerlerinde hızlanır (112,118).

Reaksiyon şu şekilde ifade edilir;

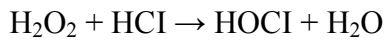


Bazı enzimler ya tekli (NADPH oksidaz) ya da çiftli (Glukoz oksidaz) elektron eklenmesini katalize ederek O<sub>2</sub><sup>·-</sup> veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşmasını sağlarlar.



#### 4.1.4. Hipoklorik Asit (HOCl)

Hipokloröz asit de radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) içinde yer almaktadır. Fagositik hücrelerin bakterileri öldürülmesinde önemli rol oynarlar. Aktive olan nötrofiller, monositler makrofajlar ve eozinofiller süperoksit radikallerini (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) üretirler. Radikal üretimi fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde büyük önem arz etmektedir. Özellikle nötrofiller miyeloperoksidaz enzimleri aracılığıyla önce O<sub>2</sub><sup>·-</sup>'in oluştururlar vedaha sonra dismutasyonuyla hidrojen peroksiti klorür iyonuyla birleştirerek güçlü bir antibakteriyel ajan olan HOCl'i meydana getirirler.



#### 4.1.5. Singlet O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub><sup>↑↓</sup>)

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmadığından serbest radikal değil ancak serbest radikal reaksiyonlarını başlattıklarından serbest radikal sınıfına dahil edilmiştir. Singlet O<sub>2</sub>, oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi



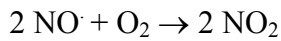
yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalının dismutasyonu ve hidrojen peroksidin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir. Vücutta deri ve retina gibi gün ışığına maruz kalan bölgelerde sıkça oluştuğu tespit edilmiştir.

Serbest oksijen radikallerinin etkisiyle peroksil radikalleri (ROO<sup>·</sup>), alkoksil radikalleri (RO<sup>·</sup>) karbon merkezli radikaller (R<sup>·</sup>) veya tiol radikalleri (RS<sup>·</sup>) oluşur. Bu radikaller oksijenle tekrar reaksiyona girerek yeni serbest radikaller üretirler (119).

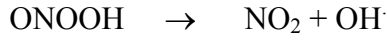
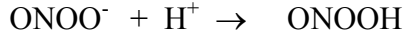
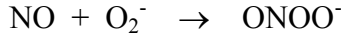
#### 4.2. Reaktif Nitrojen Türleri ( NO, NO<sub>2</sub>, NO<sup>+</sup>, NO<sup>-</sup> )

Lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir (120). Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO, bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür (121,122). Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir (120). NO; bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır (123). Bu lipofilik serbest radikal damar endotel hücrelerinde Nitrik Oksid Sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-arjininden sentezlenir. NOS'ın birçok izoformu tanımlanmıştır. NO'in yarı ömrü 10–20 saniyedir. Kolayca düz kasa geçerek Guanilat Siklaz (GC) enziminin “hem” demirine bağlanır ve cGMP sentezini uyarıp damar gevşemesini uyarır. Sentezlenen NO, aynı zamanda tiyol gruplarını S-nitrozilasyona uğratarak protein ve reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO, Fe-S kümelerine afinite gösterdiği için bu grupları içeren akonitaz enzimine de bağlanır. Bu enzim hücre içi demir trafiğini kontrol eder. NO, akonitaz enzimine mRNA bağlanmasını artırır ve enzimin aktivitesini düşürür.

NO<sup>·</sup> metabolize olurken moleküler oksijen ile bağlanıp nitrojen dioksidi (NO<sub>2</sub>) oluşturur:



NO'in ROS'leri ile reaksiyon vererek güçlü bir oksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturduğu ve bunun da ileri dekompozisyonla OH<sup>·</sup> radikalının oluşumuna yol açtığı ifade edilmektedir:



OH<sup>-</sup> ise biyolojik olarak yıkıcı bir moleküldür. Ayrıca, peroksinitrit de tirozin gibi fenolik amino asitleri nitrolayarak toksik nitro- türevlerini (nitrotirozin) oluşturmaktadır. Sonuç olarak NO, endotel hücre disfonksiyonu ve buna bağlı ateroskleroz, hipertansiyon ve DM gibi bazı önemli hastalıklarda rol oynayabilmektedir.

### **4.3. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları**

Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında oluştuğu gibi çeşitli dış kaynaklı etkilerle de oluşabilir. Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Bunların yanısıra radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırmırlar. Sitokrom P-450, sitokrom b5, ksantin oksidaz, triptofan dioksijenaz, lipooksijenaz, prostoglandin sentetaz, hemoglobin, flavoproteinler, lipid peroksidasyonu, oksidatif stress yapan iskemi, travma ve intoksikasyon gibi durumlar, mitokondrial elektron transport sistemi (ETZ), moleküler otooksidasyon yapan tiol, hidrokinon, katekolamin, flavin ve antibiyotik gibi moleküllerin hepsi hücrenel serbest radikalleri oluştururlar (120,124). Serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

#### **A. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları**

Normal olarak metabolizmada, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Her ne kadar serbest radikal yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri varsa da, bazı metabolik olayların ilerleyebilmesi için bunların oluşması kaçınılmazdır.

##### **1. Mitokondriyal Elektron Transport Sistemi**

Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1–5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçığının olmasıdır. Fizyolojik olarak reaktif oksijen türlerinin temel kaynağı normal oksijen

metabolizmasıdır. Dolayısıyla fizyolojik koşullar altında mitokondriyal elektron transport sistemi serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır (125).

## **2. Endoplazmik Retikulum**

Endoplazmik retikulumda buluna sitokrom P-450 moleküler oksijeni kullanarak birçok substratı oksitler. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturur. Bu reaksiyon monooksijenaz veya karışık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu olarak adlandırılır.

Kimyasal ajanların serbest radikal oluşturmadaki en önemli mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur. Bu sistem, molekülleri indirgeyerek veya oksitleyerek serbest radikal oluşturur. Son durumda bir elektron eksikliği vardır ve elektrofilik bileşik oluşur. Oluşan bu elektrofilik ürün bir nükleofil ile reaksiyona girer. Bu elektrofilik bileşiği çeken en önemli bileşik sistein kalıntıları üzerindeki tiyol (-SH) grubudur. Tiyol grubu ise pek çok endojen makromolekülde (DNA, RNA, enzimler gibi) bulunduğu için reaktif ara ürünler bu moleküllerle kovalent bağlanarak toksisite gösterebilirler (126).

## **3. Redoks Döngüsü**

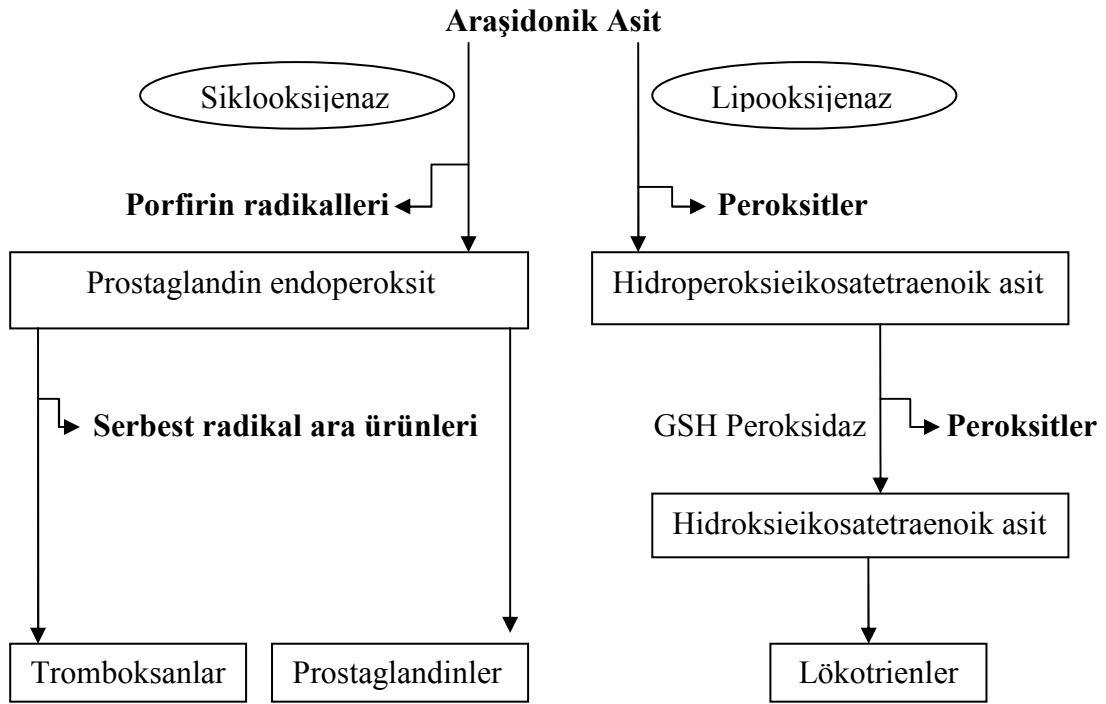
Ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal reaksiyonlarla olmamaktadır. Menadion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin, gibi bileşikler alternatif bir redoks siklusuna girerler. Bu bileşikler, ilave bir çiftlenmemiş elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikaller, tekrar ana bileşiğe dönüşmek için kolayca oksijenle oksitlenir süperoksit radikalini oluştururlar (127)

Oluşan ksenobiyotik ve süperoksit radikalleri intrasellüler ferritin depolarından demiri serbest hale getirirler. Sitozole salınan demir, serbest radikaller arasında en reaktif olan ve dolayısıyla daha yıkıcı olan hidroksil radikali gibi ikincil radikallerin olduğu Fenton reaksiyonunda katalitik rol oynar (113).

## **4. Araşidonik Asit Metabolizması**

Hücre membranlarında prostaglandin için en önemli doymamış yağ asidi prekürsörü araşidonik asittir. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonu, plazma membranlarında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin siklooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu prostaglandinleri, lipooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu ise lökotrienleri verir ve bu tepkimeler sırasında serbest radikaller oluşur (128).

Araşidonik asid oksidasyonu başlatılmış bir serbest radikal reaksiyonudur. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerinin her ikisi de aktiviteleri için peroksitlere ihtiyaç duyarlar. Siklooksijenaz aktivitesi daha sonra prostaglandinlerin sentezi içinde gerekli olan endoperoksitlerin oluşumuyla sonuçlanır. Öte yandan lipooksijenaz lipid peroksitleri üzerinden lökotrienlerin oluşumunu katalize eder (128). Aynı zamanda bazı ksenobiyotiklerden bu esnada reaktif ara ürünler oluşmaktadır. Bu ara ürünler hedef yapılarla etkileşerek toksisite gösterirler.



**Şekil 9.** Araşidonik asit metabolizmasında serbest radikallerin sentezi

## 5. Fagositoz

Radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırmırlar. Aktive fagositler intrasellüler radikal oluşumuna neden olurlar (Tablo-2). Aktive olmuş fagositlerde üretilen serbest radikaller patojenlerle savaşta önemli rol oynar.

**Tablo 3.** Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler

Trombositler	$H_2O_2$ , $O_2^{\cdot-}$ , $OH^{\cdot}$
Nötrofiller	$H_2O_2$ , $O_2^{\cdot-}$ , $OH^{\cdot}$ , $HOCl$
Eozinofiller	$H_2O_2$ , $O_2^{\cdot-}$ , $OH^{\cdot}$ , $HOCl$
Makrofajlar	$H_2O_2$ , $O_2^{\cdot-}$ , $OH^{\cdot}$ , $HOCl$ , $NO^{\cdot}$

Monositler, makrofajlar (kupfer hücreleri, alveolar makrofajlar) gibi fagositik hücreler, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller gibi granülositler, immunojenik veya özel bir uyararla uyarıldıktan sonra lizozomlarını dışarı vermeye başlarlar. Reaktif oksijen oluşumunun yanısıra, mitokondri dışındaki oksijen üretiminde bir patlama (respiratory burst) olur. Fagosit edilmiş, patojenler oksidan ajanlar tarafından öldürülür. Solunum yolu ile patlamanın (respiratory burst) amacı oksidan ajanlar sağlamaktır. Oluşan oksidan ajanlar patojenleri öldürmenin yanısıra myeloperoksidaz sistemine de etki eder. Hidrojen peroksit ve hipoklorit kombinasyonu myeloperoksidaz sistemine etkiyerek de güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterir. Bu radikaller memeli bakteri ve parazitlerine karşı sitotoksik etkiye sahip oksidan ajanlardır. Membran peroksidasyonu, membran proteinlerinin dekarboksilasyonu ve/veya oksidasyonuna yol açıp membran bütünlüğünü bozabilir ve DNA'yı okside ederek parçalayabilir. Fagositik kaynaklı oksidan ajanlar; oto-toksik, immunosupresif ve mutajenik etki oluşturabilirler (128).

### **6. Oto-oksidasyon**

Doku bileşenlerinin çoğu moleküler oksijenin varlığında kimyasal olarak stabil değildirler ve metabolik şartlar altında az yada çok oto-okside olurlar. Kolayca oto-okside olabilen bu bileşenler doku ve hücrelerin son derece önemli komponentleridirler (129,130). Bunlar arasında, hemoglobin, hormonlar, tiyoller, doymamış membran lipitleri sayılabilir.

Bütün oto-oksidasyonlar sırasında serbest radikal intermediyerleri kadar aktive oksijen türleri de üretilir. Böylece oto-oksidasyonlar vücudun radikal kaynaklarına katkıda bulunurlar.

### **7. Oksidan Enzimlerin Reaksiyonları**

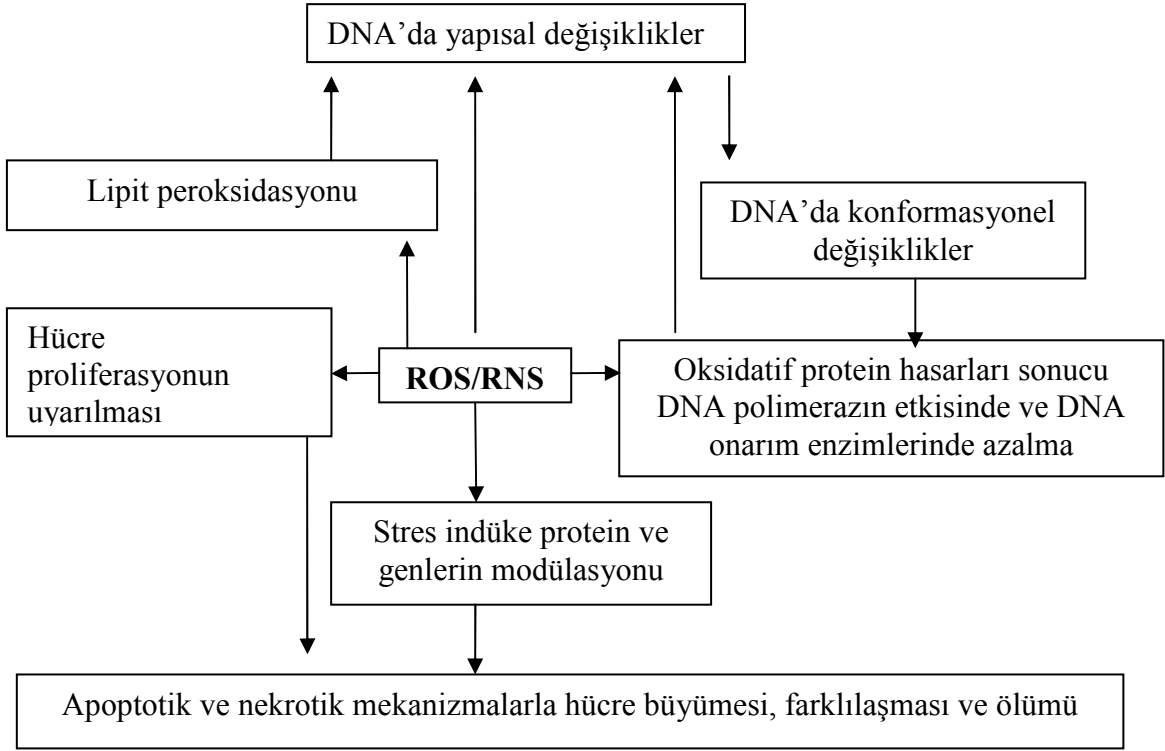
Aerobik organizmalarda oksijenin katıldığı birçok reaksiyonda oksijenin tek değerlikli indirgenmesiyle süperoksid anyonu meydana gelebilir. Glikojen oksidaz, XOD, NADPH oksidaz, NADH oksidaz, diamin oksidaz, urat oksidaz gibi enzimler bunlardan bazılarıdır.

Üzerinde en çok çalışılan ksantin oksidaz (XOD) aslında ksantin dehidrogenaz (XDH) olarak sentezlenmekte ve dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enzim elektronlarını moleküler oksijene değil NAD'ye verir ve süperoksit anyon radikali oluşturmaz. Fakat XOD sülfidril oksidasyonu ya da sınırlı proteolizis ile dehidrogenaz formunda oksidaz formuna dönüşebilir. XOD moleküler oksijeni kullanarak  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$  oluşturmaktadır (131).

### **B. Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları**

- 1-Hava kirliliği: Havadaki azot dioksit ve kükürt dioksit gazları
- 2-Sigara dumanı: Sigara içenlerde veya dumanına maruz kalanlarda düşük dansiteli lipoprotein (LDL)'lerin oksidasyona duyarlılığının arttığı buna mukabil antioksidan kapasitenin azaldığı görülmüştür.
- 3-Kimyasal maddeler: Çözücüler, pestisitler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar, asbest
- 4-Antineoplastik ilaçlar: Nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin
- 5-Glutation tüketen ilaçlar: Asetaminofen, kokain
- 6-Radyasyon: Radyasyon su molekülüne etki ederek hidroksil radikali oluşturmaktadır.
- 7-Stres: Stres sonrası lipid peroksit düzeyleri artar, protein ve DNA hasarı oluşur.
- 8-Alkol: Alkol hepatotoksik etkisi nedeniyle karaciğerde serbest radikal oluşumunu arttırarak lipid peroksidasyonuna neden olur.
- 9-Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA): Yapılarındaki çift bağlardan dolayı kolayca otooksidasyona uğramaktadırlar. Bundan dolayı çoklu doymamış yağ asitlerini fazla tüketen canlılarda lipid peroksidasyonu artmakta ve antioksidan rezervleri azalmaktadır
- 10-Yüksek kalorili diyet: Yüksek kalorili gıdaların biyolojik moleküllerde daha fazla oksidatif hasar oluşturduğu gözlenmiştir.
- 11-Aşırı demir ve bakır alınması: Metal iyonları biyolojik sistemlerde serbest radikal ve metal-oksijen kompleksleri üretmek için süperoksit anyonları ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girmektedir. Sonuçta oksidatif DNA hasarı oluşmaktadır (132).

#### 4.4. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri

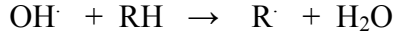
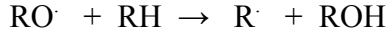
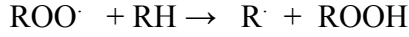
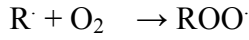


Şekil 10. Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS ve RNS) vücuttaki etkileri

##### 4.4.1. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

Serbest radikallerin en önemli etkisi lipitler üzerine yaptığı etkidir ki bu lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır. Lipit peroksidasyonu doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşmesi sonucu doymamış yağ asidindeki metilen grubundan bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalin süperoksit anyon radikali ile hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Süperoksit anyon radikali hidroksil radikaline dönüşmektedir. Benzer şekilde hidrojen peroksidin de hidroksil radikaline dönüştüğü bilinmektedir. Bu nedenle lipit peroksidasyonunu başlıca hidroksil radikali başlatmaktadır. Hidrojen atomunun koparılmasıyla oluşan serbest yağ asidi radikali moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksit radikalini oluşturur. Oluşan peroksit radikali yüksek reaksiyon yeteneğine sahip olup başka bir yağ asidi molekülü ile yeni bir hidroperoksit ve yeni bir yağ asidi radikali oluşturacak şekilde reaksiyona girer. Oluşan bu yağ asidi radikali yeniden oksijen ile birleşir ve RH'dan yeniden bir hidrojen atomunun ayrılmasını sağlar. Bu

başlayan zincir reaksiyonu oluşan yeni radikallerin etkisiyle devamlı olarak artan bir hızda devam eder.



Bir çok olayda bu şekilde oluşan lipid peroksiti  $RO\cdot$  ve  $OH\cdot$  verecek şekilde parçalanır ve bu oluşan radikaller hemen substrat ile reaksiyona girerek yeni zincir reaksiyonlarını başlatacak olan  $R\cdot$  radikallerini oluştururlar. Böylece oluşan bir radikal sürekli olarak yeni radikallerin oluşmasına neden olur (133-135).

Lipit peroksitleri hücre zarlarının önemli bir komponentidir ve Fe, Cu gibi geçiş metallerinin varlığında alkoksi ve peroksi radikallerini verirler. Bu nedenle Fe veya Cu tuzları lipid peroksidasyonunun hızını arttırlar. Sonuçta hücre zarının akışkanlığını ve permabilitesini azaltarak zar bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Lizozomal membranların tahribi hidrolitik enzimlerin salınmasına ve intrasellüler sindirime neden olur. Biriken hidroperoksitler direkt olarak toksik etki göstermenin yanısıra duyarlı aminoasit kalıntılarını (methionin, histin, stein, lizin) okside eder veya zincir polimerizasyon reaksiyonlarıyla enzimleri inaktive edebilirler (128, 134, 136).

#### 4.4.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit içeriğine göre değişir. Protein molekülleri üzerindeki sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır:

- 1) Amino asitlerin modifikasyonu,
- 2) Proteinlerin fragmantasyonu,
- 3) Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalarıdır (137).

Aromatik aminoasitlerde (fenilalanin, tirozin, triptofan) doymamış yapılar olduğundan oksidatif ataklara çok hassastırlar. Sülfürlü amino asitler olan sistein ve sistin de serbest radikal atağına hassas amino asitlerdir. Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile



reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler (138).

#### **4.4.3. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri**

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diabetes ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar (138).

Enflamatuvar eklem hastalıklarında synovial sıvıya geçen PML'lerden extrasellüler sıvıya salınan  $H_2O_2$  ve  $O_2$  buradaki mukopolisakkarit olan hyalüranoik asidi parçalarlar. Gözün vitröz sıvısında bol miktarda hyalüronik asit bulunur. Bununda oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunur (139).

#### **4.4.4. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri**

Serbest radikallerin, DNA atakları mutasyonlara ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçebileceğinden hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne yol açar. Bu nedenle DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür. ROS ve RNS ile DNA hasarlarının çok az bir kısmı doğal olarak meydana gelmektedir (127).

DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır. Nitrik oksid veya nitrojen dioksit ( $NO_2$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), dinitrojen trioksit ( $N_2O_3$ ) ve nitrik asit ( $HNO_3$ ) gibi reaktif ürünleri, nitrozasyon ve deaminasyon reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler. Farklı ROS farklı yollardan DNA hasarlarına neden olurlar (128,129). Örneğin  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  hiçbir zaman bazlarla reaksiyona girmezken  $OH^-$  DNA'daki dört bazdan herhangi birine bağlanarak farklı reaktif ürünlerin oluşmasına yol açmaktadır (130). Singlet oksijen ise guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur (110,111).

Hidroksil radikali pürin bazları ile C4, C5 ve C8 pozisyonlarından reaksiyona girerek sırasıyla C4-OH-, C5-OH-, ve C8-OH- pürin radikallerini oluşturmaktadır (112). C4-OH- ve C5-OH-pürin radikalleri dehidrasyona uğrayarak okside pürin radikallerini oluştururlar. C8-OH-pürin radikallerinin bir elektronlarının oksidasyonu ve bir elektronlarının redüksiyonu ile sırasıyla 8-hidroksipürinler (7,8-dihidroksi-8-oxo-pürinler) ve formamidopirimidinler oluşur

(111). Şekil-2’de 8-hidroksiguanin (7,8-dihidroksi–8-oxoguanin:8-OH-Gua) ve 2,6-diamino–4-hidroksi–5-formamidopirimidin (FapyGua) oluşum mekanizmaları görülmektedir. Her ikisi de hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda meydana gelebilmektedir. İndirgeyici ajanlar formamido- pirimidinlerin oluşumunu arttırırken 8-OH-pirimidinlerin oluşması için oksijenli ortam uygun görülmektedir. 8-OH-guanin çok yaygın olarak meydana gelen bir baz hasar ürünü olduğundan oksidatif DNA hasarlarının ölçülmesinde hasar indeksi olarak ölçülmektedir. Çoğu zaman 8-hidroksideoksiguanozin (8-OH-dGua) nükleoziti şeklinde ölçülmektedir (113).

Timinin alil radikalının oksidasyonu ile 5-hidroksimetilurasil ve 5-furmilurasil oluşmaktadır. Dehidrasyon ve deaminasyon reaksiyonlarına yalnızca sitozin katılabilmektedir. Böylece sitozin; glikol dehidrasyonla urasil, glikol deaminasyon ile 5-hidroksi urasil (5-OH-Ura), dehidrasyon ve deaminasyon ile de 5-hidroksisitozini (5-OH-Cyt) vermektedir.

Hidroksil radikali fraksiyonunun DNA’daki şeker grubu ile etkileşmesi, beş karbon atomunun herhangi birinden bir H atomunun çıkarılmasıyla olmaktadır (110). Şeker radikalleri birçok farklı reaksiyonla meydana gelmektedir. Oksijensiz sistemlerde C4’ merkezli radikaller parçalanmaya uğrarlar ve DNA zincirleri kırılarak sağlam baz ve değişikliğe uğramış şeker serbest kalır. C1 merkezli radikallerin oksidasyonu ile şeker laktonu oluşumu ve sağlam bazın salınımı gerçekleşir. Oksijen yokluğunda, baz radikalleri kendilerine komşu olan şeker grubundan H atomu alarak şeker radikallerini oluştururlar ve sonuçta zincir kırılmalarına neden olurlar. Oksijenli sistemlerde karbon merkezli şeker radikaline moleküler oksijenin eklenmesi sonucu peroksil radikalleri oluşmaktadır. Şeker peroksil radikallerinin en karakteristik özelliği karbon-karbon bağı kırarak alkali bölge oluşturmalarıdır. C5’ merkezli peroksil radikali oksil radikaline dönüştürülerek parçalanma ile DNA zincirinin kırılmasına, sağlam bazın ve değişmiş şekerin serbest kalmasına yol açmaktadır (114). DNA’daki değişikliğe uğramış şeker grupları DNA zincirinden salınabilir ya da fosfat bağlarıyla DNA’ya bağlı kalabilir.

Baz ve şeker radikallerinin reaksiyonları; değişik modifiye baz ve şekerler, kontrolsüz baz dizilimi, zincir kırılmaları ve DNA-protein çapraz bağlarını meydana getirirler. Oksidatif DNA hasarları da denilen bu tip hasarlar mutagenezise, kanserogeneze ve yaşlanmaya yol açmaktadır (115).

#### **4.5. Antioksidan Savunma Sistemleri**

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta “antioksidan savunma sistemleri veya antioksidanlar” adı verilen birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bütün hücreler, güçlü savunma sistemlerinin varlığı ile oksidatif strese karşı savaşmaktadırlar. Savunma sisteminde öncelikle enzim sistemi ve serbest radikal tutucuları etkili olmaktadır. Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler. Bu hasarlar genel olarak şöyle sıralanabilir;

- 1.Hücre membran bütünlüğünün bozulması
- 2.Membran lipit ve proteinlerinin denatürasyonu
- 3.Nükleik asitlerin (DNA/RNA) mutasyonu
- 4.İmmün sistemin supresyonu

Organizmada oksidan ürünlere karşı savunma üç şekilde gerçekleşmektedir;

- 1.Serbest radikal reaksiyonlarının sonlandırılması
- 2.Serbest radikal reaksiyonlarının sınırlandırılması
- 3.Oluşan serbest radikallerin detoksifikasyonu

Antioksidanların başlıca etki mekanizmaları ise şöyledir;

1.Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler bu tip etki gösterirler.

2.Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif hale dönüştürme işlemidir. A vitamini ve flavanoidler bu tip etki gösterirler.

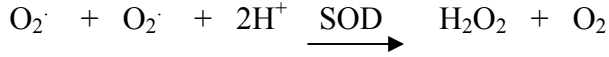
3.Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleme işlemidir. Hemoglobin, seruloplazmin, E vitamini ve mineraller bu tip etki gösterirler.

4.Onarıcı etki: Serbest oksijen radikallerinin yapmış olduğu hasarı tamir etme işlemidir (140).

#### **I. Enzimatik Antioksidanlar**

##### **1. Süperoksit Dismutaz (E.C.1.15.1.1)**

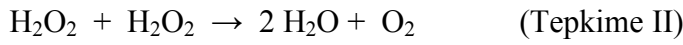
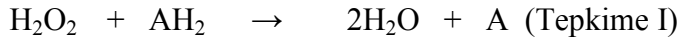
SOD süperoksit anyonunun hidrojen perokside dismutasyonunu katalizler.



SOD, glutatyon peroksidaz ve katalaz oksijen radikalleriyle oluşan hasara karşı başlıca enzimatik savunma mekanizmalarıdır. SOD ile  $O_2^{\cdot -}$  'nin dismutasyonu ile  $H_2O_2$  çıkarılması hücre için biyolojik avantaj sağlar. Hücreden  $H_2O_2$  çıkarılması için SOD; katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile birlikte çalışır (141,142).

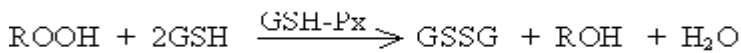
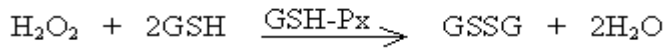
## 2. Katalaz ( E.C. 1.11.1.16 )

Katalaz yapısında hem grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir (143). Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve müköz membranda yüksek miktarda bulunmaktadır.  $H_2O_2$  oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle (tepkime 1) veya  $H_2O_2$  oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkimeyle (tepkime 2) hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır.

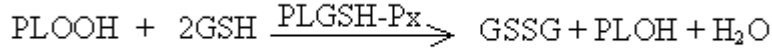
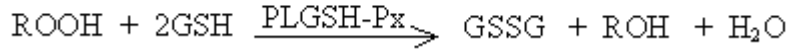


## 3. Glutatyon Peroksidaz ( E.C 1.11.1.9 )

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), hidrojen peroksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Tetramerik ve 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Birbirine kenetli enzim sistemi GSH-Px ve GSH-Rd glutatyon harcayarak  $H_2O_2$  'nin redüksiyonunu katalizler (143).

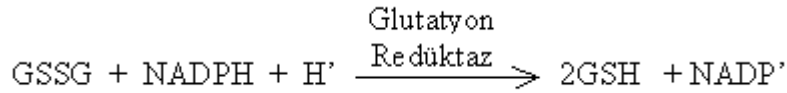


Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) da molekül ağırlığı 20.000 dalton olan, monomerik selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksidlerini, alkollere indirger.



Membrana bağılı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğu zaman PLGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar.

Hidroperoksidlerin redükte olması ile meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyon ile tekrar GSH'a dönüşür.

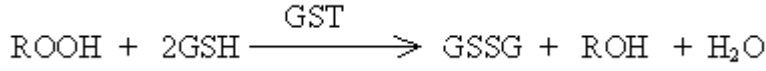


GSH-Px'in, fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller.

Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar.

#### **4. Glutation-S-Transferaz ( E.C.2.5.1.18 )**

Glutation-S-Transferaz (GST)'lar antioksidan aktivitelerine ilave olarak çok önemli başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahiptirler. Son zamanlara kadar GST'lar katalizledikleri reaksiyona göre sınıflandırılmaktaydılar. Daha sonra yapılan çalışmalar bu enzimlerin söz konusu reaksiyonların herhangi birine özgül olmadığını, iç içe geçmiş substrat özgüllüğüne sahip olduğunu ortaya koymuş ve bunlar 'glutatyon-S-transferaz' lar adı altında toplanmıştır. Günümüzde ise türe bağımsız bir sınıflama yapıldığında GST'lar geleneksel olarak üç sitozolik bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılırlar. Başta araşidonik asid ve lineolat hidroperoksidleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı GST'lar Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar.

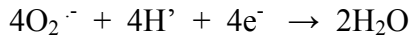


Homodimerik veya heterodimerik enzimler olan GST'lerin, araştırılan tüm canlı türlerinde bulunması bunların hayati öneminin göstergesidir. Bu enzimler katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Hem detoksifikasyon yaparlar hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; yabancı maddeleri glutatyon (GSH)'daki sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize ederler ve ürünün daha fazla suda çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar. Bu yol, GST'lerin kanserojen, mutajen ve diğer zararlı kimyasalların hücre içi detoksifikasyonunda rolleri olduğunu gösterir.

Metabolize edilmeyen lipofilik-hidrofobik pek çok bileşiği bağlamaları ise bu enzimler için depo ve taşıma rolü üstlendiğini gösterir. Birçok pigment (bilirubin, hematin, bromsülfattalein, indosiyanın gren gibi), kolik asitler, steroid hormonlar, polisilik aromatik hidrokarbonlar bu proteinler tarafından bağlanıp taşınabilmektedirler.

## 5. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir.



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak, süperoksit üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar.

## II. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

### 1. C Vitamini (Askorbik Asit)

C vitamini, Suda çözünme özelliği gösterir; ancak lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipitleri oksidasyona karşı korur.

C vitamini, antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller. E vitaminin rejenerasyonunda görev alarak tokoferoksil radikalının  $\alpha$ -tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte LDL oksidasyonunu etkili bir şekilde engellemiş olur.

C vitamini, fagositoz için de gereklidir. Bu vitaminin kemotaktik cevabı artırdığı görülmüş; oksidatif patlama sırasında çevreye yayılan reaktif bakterisidal moleküllerin bakterisidal etkisini sağlayan intrasellüler konsantrasyonlarında bir azalma yapmadan, oksidatif parçalanma ürünlerinin zarar verici etkilerini önlediği gözlemlenmiştir.

C vitamini, organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgen (redükten) olarak görev yapmaktadır. Prokollajenin yapısında yer alan lizin ve prolinin hidroksilasyonundan sorumlu enzim olan protokollajen hidroksilazın yapısında C vitamini kofaktör olarak görev yapar. Bu hidroksilasyon reaksiyonu olmaz ise kollajen fibrilleri arasında çapraz bağlantılar oluşmayacak ve kollajen dokunun bütünlüğü bozulacaktır. Benzer şekilde C vitamini,  $\gamma$ -bütirotobetainin hidroksilasyonu ile karnitin oluşumunda rol oynar. Tirozin metabolizmasında, mikrozomal ilaç metabolizmasında, adrenallerde epinefrin ve antiinflamatuar steroidlerin sentezinde, folik asit metabolizmasında ve lökosit fonksiyonlarında C vitamini etkili olmaktadır. C vitaminin bu işlevleri özellikle  $Fe^{+2}$  enzim sistemleri üzerindeki indirgen etkisine bağlıdır.

Askorbik asit güçlü bir indirgeyicidir. Dehidroaskorbik asit ile bir redoks sistem oluşturur. Standart şartlarda oksidan ve redükten kapasitesi eşittir. Ancak fizyolojik şartlarda bu eşitlik sağlanamadığı için askorbik asit elektron vericisi olarak görev yapar. Bu özelliğinden dolayı biyolojik sistemlerde askorbik asitin en önemli fonksiyonu hidrojen taşıyıcısı olarak rol oynamasıdır. Askorbik asit suda çözünen süperoksit ( $O_2^-$ ), single oksijen ( $O_2^{\uparrow\downarrow}$ ) ve hidroksil radikalleri ( $OH^\cdot$ ) ile direk olarak reaksiyona giren zincir kıran bir antioksidandır.

Askorbik asitin diğer bir özelliği, antioksidan etkisinin yanında pro-oksidan etki de göstermesidir. Askorbik asit metal iyonlarının varlığında pro-oksidan gibi rol oynar. Askorbik asit ferri demiri ( $Fe^{+3}$ ) ferro demire ( $Fe^{+2}$ ) indirgeyen süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) dışındaki tek hücrel ajandır. Bu yolla askorbat, proteine bağlı olan ferri demiri uzaklaştırarak yada doğrudan indirgeyerek fenton reaksiyonunda hidrojen peroksitle ( $H_2O_2$ ) etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani hidroksil radikalleri ( $OH^\cdot$ ) üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı askorbik asit serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir pro-oksidan olarak değerlendirilir. Fakat bu etkisi sadece düşük konsantrasyonlarda

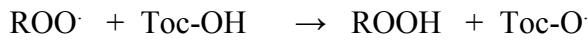
görülmekte olup daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir antioksidan olarak etki göstermektedir (144).

## **2. A Vitamini ( $\beta$ -Karoten)**

$\beta$ -karoten yağda çözünen bir antioksidan olarak serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksiyonuna girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu önler (142,143).

## **3. E Vitamini ( $\alpha$ -Tokoferol)**

$\alpha$ -Tokoferol yağda çözünen ve zincir-kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi serbest oksijen radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki yağ asitlerini korumaktır. Mitokondri, endoplazmik retikulum ve plazma membran fosfolipitlerinin  $\alpha$ -tokoferole karşı çok yüksek affinitesi vardır. Tokoferoller fenolik bir hidrojeni peroksidasyona uğramış bir doymamış yağ asidindeki serbest peroksit radikale aktarırlar (127). Bunun sonucunda serbest radikal zincir reaksiyonları kırılır.



Oluşan serbest  $\alpha$ -tokoferol radikali bundan sonra yeni bir serbest peroksit radikaliyle reaksiyona girer. Böylece  $\alpha$ -tokoferol kolay rezersible oksidasyona uğramaz. Kroman halkası ve yan zincir şeklindeki serbest olmayan radikal ürününe okside olur. Bu oksidasyon ürünü ikinci konumundaki hidroksil grubu üzerinden glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yoluyla atılır (144).

Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. Bundan dolayı en yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipit yapılarında örneğin eritrosit ve solunum sistemi membranlarında etkileri belirgindir (145,146).



#### **4. Polifenoller/Flavanoidler**

Fenoller, aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren etkili antioksidanlardır, çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir, bu nedenle diğer radikallere göre etkin olmayan radikallerdir.

#### **5. Transferin ve Laktoferrin**

Demiri bağlayarak lipid peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır.

#### **6. Seruloplazmin**

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmını akut faz proteini olan seruloplazminden kaynaklanır. Plazmada bakır taşıyan seruloplazmin, demir metabolizmasında da rol oynamaktadır. Seruloplazmin ferro-oksidad aktivitesine sahiptir, ferro demiri ( $Fe^{+2}$ ) ferri demire ( $Fe^{+3}$ ) okside ederek fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu ve bu şekilde demir iyonuna bağlı lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Daha az önemli olmakla birlikte süperoksit radikali ile reaksiyona da girer.

#### **7. Albümin**

Albümin kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Yüksek konsantrasyonlarda (40-60 mg/ml) bulunur. Albumine bağlı bakır, Fenton reaksiyonuna katılabilir fakat albumin yüzeyinde oluşacak olan OH radikali albumin tarafından temizlenir ve radikalın serbest solüsyona kaçmasına izin vermez. Aynı zamanda myeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl'i hızlı bir şekilde temizler.

#### **8. Ürik Asit**

Kuvvetli olarak demir ve bakır bağlar. Pek çok serbest radikali plazmadan temizler. C vitaminin oksidasyonunu engeller.

#### **9. Bilirubin**

Hem katabolizması ile meydana gelen ve albumine bağlı olarak taşınan bir safra pigmentidir. Süperoksit ve hidroksil radikallerini toplama görevine sahiptir.

### **10. Melatonin**

Kan-beyin bariyerini geçebilen lipofilik etkili güçlü bir antioksidandır. Serbest OH radikalini ortadan kaldıran bilinen antioksidanların en güçlüsü olarak kabul edilmektedir. Antioksidan etkisi ile kanserin ilerleme ve gelişme safhalarını geciktirir.

### **11. Glutation (GSH)**

Karaciğerde glutamikasit, sistein ve glisinden sentezlenen, suda çözünen antioksidandır. Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur.

### **12. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)**

HDL kolesterol, süperoksit ve hidroksil radikallerinin üretimini önleyerek koroner kalp hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterir.

### **13. Ferritin**

Demiri depolayan antioksidan etkili bir plazma proteindir.

### **14. Mannitol**

Ortamdaki OH radikalini toplayarak temizleyen antioksidan etkili bir maddedir. Beyin ödeminin tedavisinde sık kullanılır.

### **15. Ubikinon (Koenzim Q)**

Mitokondriyal ETZ'nde elektron taşınmasında görev alan benzokinon türevi bir koenzimdir.

### **16. Allopurinol/Oksipurinol**

Ksantin oksidaz enzimini inhibe edip, doğrudan hidroksil radikali ve hipoklorit radikalini azaltıcı olarak etki eder.

### **17. Sistein/Asetilsistein**

Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.

### **18. Haptoglobin**

Plazmadaki serbest hemoglobini bağlayan bir akut faz reaktanıdır.

### **19. Adenozin**

Adenozin trifosfat (ATP)'ın bileşiminde yer alan bir pürin nükleozitidir.

### **20. Hemopeksin**

Hemoglobin hem ve globine parçalandıktan sonra sadece hem grubunu bağlayan bir proteindir.

### **21. Lipoik asit**

Vitamin benzeri antioksidan etkili bir bileşiktir. Diyabetik nöropatide ve Alzheimer hastalığında beyin fonksiyonlarının korunmasında faydalı olduğu belirtilmektedir.

### **22. Histidin**

Bazik etkili yarı esansiyel bir amino asittir.

### **23. Selenyum**

Antioksidan etkili bir enzim olan glutation peroksidazın yapısında yer alan bir eser elementtir.

### **24. Sitokinler**

Hücreler arası iletişimde rol oynayan, immün sistem hücreleri tarafından salınan, enflamasyon ve immünitinin hemen her fazında etkili olan protein yapısında maddelerdir. Sitokinler, başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler. Ancak proteolitik enzimleri de aktive ettikleri için zararlı da olabilirler.

### **4.6. Total Oksidatif Stres (TOS)**

Oksidatif stres; vücudumuzda mevcut oksidative-antioksidative dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu meydana gelen patolojik durumdur. Oksidatif stresin toplam değeri; total oksidatif stres veya total oksidan status/seviye (TOS) olarak ifade edilir. Bu fenomen, aşırı reaktif oksijen ve/veya nitrojen türlerinin üretimi veya antioksidan tampon mekanizmasının eksikliği sonucu oluşur. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri toksiktir ve

hücrenin lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerine zarar verir. Damar endoteli de bu durumdan kısmen etkilenmektedir.

#### **4.7. Total Antioksidan Status/Seviye (TAS)**

Total antioksidan kapasite (TAK)'yi gösterir. Normal koşullarda organizma, endojen ve eksojen serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Vücutta oluşan oksidan durumların tamponize edilmesinde kan çok önemli bir rol oynamaktadır. Kan, antioksidanların tüm vücuda dağıtılmasını sağlar (147).

TAS/TAK'ye en büyük katkı plazmada bulunan antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi proteinler yanında serbest radikalleri kapan zincir kırıcı antioksidanlar da bulunmaktadır. Albümin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin % 85'inden fazlasını oluşturur. Bu fark kanda bilirubin, indirgenmiş glutation (GSH), flavanoidler, alfa-tokoferol ve beta-karoten gibi antioksidan maddelerin miktarının albümin, ürik asit ve askorbik asit miktarından az olmasından kaynaklanmaktadır. Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir antioksidan etki oluşmaktadır. Bu sinerjik etkiye örnek olarak; glutationun askorbatı, askorbatın da tokoferolü yeniden aktifleştirmesi verilebilir. Total antioksidan seviyesinin ölçümü, antioksidanların tek tek seviyelerinin ölçümünden daha değerli bilgiler verir. Bu yüzden kanın antioksidan düzeyi durumunu saptamada bireysel antioksidanlardan ziyade bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır (148, 149).

#### **4.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)**

Total peroksitlerin, total antioksidanlara bölünmesiyle elde edilen oransal bir indekstir. OSI'nin yüksek olması oksidatif stresin arttığını gösterir (150, 151).

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi (OSI)} = \frac{\text{Total Oksidatif Stres (TOS)}}{\text{Total Antioksidan Status (TAS)}}$$

## 5. MATERİYAL ve METOD

Bu çalışmamızda, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi polikliniğine başvuran bel fıtığı tanısı almış, bel fıtığı haricinde herhangi bir sistemik hastalığı olmayan, alkol, sigara ve ilaç kullanmayan, yaş ortalamaları 30-55 yaş arası olan 35'i erkek, 40'ı kadınlardan oluşan toplam 75 kişi hasta grubu olarak alındı. Ayrıca yaş ortalamaları 30-55 yaş arası olan, herhangi bir sistemik hastalığı olmayan, alkol, sigara ve ilaç kullanmayan 70 kişi kontrol grubu olarak alındı. Klinik olarak tüm hastalar detaylı bir şekilde genel fizik muayeneden geçirildi. Tüm hastalarda bel fıtığı tanısı Manyetik Rezonans görüntüleme yöntemi ile konuldu. Alınan kan örnekleri santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Elde edilen serum örnekleri çalışılincaya kadar -80 °C 'de muhafaza edildi. Çalışma günü serum örnekleri, prolidaz enzim aktivitesi, total antioksidan seviye ve total oksidan seviye durumları değerlendirmek üzere çözdürüldü. Prolidaz enzim aktivitesi için kolorimetrik ölçüm yöntemi olan yeni geliştirilen modifiye (optimize) chinard metodu, total antioksidan seviye ve total oksidan seviye durumlarını ölçmek üzere Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntem kullanıldı.

### 5.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- 1- Santrifüj (Hettich® Universal 30 RF)
- 2- Spektroflorometre (Shimadzu® RF-1501 MODEL, Japon)
- 3- Derin dondurucu (New Brunswick Scientific®, C54285 model)
- 4- Hassas terazi (Sartorius® marka 0,0001 g'a duyarlı)
- 5- Dijital pH-metre (Hanna®, pH 211 model Japon)
- 6- Otomatik biyokimya analizörü (Aeroset®, USA)
- 7- Vorteks ( DCA-VF®-2 )
- 8- Visible spektrofotometre (Jasco® V-530 UV/Vİ3 Spectrofotometre)
- 9- Su banyosu (Nüve® BM 402)

## 5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

**Tablo 4:** Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde Adı	Formülü	Firma ve Katalog no
L-Prolin	$C_5 H_2NO_2$	Sigma <sup>®</sup> P-0380
Glisil-Prolin	$C_7 H_2N_2O_3$	Sigma <sup>®</sup> G-3002
Magnezyum klorür	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Riedel <sup>®</sup> (IV) hidrat
Glasiyel asetik asit	$CH_3COOH$	Merck <sup>®</sup> 541
Ortofosforik asit	$H_3PO_4$	Merck <sup>®</sup> 564
Trizma HCl	$C_4H_{11}NO_3HCl$	Sigma <sup>®</sup> T-3253
Trizma BASE	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma <sup>®</sup> 93349
Ninhidrin	$C_9H_6O_4$	Sigma <sup>®</sup> N4876
Manganklorür (II)hidrat	$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	Merck <sup>®</sup> 5917
Glutasyon	GSH	Merck <sup>®</sup>
Sülfürik asit	$H_2SO_4$	Merck <sup>®</sup>
Sodyum klorür	NaCl	Merck <sup>®</sup>
O-Dianisidine dihydrochloride	$C_{14}H_{16}N_2O_2 \cdot 2HCl$	Sigma <sup>®</sup>
Hidroklorik asit	HCl	Merck <sup>®</sup>
Ferroz amonyum sülfat	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	Merck <sup>®</sup>
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	Merck <sup>®</sup>
Xylenol orange	$C_{31}H_{32}N_2O_{13}S$	Sigma <sup>®</sup>
Glycerol	$CH_2OHCHOHCH_2OH$	Merck <sup>®</sup>

### 5.3. Prolidaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Bu konuda yapılan birçok çalışmada prolidaz enzim aktivitesi ölçümü yöntemi için en sık olarak Chinard tarafından tanımlanan ninhidrin tepkimesi kullanılmıştır (152,153). Bu tepkime daha sonradan Myara ve arkadaşları tarafından bazı değişiklikler yapılarak optimize edilmiştir (154). Bu yöntemde  $MnCl_2$  (Mangan klorür) ile 24 saat ön inkübasyon yapıp aktive edilen enzim, Gly-pro ( Glisil-prolin ) substratı ile ( $K_m=2.9$  mM) 30 dakika inkübe edilip, açığa çıkan prolin miktarı ölçülerek enzim aktivitesi hesaplanmıştır (155).

#### 5.3.1.Serum Prolidaz Aktivitesi Ölçüm Yöntemi (Optimize Chinard Metodu)

Substrat olarak glisil-prolin kullanılarak enzim aracılığı ile oluşan prolinin asidik ortamda ısı etkisiyle ninhidrin ile renkli bir bileşik (pembe renk) oluşturma ilkesine dayanarak serum prolidaz düzeyi ölçülür. Rengin şiddeti prolin konsantrasyonuna bağlıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülür.



Deney 3 basamaktan oluşur:

1. Enzim aktivasyonu için; Numunenin Tris-HCl ve  $MnCl_2$  ile preinkübasyonu
2. Örnek ile glisil - prolinin inkübasyonu
3. Serbestleşen prolinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi

##### 5.3.1.1. Prolidaz Aktivitesi Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar

1. Ön inkübasyon çözeltisi : pH:7'de 50 mmol/L Tris HCl tamponu içerisinde, 1 mmol/L GSH , 50 mmol/L  $MnCl_2$  çözdürüldü.
2. Substrat çözeltisi: Öninkübasyon çözeltisi içerisinde 144 mmol/L glisil-prolin dipeptidi çözdürüldü. Ancak substrat çözeltisi için pH:7.8'lik Tris HCl tampon kullanıldı.
3. Tepkimeyi durdurma çözeltisi : 1 mL glasiyal asetik asit kullanıldı.
4. Ninhidrin çözeltisi (modifiye (optimize) chinard çözeltisi) : 0.5 mol/L'lik ortofosforik asit içerisinde 3 g/dL olacak şekilde ninhidrin manyetik karıştırıcı ve ısı yadımıyla 70 °C'de eritildi.

5. Prolin standardı : 5 mg L-prolin bir miktar deiyonize su içerisinde çözündürülüp son hacmi 100 mL ye tamamlandı.

### İşlem

a-) Yöntemde, 100 µL serum ile 100 µL serum fizyolojik karıştırılıp bu karışımdan 25 µL alınıp, 1 mmol/L GSH ve 50 mmol/L MnCl<sub>2</sub> pH 7 'de 50 mmol/L Tris HCl tampondan oluşan ön inkübasyon solüsyonundan 75 µL alınarak 37 °C' de 30 dakika inkübe edildi.

b-) Karışımın üzerine 144 mmol/L Gly-pro içeren substrat çözeltisinden (pH 7.8) 100 µL eklenerek 37 °C' de 5 dakika inkübe edildi.

c-) Daha sonra inkübasyonsuz (sıfır zaman) tüpleri hazırlandı. İnkübasyonlu tüplere inkübasyonun sonunda 1mL glasiyal asetik asit ilave edilerek reaksiyon durduruldu. İnkübe edilmemiş örnek bulunan sıfır zaman tüplerine de aynı hacimde glasiyal asetik asit ilave edilip reaksiyon durduruldu.

d-) İnkübasyonlu ve inkübasyonsuz (sıfır zaman) tüplerin üzerine 300uL Tris-HCl tamponu (pH:7.8) ve 1 mL Ninhidrin çözeltisi eklendi.

<u>Ayıraçlar</u>	<u>Kör</u>	<u>Standart</u>	<u>İnkübasyonlu</u>	<u>İnkübasyonsuz</u>
- Ön işlemden geçen çözelti	-	-	1.2	1.2
<b>toplam hacmi (mL)</b>				
- Glasiyal asetik asit (mL)	1	1	1	1
- Tris HCL pH 7.8 (µL)	300	300	300	300
- Ninhidrin çözeltisi				
<b>(modifiye(optimize) chinard</b>				
<b>çözeltisi) (mL)</b>	1	1	1	1
- Standart (µL)	-	1	-	-

e-) Yukardaki işlemler uygulandıktan sonra tüplerin ağzı kapatılarak 90 °C' de su banyosunda 20 dakika bekletildi. Daha sonra buzlu su banyosunda soğutulup beklenmeden



515 nm'deki absorbanslar substratın katılmadığı örnek körüne karşı okutuldu. Ölçülen prolin derişimleri standart olarak kullanılan 5 mg/dL'lik L-prolin ile karşılaştırılarak hesaplandı. Prolidaz enzim aktivitesi birimi olarak, enzimin Gly-Prolin substratını parçalayarak prolin oluşturduğu basamaktaki 1 dakikada oluşan umol/L cinsinden prolin olarak tanımlandı. Ninhidrin tepkimesindeki prolinin molar absorbans katsayısı 27.2'dir (156-160).

#### 5.4. Prolidaz Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{Prolidaz aktivite düzeyi} : \frac{(A-B) \times [S] \times \text{Faktör}}{S}$$

A: İnkübasyon tüpü absorbans değeri

B: Sıfır zaman tüpü absorbans değeri (inkübasyonsuz)

[S] : Standart konsantrasyonu (μmol/L)

S: Standart absorbans değeri

Faktör: Dilüsyon değerleri/inkübasyon periyodu

$$\text{Prolidaz aktivite düzeyi} : \frac{(A-B) \times [S] \times \text{Faktör}}{S} : 1 \text{ litrede } 1 \text{ dakikada oluşan } \mu\text{mol prolin miktarı}$$

**Serumda aktivite tanımı** : 1μmol substratı 1 dakikada değişikliğe uğratan enzim miktarı olarak yapılmıştır. Birim U/L olarak tanımlanmıştır.

#### 5.5. Total Antioksidan Seviye veya Kapasite (TAS veya TAK)

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metottur.

#### Total Antioksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar

**Reaktif 1:** 75 mM Clark tamponu (pH:1.8) içerisinde 10 mM o-dianisidine dihydrochloride ve 45 uM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanır.

**Reaktif 2:** Clark tamponu (pH:1.8) içerisinde 7,5 mM Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) çözdürülerek hazırlanır.

240 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır.

### **Prensip**

$Fe^{2+}$ -o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir (161). (mmol Troloks Eqv./L)

## **5.6. Total Oksidan Seviye (TOS)**

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir.

### **Total Oksidan Seviye Ölçümünde Kullanılan Ayıraçlar**

**Reaktif 1:** 140 mM NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM  $H_2SO_4$  çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında glycerol çözülüp daha sonra 250 uM xyleneol orange çözülerek hazırlanır.

**Reaktif 2:** Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-dianisidine dihydrochloride çözdürülüp sonra 5 mM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanır.

560 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılır.

### **Prensip**

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xyleneol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir (162). ( $\mu$ mol  $H_2O_2$  Eqv./L)

### **5.7. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)**

Oksidatif Stres İndeksi (OSI); Total Oksidan Seviye (TOS)'nin Total Antioksidan Seviye (TAS)'ye bölünmesi ile hesaplandı.

$$\text{Oksidatif Stres İndeksi (OSI)} = \frac{\text{Total Oksidatif Stres (TOS)}}{\text{Total Antioksidan Status (TAS)}} \text{ (AU)}$$

### **5.8. Yapılan İstatistiksel Analizler**

Ticari bir program olan SPSS 11.0 kullanılarak gerekli istatistiksel analizler yapıldı.  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edildi. Gruplar arası farkı değerlendirmek için student t-test kullanıldı. Parametreler arası ilişkileri değerlendirmek için ise Pearson korelasyon analizi kullanıldı.

## 6. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet, yaş, ağırlık, uzunluk ve BMI'den oluşan demografik değerleri arasında istatistiki bakımdan anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0,05$ ) (Tablo 5).

**Tablo 5.** Hasta ve kontrol gruplarının demografik ve karakteristik bilgileri

	<i>Kontrol (n=70)</i> <i>Ortalama ± S.D.</i>	<i>Hasta (n=75)</i> <i>Ortalama ± S.D.</i>	<i>p</i>
Cinsiyet (E/K)	32/38	36/39	> 0,05
Yaş (Yıl)	28.94 ± 6.15	27.11 ± 10.13	> 0,05
Ağırlık (Kg)	65,3 ± 9,18	63,5 ± 8,51	> 0,05
Uzunluk (cm)	165 ± 14	163 ± 15	> 0,05
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22,5 ± 6,5	23,8 ± 5,4	> 0,05

Çalışmamızın sonucunda, prolidaz aktivitesinin hasta grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık iki katı kadar arttığı ( $p < 0,001$ ), total oksidan seviyenin hasta grubunda yükseldiği ( $p < 0,001$ ), total antioksidan seviyenin ise hastalarda düştüğü ( $p < 0,01$ ) ve buna bağlı olarak oksidatif stres indeksinin de hasta grubunda yüksek olduğu ( $p < 0,001$ ) görüldü. Sonuçlarımız Tablo 6' da özetlenmiştir.

**Tablo 6.** Hasta ve kontrol gruplarında Prolidaz, Total Antioksidan Seviye, Total Oksidan Seviye değerleri

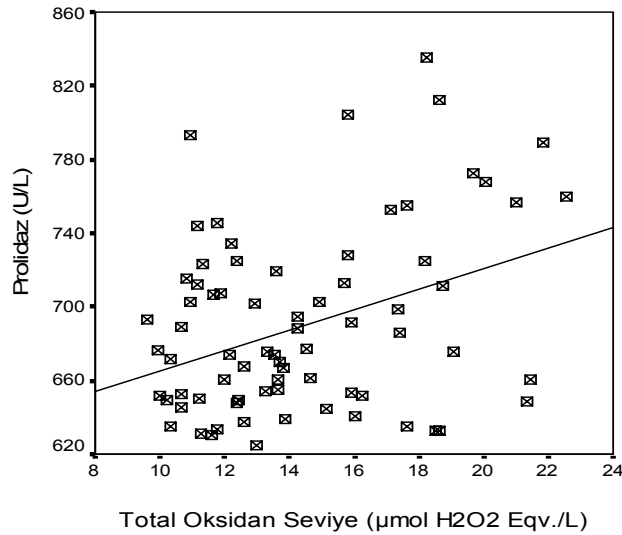
	Kontrol (n= 30)	Hasta (n=75)	<i>P</i> Değeri
Prolidaz (U/L)	315 ± 49	688 ± 51	<0,001
Total Oksidan Seviye (µmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./L)	11,2 ± 1,2	14,3 ± 3,4	<0,001
Total Antioksidan Seviye (mmol Troloks Eqv./L)	1,11 ± 0,15	1,02 ± 0,14	0,01
Oksidatif Stres İndeksi (AU)	10,3 ± 1,5	14,4 ± 4,7	<0,001

Tablo 7’de gösterdiğimiz gibi, yaptığımız korelasyon analizinde, prolidaz aktivitesi ile; total oksidan seviye arasında pozitif bir korelasyon ( $r= 0,373, p <0,001$ ), total antioksidan seviye arasında negatif korelasyon ( $r=-0,384, p <0,001$ ) ve oksidatif stres indeksi arasında ise pozitif korelasyon( $r=0,489, p <0,001$ ) olduğu görüldü.

**Tablo 7.** Hasta ve kontrol gruplarında Prolidaz, Total Antioksidan Seviye, Total Oksidan Seviye arasındaki korelasyon

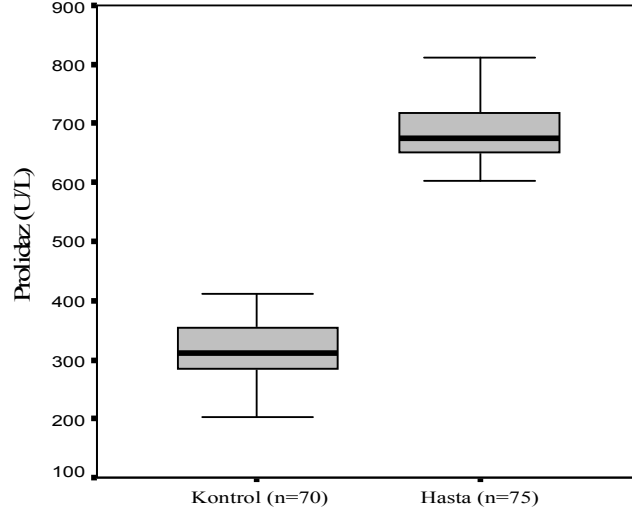
	TOS	TAS	OSİ	
Prolidaz	$r$	0,373	-0,384	0,489
	$p$	0,001	0,001	<0,001
TOS	$r$		-0,275	0,890
	$p$		0,017	<0,001
TAS	$r$			-0,652
	$p$			<0,001

Prolidaz aktivitesi ile total oksidan seviye arasındaki korelasyon dağılım grafiğinde parametreler arasında doğrusal ilişki olduğu görüldü (Şekil 11).



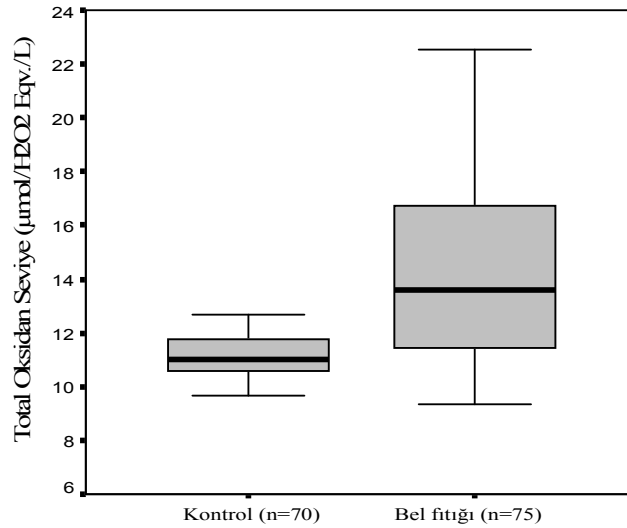
**Şekil 11.** Prolidaz ve Total Oksidan Seviye arasındaki korelasyon

Hasta ve kontrol grupları arasındaki prolidaz aktivitesi için yapılan boxplot grafiğinde hasta grubunda yaklaşık olarak iki katı kadar artış olduğu görüldü (Şekil 12).



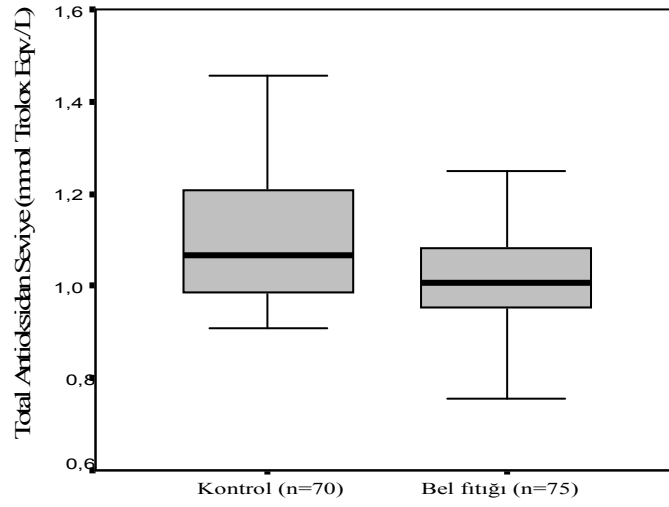
Şekil 12. Hasta ve kontrol grupları arasında serum prolidaz aktivitelerinin karşılaştırılması

Hasta ve kontrol grupları arasındaki total oksidan seviye için yapılan boxplot grafiğinde hasta grubunda kontrol grubuna göre artış olduğu görüldü (Şekil 13).



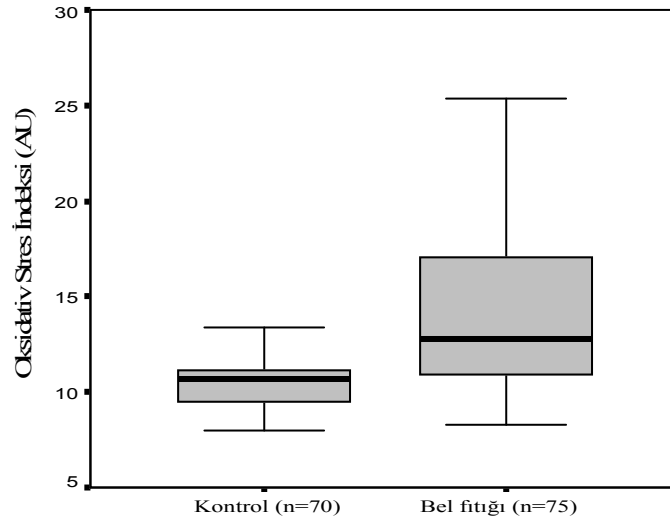
Şekil 13. Hasta ve kontrol grupları arasında Total Oksidan Seviyenin karşılaştırılması

Hasta ve kontrol grupları arasındaki total antioksidan seviye için yapılan boxplot grafiğinde hasta grubunda kontrol grubuna göre bir azalma olduğu görüldü (Şekil 14).



**Şekil 14.** Hasta ve kontrol grupları arasında Total Antioksidan Seviyenin karşılaştırılması

Hasta ve kontrol grupları arasındaki oksidatif stres indeksi için yapılan boxplot grafiğinde hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu görüldü (Şekil 15).



**Şekil 15.** Hasta ve kontrol grupları arasında Oksidatif Stres İndeksinin karşılaştırılması

## 7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bel ağrısı iş gücü kaybına yol açan hastalıkların ilk sıralarında yer alır. Lomber disk hernisi ise bel ağrısının en sık sebebidir. Genç-orta yaş, erkek cinsiyet, ailesel yatkınlık, geçirilmiş travma, sigara içmek ve ayrıca aşırı mekanik zorlama, sedanter yaşam, tekrarlayan vibrasyonel etkilere maruz kalma gibi çevresel faktörler yaygın olarak karşılaşılan risk faktörleridir.

Disk hernisi (fitikleşme); nukleus pulpozusun annulus fibrozusdaki yırtıkların içine ya da bu yırtıklar yoluyla dışarı kaçmasıdır. Bu ya travmatik bir olaydır ya da yapısal ve yaşla ilgili dejenerasyondur. Hareketli ve hareketsiz bölgeler arasındaki geçiş bölgesi hareket esnasında daha fazla strese maruz kalır. Böylece insanlarda alt servikal ve lomber intervertebral disklerde daha sık dejeneratif değişiklikler görülür.

İntervertebral disk ~ 18 yaşına kadar arteryel kanla beslenir. 20 yaşlarının sonu 30 yaşlarının başında diskin vasküler beslenmesi oblitere olur. Bu yaştan sonra çevreden difüzyonla beslenir. Nukleus pulpozusun su içeriği azalır ve diskin doğal elastikiyeti bozulur. Böylece kuvvetleri nonlineer ve asimetrik biçimde iletir. Annulusun zamanla frajil hale gelmesi ve nukleusun su kaybederek fragmanlar halinde parçalanması herniasyonu kolaylaştırır. Bu nedenle lomber intervertebral diskte (IVD) yaşla birlikte artan sıklıkta annulus fibrozus yırtıklarının oluşması ve 35-55 yaş grubunda IVD'e en fazla yüklenmenin olması, bu yaş grubunda yüksek oranda bel fıtığı görülmesini açıklar. Hernekadar dejenerasyon gelişimi disk hernisi oluşumuna direkt neden olmasa da, güçlü bir predispozan faktördür.

Vertebralar arası eklemlenmeyi sağlayan intervertebral disk fibrokartilaj bir dokudur. IVD vertebraların amortisörüdür, omurga kolonuna binen yüklerin emilip dağıtılmasına ve omurganın düzgün olarak hareket etmesine olanak verir, travmaları yayar ve dağıtır. İntervertebral disk, en içte yarı sıvı olan nukleus pulpozus, nukleus'u çevreleyen annulus fibrozus ve annulusla çevrili nukleusu alt ve üstteki vertebra cisimlerinden ayıran iki kıkırdak uç plaktan oluşur. Bütün bağ dokularında olduğu gibi intervertebral diskler de hücreler (çoğunluğunu kondrositler oluşturur), hücre dışı matriks ve sudan oluşur. Annulus hücrelerinin çoğu Tip I ve Tip II kollajen yaparken nukleus hücreleri yalnızca Tip II kollajen sentez eder. Disk dokusu, yapısını ve sağlamlığını sağlayan hücre dışı matriks, su ve makromoleküllerden oluşur. Su, doku yaş ağırlığının en büyük bileşenini oluşturur. Suyun



disk içinde ve disk dışında içeri ve dışarı doğru olan hareketleri hücreler için gerekli olan metabolitlerin taşınmasını ve katabolik ürünlerin disk dışına atılmasını sağlar. Hücre dışı matrikste proteoglikanlar üstün durumdadır. Proteoglikanlar, bir protein çekirdek ve ona bağlanan polisakkarid zincirlerinden oluşur. Volüm değişiklikleri proteoglikanlar ve onları sararak genişlemelerini kontrol eden kollajenlerle dengelenir. Böylece, proteoglikanların oluşturduğu jölemsi yapı içerisinde kolaylıkla kayan kollajen lifler, yüklenme sırasında tensil güçlere karşı direnç gösterir ve şiddetli yüklenmelerde bile dokunun su kaybetmesini önler. Yaşla ve dejenerasyonla birlikte total proteoglikan içeriği azalır. Sonuçta IVD'nin hidrasyon özelliği azalır.

Kollajen, bağ doku iskeletinin temelini sağlar. Kollajenin aminoasid kompozisyonu, %33 glisin, %20-25 prolin ve hidroksiprolin, %5-11 lizin ve hidroksilizinden oluşur. Kollajen sadece pek çok organ ve dokunun değil aynı zamanda ekstrasellüler matriksin de yapısal bir bileşeni olması nedeniyle birçok organ, doku ve hücre patolojisinden de etkilenmektedir. (94).

Prolidaz kollajen yapısındaki prolinin glisil ile yaptığı peptid bağımlı yıkan tek enzim olmasından dolayı prolidaz aktivitesinin kollajen turnover hızı ile direkt olarak ilişkili olmasını bekleriz (88). İyidoğan ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda serum prolidaz aktivitesinin klinik laboratuvarlarda kemik yapım ve yıkımının bir göstergesi olabileceğini tespit etmişlerdir (163). Camhson ve arkadaşları prolidaz eksikliği olan hastalarda immunodipeptidüri olduğunu göstermiştir ve prolidaz eksikliğinde en önemli değişikliğin kollajen yıkımının hızla artması olduğunu saptamışlardır (92). Son yıllarda disk ekstreleri ve disk hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarla proteolitik enzimlerin varlığı ortaya konmuş, dejeneresans ve herniasyon ile ilişkileri irdelenmeye başlanmıştır (4-9). Disk metabolizması ile ilgili proteinazlar arasında kalsiyum ve çinko iyonları ile aktive olan kollajenaz, gelatinaz ve stromelizin gibi matriks metalloproteinazlar (MMP) öne çıkmış durumdadır.(50,51) Metalloproteinazlar zimojen formunda hücre dışı matrikse salınmakta, orada aktive olmakta ve matrikste bulunan kollajen ve proteoglikanları yıkımını sağlamaktadır. Aktive olmuş enzimler diskin kondrositik hücrelerinden salınan doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP), sitokinler (İnterlökin-1) ve büyüme faktörleri gibi spesifik inhibitörlerle kontrol edilir (4,50,51). Omurganın değişik bölgelerine ait dejenere veya herniye olmuş disk dokularında immunohistokimyasal, hücre kültürü veya doku ekstrelerinin biyokimyasal analizi gibi farklı yöntemlerle yapılan çalışmaların hepsinde, kollajenaz ve stromelizin düzeyleri kontrollere göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (50). Disk dejeneresansının, MMP'lar ile bunların

inhibitörleri arasındaki denge bozukluğuna bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu alışmalar ışığında biz de kolajenin metabolik döngüsünde spesifik bir enzim olduğu için önemi büyük olan ve hücre içi protein yıkımının son basamağında, özellikle yüksek miktarda prolin içeren prokollajenin yıkımı aşamasında rol oynayan prolidaz enzim aktivitesinin disk dejeneransı ve hernisindeki rolünü araştırmak istedik. Prolidaz enzim aktivitesinin ölümünde yeni geliştirilen modifiye (optimize) Chinard metodunu kullanarak yapmış olduğumuz çalışmamızın sonucunda, hasta grubunun değerleri ile kontrol grubu değerleri istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda hasta grubunda prolidaz enzim aktivitesini anlamlı olarak yüksek olduğunu gördük ( $P < 0.01$ ). Prolidaz aktivitesi, ekstrasellüler matrixin önemli bir elemanı olan kollajen proteininin metabolizmasını yansıtması bakımından pekçok hastalığın etiyopatogenezi, progresyonu ve klinik seyri ile değişikliğe uğraması çok muhtemel gözükmekte, çalışmamızın sonucu bu ihtimali doğrulamaktadır. Bel fitiğı durumunda da gerek dejenere olan disklerin kendi yapısındaki kollajen proteinlerinin metabolizması gerekse herniasyon nedeniyle ortaya çıkan damarsal basılara bağlı olarak bu yapılardaki ve ekstrasellüler matriksteki kollajen proteinlerinin metabolizmaları turnoverlarının hızlanması sebebi ile önemli lde değişikliğe uğramıştır. Hastalarda tespit ettiğimiz yüksek prolidaz düzeyleri bize kollajen turnover ve dolayısıyla metabolizmasının hızının arttığını gösteren önemli bir biyokimyasal parametredir.

Normal fizyolojik koşullarda organizmada, mitokondriyal elektron transport sistemi (ETS), aktive olmuş fagositler, oksidan enzimlerin reaksiyonları, araşidonik asit metabolizması gibi endojen veya hava kirliliği, sigara dumanı, radyasyon, stres, kimyasal maddeler, antineoplastik ilaçlar, glutathion tüketen ilaçlar ve alkol gibi eksojen nedenlerle serbest radikaller oluşmaktadır. Serbest radikaller yaşam için gereklidir ancak serbest radikal zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse oksidatif stres meydana gelmektedir. Organizma, oluşan bu oksidatif stres ile mücadele eden komplike bir antioksidan defans sistemine sahiptir. Total antioksidan duruma en büyük katkı plazmadaki serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi proteinler ve serbest radikalleri kapan zincir kırıcı antioksidan moleküllerden gelmektedir. Albumin, rik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan durumun % 85'inden fazlasını oluşturur. Bu fark kanda bilirubin, GSH, flavinoidler,  $\alpha$ -tokoferol ve  $\beta$ -karoten gibi antioksidan durumun komponentlerine nazaran albumin, ürik asit ve askorbik asitin seviyelerinin fazla olmasına bağlıdır. Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin

tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece, organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşılık savunma azalır veya bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa bu denge bozulmakta ve serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmaktadır.

Total antioksidan durumun ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir bu yüzden kanın antioksidatif durumunu saptamada bireysel antioksidanlardan ziyade bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır. Çalışmamızda, Erel tarafından son yıllarda geliştirilen ve total -SH, vitamin C, ürik asit, vitamin E, bilirubin ve diğer birçok antioksidanın hassas bir şekilde ölçüldüğü total antioksidan kapasite ve plazmada bulunan hidroksil (OH<sup>•</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singlet oksijen (O<sub>2</sub><sup>↑↓</sup>), lipid hidroperoksit (LOOH), superoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) gibi serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stresi ölçmek için total oksidan kapasite ölçüm yöntemlerini, tam otomatik kolorimetrik yöntemler olması nedeniyle pratik ve güvenilir sonuçlarından dolayı kullanmayı uygun bulduk (161,162). Çalışmamızın sonucunda, hasta ve kontrol grubunun değerlerini istatistiksel olarak karşılaştırdığımızda hasta grubunda kontrol grubuna göre oksidatif stresin anlamlı derecede yüksek ( $p<0.01$ ) olduğunu gördük. Lomber disk hernisi olan hastaların serum total antioksidan seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ( $p=0.01$ ) olduğunu tespit ettik. Oksidatif stresin dengede olup olmadığını saptamak için ise oksidatif stres indeksini hesapladık ve lomber disk hernisi olan hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ( $p<0.01$ ) olduğunu saptadık.

Son yıllarda oksidatif stres ve kollajen metabolizması üzerinde yoğunlaşan bazı çalışmalar, artmış oksidatif stresin kıkırdak dokuda yaşlanmanın hızlanması ve proteoglikanların ve kollajen gibi kıkırdak dokunun esas elamanlarının yıkıma uğraması gibi birtakım dejeneratif değişikliklerin meydana gelmesi şeklinde önemli etkiler ortaya çıkardığını göstermiştir (164). Bizim çalışmamızda da bel fıtığı olan hastalarda oldukça yükselmiş olarak tespit ettiğimiz oksidatif stresin bu hastalarda ortaya çıkan diskopati ve intervertebral disk dejenerasyonunda rol oynadığını ve buna bağlı olarak intervertebral diskin yapıtaşlarından biri olan kollajen yıkımının hızlandığını ve dolayısıyla turnover hızının arttığını söyleyebilmemiz mümkün gözükmektedir. Kollajen yıkımı ve yeniden yapımı (kollajen turnover) döngüsünde önemli bir gösterge olduğu bilinen prolidaz aktivitesinde hasta grubumuzda oldukça yüksek bulunması bu varsayımımızı oldukça güçlendirmektedir.

Birçok çalışmada prolidaz enzim aktivitesi ölçümü yöntemi için en sık olarak Chinard tarafından tanımlanan ninhidrin tepkimesi kullanılmıştır (152,153). Prolidaz enzim aktivitesi ölçümlerinde gözden kaçan, ortamda var olan ve substratın parçalanması ile de açığa çıkan prolin amino asidinin enzimi inhibe etme riskinin varlığıdır. Çünkü prolinin prolidaz enzimini, serumda fizyolojik olarak bulunduğu konsantrasyonlarda güçlü bir şekilde inhibe ettiği kanıtlanmıştır (156).

Ömer Özcan ve arkadaşları hem spektrofotometrik ölçüm yöntemini optimize etmek hem de prolin kaynaklı inhibisyonu azaltmayı amaçlayan bir çalışma yapmışlardır (157). Yaptıkları çalışmada, Myara ve arkadaşlarının tanımlamış oldukları yöntem küçük değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Bu yöntemde, ön inkübasyon basamağı optimize edilmiştir. Mangan belli bir derişime kadar enzim aktivitesini artırdığı (158), bu derişimden sonra enzim aktivitesinin baskılandığı görülmüştür. Hatta literatürde uzun süreli inkübasyonda 100 mmol/L Mangan derişiminde inhibisyon olduğu gösterilmiştir (159). Bu nedenle Mangan enzim üzerinde uzun sürede gelişen yapısal bir değişikliğe neden olabilir. Ayrıca  $MnCl_2$  ile uzun süreli ön inkübasyon hem pratik olarak güç olup hem de  $MnCl_2$ 'nin çökmesine yol açmaktadır. Bu problemi çözmek amacıyla  $MnCl_2$ 'nin bulunduğu Tris tamponunun pH'sı düşürülüp tepkimenin performansı incelendiğinde, pH=7'de  $MnCl_2$ 'nin çökmediği ve tepkimenin performansının etkilenmediği görülmüştür. Bu sayede  $MnCl_2$ 'nin derişimi daha yüksek tutularak inkübasyon zamanının kısaltılabileceği düşünülmüştür. En uygun ortam için 50-100 mmol/L aralığındaki Mangan derişimi ile 30 dakikalık inkübasyonun yeterli olduğu görülmüştür. Hangi  $MnCl_2$  konsantrasyonunun uygun olduğunu anlamak için yapılan tekrarlanabilirlik ve doğrusalılık çalışmasında en iyi analitik doğruluğun 50 mmol/L'lik  $MnCl_2$  derişimi ile sağlandığı görülmüştür.

Klasik yöntemde bulunan prolidaz enzimi aktivitesini sonlandırmak için kullanılan TCA (Triklor asetik asit) ile deproteinizasyon yapılması işlemi, hem dilüsyona hem de ortamda ölçülecek olan prolinlerin de çökmesine yol açtığı için tepkimeyi durdurmak amacıyla ortam pH'ını 1'e getirecek kadar asetik asit konulmuştur. Daha sonra aynı pH'daki Ninhidrin çözeltisi eklenmiştir. 90 derecede 30 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede absorbanslar okutulmuştur. Böylece hem deproteinizasyona bağlı problem ortadan kalkmış hem de yöntem tek bir deney tüpü içerisinde tamamlanmıştır.

Ninhidrin reaksiyonu için optimal pH =1, 2.5 ve 4.7'dir (160). pH 1'e getirildiğinde tepkime şiddetinin çok daha fazla olduğu ve aynı serumdan daha fazla absorbans alındığı tespit edilmiştir.

Prolidaz enziminin substratı olan Glisil-prolin derişiminin enzim aktivitesi üzerine olan etkisini göstermek ve en uygun derişimi tespit etmek amacıyla yapılan deneyler sonucunda substrat derişiminin 144 mmol/L'deki miktarının reaksiyonun substrat miktarından bağımsız hareket edeceği sonucuna varılmıştır.

Enzim tarafından Glisil-prolin substratının parçalanması ile açığa çıkan prolinin inhibitör etkisini anlamak için serum havuzu örneğinde prolidaz enzim aktivitesi 5-30 dakika aralığındaki reaksiyon sürelerine göre ölçülmüş ve süre uzadıkça açığa çıkan prolinin inhibitör etkisi ile aktivitede düşüşe neden olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle Prolidaz üzerine olan inhibitör etkisi iyi bilinen L-prolinin, enzim aktivitesi sonucu analiz ortamına serbestleşmesi ile aktiviteyi azaltması reaksiyon süresinin en aza indirilmesi gerektiğini göstermiştir. Bu çalışmada manuel koşullarda en az 5 dakikaya indirilen tepkime süresi, eğer otomatize bir yöntem geliştirilebilirse daha da kısaltılabilir. Böylece prolinin inhibisyonunu en aza indirmek mümkün olacaktır. Bu nedenlerle biz bu çalışmamızda yeni geliştirilen modifiye (optimize) Chinard metodunu kullanmayı uygun bulduk. Sonuc olarak da prolidaz enzim aktivitesinin bel fitiği olan hastalarda oldukça yükselmiş olduğunu bulduk.

Bu bulgular ışığında disk dejenerasyonu ve hernisinde şiddetli bir oksidatif stresin mevcut olduğunu, ve bunun IVDD'nun hem etiopatogenezinde hem de progresyonunda rol oynadığı, dolayısıyla ciddi birosidatif hasarın ortaya çıktığı, bu hasardan en fazla etkilenen proteinlerden biri olan kollajenin hasarlandığını ve yikiminin artarakturnover'ının hızlanmış olduğunu ve bundan dolayı da disk dejenerasyonu ve hernisinde prolidaz enzim aktivitesinin artmış olduğunu söyleyebiliriz. Prolidaz enzim aktivitesinin sağlıklı erişkinlerde büyük varyasyonlar göstermemesi prolidaz enziminin bel fitiği olan vakalarda kollajen doku hasarının değerlendirilmesi açısından kullanılabilceği ihtimalini göstermektedir. Ancak metodun otomatize olmaması, güvenilir fakat kolay uygulanabilir olmaması rutin bir parametre olarak henüz kullanılabilir değildir. Fakat, bu zorlukların giderilmesi, özellikle de yöntemin tam otomatize edilmesi ile rutinde kullanılabilir hale getirilmesi sayesinde kan prolidaz aktivitesi, kollajen doku hasarı düşünülen hastalıklarda erken tanı ve takibe olanak sağlayacak güvenilir bir bparametredir. Böylece bizim çalışmamıza konu olan disk hernisi ve

dejenerasyon sürecinin daha erken belirlenip kontrol altına alınabilmesi açısından uygulanabilir bir test olarak prolidaz enzim aktivitesinden faydalanılabilinecektir. Ayrıca oksidatif stres belirteçlerini yüksek olarak tespit ettiğimiz bu hastalarda IVD'de oksidatif stres ve hasarın da meydana geldiğini düşündürmektedir. Oksidan maddelerin artması ve bunun yanında antioksidan kapasitenin azalması kollajen doku hasarı oluşturarak dejenerasyon gelişim sürecini hızlandırıp herniasyon oluşumuna ve/veya ilerlemesine katkıda bulunabilir. Bundan dolayı, bu hastalarda antioksidan kapasitenin dışardan verilebilecek antioksidanlarla (vitamin A, C ve E gibi) destekleyici tedavi ile artırılmasının IVDD ve bel fitiği oluşum sürecinin yavaşlamasına ve kliniğin olumlu yönde daha da hafiflemesine neden olabileceği sonucuna varmış olduk.

## 8. KAYNAKLAR

1. Collins Dh: The Patology of articular and spinal disease. Edward Arnold & Co.London ; 256, 1949.
2. Olczyk K: Age-related changes in proteoglycans of prolapsed intervertebral discs. *Annales de Biologie Clinique* 52(10): 711-716, 1994.
3. Urban JPG, Roberts S, Ralphs JR: The nucleus of the intervertebral disc from development to degeneration. *American Zoologist* 40(1): 53-61, 2000.
4. Goupille P, Jayson MIV, Valat JP: Matrix metalloproteinases: The clue to intervertebral disc degeneration? *Spine* 23(14): 1612-1626,1998.
5. Nishida K, Kang JD, Suh JK : Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells- implications fort he treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine* 23(22): 2437-2442, 1998.
6. Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG: Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: An in-vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene. *Spine* 24(23): 2419-2425, 1999.
7. Gruber HE, Hanley EN: Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc- Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine* 23(7): 751-757, 1998.
8. Urban JPG, Roberts S, Ralphs JR: The nucleus of the intervertebral disc from development to degeneration. *American Zoologist* 40(1): 53-61, 2000.
9. Chiba K, Andersson GBJ, Masuda K: Metabolism of the extracellular matrix formed by intervertebral disc cells cultured in alginate. *Sine* 22(24): 2885-2893, 1997.
10. Gruber HE, Fisher EC, Desai B: Human intervertebral disc cells from the annulus: Three-dimensional culture inagarose or arginete and responsiveness to TGF-beta 1. *Experimental Cell Research* 235(1): 13-21, 1997.
11. Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF: Identification of heterogeneous cell-populations in normal human intervertebral dis. *Journal of Anatomy* 186: 43-53, 1995.
12. Poiraudau S, Monterio I, Antract P: Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells- comparison with cartilage cells from the same animals. *Spine* 24(9): 837-884, 1999.
13. Errington RJ, Puustjarvi K, White IRF: Characterisation of cytoplasfilled processe in cells of the intervertebral disc. *Journal of Anatomy*192: 369-378, 1998.
14. Gruber HE, Hanley EN: Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc- comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine* 23(7): 751-757, 1998.
15. Nerlich AG, Boos N, Wiest I: Immunolocalization of major interstitial collagen types in human lomber intervertebral disc of various ages. *Virchows Archiv- An International Journal of Patology* 432(1): 67-76, 1998.
16. Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR: The development of fibrocartilage in the rat intervertebral disc. *Anatomy and Embryology* 192(1): 53-62, 1995.
17. Nerlich AG, Schleider ED, Boos N: Immunohistologic markers for age-related changes of human lomber intervertebral disc. *Spine* 22(24): 2781-2795, 1997.
18. Krajickova J, Polakovar R, Smetana K: Age-dependent changes in proteoglycan biosynthesis in human intervertebral disc. *Folia Biologica* 41(1): 41-51, 1995.
19. Scott JE, Bosworth TR, Cribb AM: The chemical morphology of age-related-changes in humanintervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lomber nucleus pulposus and annulus fibrosus. *Journal of Anatomy* 184: 73-82, 1994.

20. Buckwalter JA, Roughley PJ, Rosenberg LG: Age-related changes in cartilage proteoglycans-quantitative electron microscopic studies. *Microscopy Research and Technique* 28(25): 398-408, 1994.
21. Inkinen RL, Lammi MJ, Lehmonen S: Relative increase of biglycan and decorin and altered chondroitin sulfate epitopes in the degenerating human intervertebral disc. *Journal of Rheumatology* 25(3): 506-514, 1998.
22. Olczyk K: Age-related changes in proteoglycans of human intervertebral disc. *Zeitschrift Für Rheumatologie* 53(1): 19-25, 1994.
23. Zollner J, Sancaktaroğlu T, Meurer A: Determination of hyaluronic acid in the nucleus pulposus during acute and chronically degenerative disc modifications. *Zeitschrift Für Orthopädie und Ihre Grenzgebiete* 137(3): 211-213, 1999.
24. Gtz W, Barnet S, Bertagnoli R: Immunohistochemical localization of the small proteoglycans decorin and biglycan in human intervertebral discs. *Cell and Tissue Research* 298(1): 185-190, 1997.
25. Sztrolovics R, Alini M, Mort JS: Age-related changes in fibromodulin and lumican in human intervertebral discs. *Spine* 24(17): 1765-1771, 1999.
26. Roberts S, Urban JPG, Evans H: Transport properties of the human cartilage in relation to its composition and calcification. *Spine* 21(4): 415-420, 1996.
27. Kuiper J, Verbeck J, Frings-Dressen M: Keratan sulfate as a potential biomarker of loading of the intervertebral disc. *Spine* 23(6): 657-663, 1998.
28. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre Larkin I: Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6 and prostoglandin E2. *Spine* 20(22): 2372-2378, 1995.
29. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre Larkin I: Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6 and prostoglandin E2. *Spine* 21(3): 271-277, 1996.
30. Nagona T, Yonenobu K, Miyamoto S: Distribution of the basic fibroblast growth-factor and its receptor gene-expression in normal and degenerated rat intervertebral discs. *Spine* 20(18): 1972-1978, 1995.
31. Rannou F, Corvol MT, Hudry C: Sensitivity of annulus fibrosus cells to interleukin 1 beta- Comparison with articular chondrocytes. *Spine* 25(1): 17-23, 2000.
32. Gullak F, Ting-Beall HP, Bear Ae: Viscoelastic properties of intervertebral disc cells- Identification of two biomechanically distinct cell populations. *Spine* 24(23): 2475-2483, 1999.
33. Hutton WC, Toribatake Y, Elmer WA: The effect of compressive force applied to the intervertebral disc in vivo- A study of proteoglycans and collagen. *Spine* 23(23): 2524-2537, 1998.
34. Gu WY, Mao XG, Foster RJ: The anisotropic hydraulic permeability of human lumbar annulus fibrosus- Influence of age, degeneration, direction and water content. *Spine* 24(23): 2449-2455, 1999.
35. Handa T, Ishihara H, Ohshima H: Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc. *Spine* 22(10): 1085-1091, 1997.
36. Hutton WC, Elmer WA, Boden SD: The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism. *Spine* 24(15): 1507-1515, 1999.
37. Roof R: A study of the mechanical spinal injuries. *Journal of Bone and Joint Surgery* 42: 810-815, 1960.
38. Smith PP: Experimental biomechanics of intervertebral disc rupture through a vertebral body. *Journal of Neurosurgery* 30: 134-139, 1969.



39. Adams MA, Hutton WC: Prolapsed intervertebral disc. A hyperflexion injury. *Spine* 7: 184-191, 1982.
40. Acaroğlu ER, Iatridis JC, Setton LA: Degeneration and aging affect the tensile behavior of human lumbar annulus fibrosus. *Spine* 20(24): 2690-2701, 1995.
41. Lotz JC, Colliou OK, Chin J: Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: An in vivo Mouse model and finite-element study. *Spine* 23(23): 2493-2506, 1998.
42. Hutton WC, Elmer WA, Boden SD: Analysis of chondroitin sulfate in lumbar intervertebral discs at two different stages of degeneration as assessed by discogram. *Journal of Spinal Disorders* 10(1): 47-54, 1997.
43. Baba H, Maezawa Y, Furusawa N: Herniated cervical intervertebral discs: histological and immunohistochemical characteristics. *European Journal of Histochemistry* 41(4):261-270, 1997.
44. Palmgren T, Gronblad M, Virri J: An immunohistochemical study of nerve structures in the annulus fibrosus of human normal lumbar intervertebral discs. *Spine* 24(20): 2075-2079, 1999.
45. Grignon B, Grignon Y, Mainard D: The structure of the cartilaginous end-plates in elder people. *Surgical and Radiologic Anatomy* 22(1): 13-19, 2000.
46. Moore RJ: The vertebral end-plate: what do we know? *European Spine Journal* 9(2): 92-96, 2000.
47. Riley LH, Banovac K, Maretinez OV: Tissue distribution of antibiotics in the intervertebral disc. *Spine* 19(23): 2619-2625, 1994.
48. Doita M, Kanatana T, Harada T: Immunohistologic study of the ruptured intervertebral disc of the lumbar spine. *Spine* 21(2): 235-241, 1996.
49. Satoh K, Kanno S, Nishiyama K: Presence and distribution of antigen-antibody complexes in the herniated nucleus pulposus. *Spine* 24(19): 1980-1984, 1999.
50. Kanemoto M, Hukuda S, Komiya Y: Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human intervertebral discs. *Spine* 21(1): 1-8, 1993.
51. Matsui Y, Maeda M, Nakagami M: The involvement of matrix metalloproteinases and inflammation in lumbar disc herniation. *Spine* 23(8): 863-868, 1998.
52. Antoniou J, Steffen T, Nelson F: The human lumbar intervertebral disc Evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing and degeneration. *Journal of Clinical Investigation* 98(4): 996-1003, 1996.
53. Olczyk K: Changes in macromolecular components of prolapsed intervertebral discs. *Annales De Biologie Clinique* 52(10): 711-716, 1994.
54. Kawaguchi Y, Osada R, Kanamori M: Association between an aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration. *Spine* 24(23): 2456-2460, 1999.
55. Miller JAA, Schmartz C, Schultz AB: Lumbar disc degeneration: Correlation with age, sex and spine level in 600 autopsy specimens. *Spine* 13: 173-178, 1988.
56. Mitchell PEG, Hendry N, Billewicz WT: The chemical background of intervertebral disc prolapse. *J Bone Joint Surg* 43B: 141-151, 1961.
57. Nachemson A: Lumbar intradiscal pressure. *Acta Orthop Scand Suppl.* 43: 43-44, 1960.
58. Naylor A, Happey F, MacRae T: Changes in the lumbar intervertebral disc with age: a biophysical study. *J Am Geriatr Soc* 3: 964, 1955.
59. Resnick D, Niwayama G: Intervertebral disc herniations: Cartilaginous (Schmorl's) nodes. *Radiology* 126: 57-65, 1978.
60. Osti OL, Vernon-Roberts B, Fraser RD: Annulus tears and intervertebral disc degeneration: an experiment study using an animal model. *Spine* 15: 762-767, 1960.

61. Van Den Hoof, A: Histological age changes in the annulus fibrosis of the human intervertebral disc. *Gerontology* 9: 136-149, 1964.
62. Virgin W: Experimental investigations into physical properties of intervertebral disc. *J Bone Joint Surg* 33B: 607, 1951.
63. Weinstein PR, Ehni G, Wilson CB: *Lumbar Spondylosis: Diagnosis, Management and Surgical Treatment*. Chiago and London: Year Book, 13-87, 1977.
64. Wolfe HJ, Putschar GJ, Vickery AL: Role of the notochord in human intervertebral disc. 1. Fetus and infant. *Clin Orthop* 39: 205-212, 1965.
65. Yasuma t, Koh S, Okamura t, Yamauchi Y: Histological changes in aging lumbar intervertebral disc their role in protrusions and prolapses. *J Bone Joint Surg* 72a: 220-229, 1990.
66. Rowe ML: Lowback pain in industry: a position paper. *Joccup Med* 11: 161-169, 1969.
67. Cunningham LS, Kelsey J, Li: Epidemiology of musculoskeletal impairments and associated disability. *Am J Public health*. 74: 574-579, 1984.
68. Hardy RW: Extradural cauda equina and nerve root compression from benign lesions of the lumbar spine. *Neurological Surgery* 3: 2357-2374, 1996.
69. Nachemson AL. The lumbar spine: an orthopedic challenge. *Spine* 1: 9-71, 1976.
70. Hanley E: Surgical indication and techniques. The international society for the study of the lumbar spine. The lumbar spine 2nd ed. Philadelphia. WB Saunders, 492-524, 1996.
71. Weber H. Lumbar disc herniation. A prospective study of factors including a controlled trial. *J Oslo City Hosp* 28: 33-64,89-120, 1978.
72. Heliovaara M, Knekt P, Aromaa A: Incidence and risk factors of herniated lumbar intervertebral disc or sciatica leading to hospitalization. *Chronic Dic*. 40:251-258, 1987.
73. Bigos S, Bowyer O, Braen G. et al. Acute low back pain problems in adults. Clinical Practice Guideline No.14, AHCPR publication No. 95-0642. Agenc for Health Care Policy and Research. Public Health Care Service, U.S. Department of Helth and Human Services, Rock-ville, M.D,1984.
74. Setti S, Rengachary and Raju S. V. Balabhadra: Black discs disease a commentary. *Neurosurg Focus* 13829: 14,2002.
75. Yasargil MG: Microsurgical operation of herniated lumbar disc. *Adv Neurosurg* 4: 81-82, 1977
76. Camuzoğlu H, Arioz DT, Toy H, Aksoy N: Assesment of preoperative serum prolidase activity in epithelial ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Repord Biol*. 147(1): 97-100,2009.
77. Arioz DT, Camuzcuoğlu H, Toy H, Aksoy N: Serum prolidase activity and oxidative status in patients with stage I endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*.2009 Oct;19(7):1244-7.
78. Demirbag R, Yıldız A, Aksoy N: Serum prolidase activity in patients with hypertension and its relation with left ventricular hypertrophy. *Clinical Biochemistry*. Accepted 29 May 2007
79. Altındağ Ö, Erel Ö, Aksoy N, Selek Ş, Çelik H, Karaoğlanoğlu M: Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. *Rheumatology International*. Published online: (neden koyu)10 November, 2006
80. Aslan M, Nazlıgül Y, Horoz M, Bölükbaş C, Bölükbaş F, Aksoy N, Çelik H, Erel Ö: Serum prolidase activity and oxidative status in helicobacter pylori Infection. *Clinical Biochemistry*. Jan; 40(1-2): 37-40, 2007.
81. Milligan A, Brown G. :Prolidase deficiency: a Case Report and Literature Review. *Brit J. Dermatol*, 121:405 –409, 1989.

- 82.** Dolenga M, Hechtman P: Prolidase deficiency in cultured human fibroblasts: Biochemical Pathology and Iminodipeptid Enhanced Growth. *Pediatr Res.* 32(4): 479-482, 1992.
- 83.** Davis NC, Smith EL: Purification and Some Properties of Prolidase of Swine Kidney, *J. Biol Chem*, 244: 261-275, 1957
- 84.** Boright A, Scriver CR: Prolidase Deficiency: Biochemical Classification of Alleles *Am J Hum Genet* 44: 731-740, 1989
- 85.** Alparslan S, Gültepe M: Serum Prolidase Activity: Its value as an indicator of collagen accumulation in chronic liver diseases. *Biyokimya Dergisi*, 18(1):1-9, 1993
- 86.** Phang JM., Yeh GC., Scriver.: Disorders of proline and hydroxyproline metabolism. In the *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, (7th Ed) Scriver RC., Blandet al., Sly WS., (Eds) Mc Graw Hill, Montreal, 1125-1141; 1995.
- 87.** Scriver CR. : Disorder of proline and hydroxyproline Metabolism. In: the metabolic Basis of Inherited Disease (4th Ed. ) Stanbury, J. B. Et all. 336-361. 1978
- 88.** Mock WL, Zhuang H.: Chemical Modification Locates Guanidinly an Carbokxylate Groups Within The Active site of prolidase *Biochem biophy Res Com.* 180(1): 401-406, 1991.
- 89.** Endo F., Tanoue A.: Primary Structure and Gene Localization of Human Prolidase. *J Biol Chem.* 264: 4476-4481, 1989.
- 90.** Endo F, Tanoue A.: Structural organization of the gene for human prolidase (Peptidase D) and Demonstration of a partial gene deletion in a patient with prolidase deficiency. *J. Biol chem*, 265(19): 11306-11311, 1989.
- 91.** Dannenberg AL, Garrison RJ, Kannel WB. Incidence of hypertension in the Framingham Study. *Am J Public Health*, 78: 676-9; 1988.
- 92.** Cosson C, Myara I.: Only prolidase I activity is present in human plasma. *Int. J Biochem.* 24(3): 427-432, 1992.
- 93.** Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. Optimal conditions for prolidase assay by localization of human prolidase. *J Biol Chem*, 264(8): 4476-4481. 1989.
- 94.** Myara I. Effect of long preincubation on the two forms of human erythrocyte prolidase. *Clin Chim Acta.* Dec; 170(2-3): 263-270, 1987.
- 95.** Cheng TC, DeFrank JJ, Rastogi VK, Alteromonas prolidase for organophosphorus G-agent decontamination. *Chem Biol Interact*; 119-120, 455-62, 1999.
- 96.** Bielawska A., Bielawski K, Chrzanowski K, et al., Prolidase-activated prodrug for cancer chemotherapy cytotoxic activity of proline analogue of chlorambucil in breast cancer MCF-7 cells. *Farmaco*, 55:11-12, 736-41; 2000.
- 97.** Myara I., Cosson C., Moatti N., Lemonnier A.: Human kidney prolidase-purification, preincubation properties and immunological reactivity. *Int. J Biochem.* 26(2): 207-214, 1994.
- 98.** Cosson C, Myara I.: Only prolidase I activity is present in human plasma. *Int. J Biochem.* 24(3): 427-432, 1992.
- 99.** Mock WL., Green PC.: Mechanism and Inhibition of prolidase. *J Biol Chem*, 265 (32): 19606-19610, 1990.
- 100.** Oono T, Arata J. Characteristics of prolidase and prolidase in prolidase deficient patients ith some preliminary studies of their role in skin. *J dermatol.* 15, 212-219. 1998.
- 101.** Radzicka A., Wolfenden R.: Analogues of intermediates in the action of pig kidney prolidase. *Biochemistry.* 30: 4160-4164, 1991.
- 102.** Myara I: Plasma prolidase activity: A possible index of collagen catabolism in chronic liver disease. *Clin Chem.* 30(2): 211-215, 1984.

- 103.** Atara J Umemura S, Yamamoto Y, Hagiyaama M, Nohara N: Prolidase deficiency: Its dermatological manifestations and some additional biochemical studies. *Arch Dermatol* 115: 62,1979.
- 104.** Endo F, Matsuda I: Human eritrosite Prolidase and prolidase deficiency. *Pediatr Res*, 16: 227-231, 1982.
- 105.** Tanoue A, Endo F. A single nucleotide change in the prolidase gene in fibroblast from two patients with polipeptid deficiency. *J, Clin invest* 86: 351-355,1990.
- 106.** Kodama H, Ohhashi T.: Characteristics and partial purification of prolidase and deficiency. Effect of glycyl-proline on the degradation of newly synthesized collagen *clin physiol Biochem.*7:128-136, 1989.
- 107.** Powell GF, Rasco MA, Maniscalco RM: A prolidase deficiency in man with iminopeptidurea. *Metabolism* 23. 505 ,1974.
- 108.** Butterworth J, Priestman DA. Precense in human cells and tissues of two prolidasas and their alteration in prolidase deficiency. *J Inherit Metod Dis* 8: 193,1985.
- 109.** Gürdal F., Genç S., Yalçın Ö., Gültepe M: The presence of prolidase activity in amniotic fluid and its evaluation as a maturity test. *Biol Neonate* 67: 34 ,1995.
- 110.** Meister A. Glutathione ascorbate and cellcycle regulation *FEBBS letters.* 1-4, 1994.
- 111.** Cros CE, Halliwell B, Borish ET. Oxigen radicals and human disease. *J. Annals. Int. Med.* 107: 526-45,1997.
- 112.** Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J. Mayo Clin. Proc.* 63:381,1988.
- 113.** Brent JA, Rumack HH. Role of radicals in toxic hepatic injury. *J. Free Radical Chemistry. J. Clinical Toxicology.* 49: 481-493,1993.
- 114.** Dizdaroğlu M. Mechansms of oxidative DNA damage; lesion and their measurement. *Kluver academic/plenum publishers.* 302: 67-87,1999.
- 115.** Dizdaroğlu M. Chemical Determination of Free Radical-Induced Damage to DNA. *J Free Radical Biology & Medicine.* 61: 225-242,1993.
- 116.** Wetberg AB, Weitzman SA, Clarck EP. Effetes on antioxidants induce: sister chromatid Exchange formation. *J. Clin. Invest.*75: 35-37,1985.
- 117.** Slater TF. Free radical mechanism in tissue injury. *J. Biochem.*222: 1-15,1984.
- 118.** Tappel AL, Dillard JC.: Invivo lipid peroxidation measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *J. Federation proceedings.* 40: 174-178.1981.
- 119.** Gutteridge JMC.: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkes of tissue damage. *J. Clin Chem.*42:18-19,1995.
- 120.** Moncada S, Palmer RMJ, Higs EA: Nitric oxide. Physiology, patophysiology and pharmacology. *J.Pharmacol Rewiev;* 43:109-137,1991.
- 121.** Lancaster J.: Nitric oxide, principles and actions. Copyright by Academic Press.Inc. California/USA.1990.
- 122.** Marletta MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 268: 123-125, 1993.
- 123.** Myatt L, Rosenfield RB, Eis ALW.: Nitrotyrosine residues in placenta: Evidence of peroxinitrite formation and action. *J. Hypertension.* 28: 488-493,1996.
- 124.** Halliwell B.Oxygen is poisonous. The nature and medical importance of oxygen radicals. *J. Med Lab Sci.*41: 157-162,1984.
- 125.** Canbaş A.Gıda Bilimi ve Teknolojisi. Ziraat Fakültesi Yayını No: 78. Ç.Ü.Adana.1983.
- 126.** Sies H, De Groot h. Role of reactive oxigen species in toxicity. *J. Toxicology.* 64: 547-551,1992.

127. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *J. The American Journal of Medicine*. 91: 14-22, 1991.
128. Mead J. Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. *Free radical in molecular biology. J. Aging and disease*. 65: 53-66, 1984.
129. Notarjan D. Oxidants and signal transduction in vessel endothelium. *J. Clin. Med.* 125: 26-37, 1994.
130. Reubset FAG, Veerkamp JH, Tirijbels JMF, Momens LA: Total and peroxisomal oxidation of various saturated and unsaturated fatty acid in rat liver, heart. *J. M. Quadriceps. Lipids*. 24: 11-16, 1992.
131. Arıcıoğlu A: Serbest oksijen radikalleri ve hücre hasarı. 2: 139-242, 1994.
132. Stevenson MA, Pollock SS, Coleman CN, Calderwood SK: X- irradiation, phorbol esters and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulate mitogen activated protein kinase activity in NIH-3T<sub>3</sub> cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *J. Cancer Res*. 54: 12-15, 1994.
133. Ball S, Weindruch R, Walford L: Antioxidants and immun response. *J. Free radicals, Aging and Degenerative Diseases*. 57: 427-456, 1986.
134. Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoid. *J. Nutr.* 119: 109-111, 1989.
135. Niki E. Antioxidants in relation to lipid peroxidation chemistry and physics of lipids. 44: 227-253, 1987.
136. Braugher M, Chose L, Pregenter F: Oxidation of ferric iron during peroxidation of lipid substrates. *J. Biochemica and Biohysica Acta*. 921: 457-464, 1987.
137. Ripine JE, Bast A: Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Respir Crit Care Med*. 156: 341-347, 1997.
138. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, : Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *J. Clin Biochem*. 286: 607-611, 1992.
139. Mccord JM: Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *J. Clin Biochem*. 26. 351-357, 1993.
140. Seven A, İnci F, Civelek S, Burçak G, İnci E, Korkut N: Larenks kanserli olgularda lipid peroksidasyon ve antioksidan statü göstergelerinin dokuda incelenmesi. *Türk ORL arşivi*. 36: 33-6, 1998.
141. Ceballos L, Triver JM, Nicole A: Age correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *J. Clin. Chem*. 36: 66-70, 1992
142. Smith EL, Hill RL, Lehmal R: Principle of biochemistry 7<sup>th</sup> ed- McBraw Hill, inc. USA. 382-383, 1993.
143. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW: Harpers biochemistry. 2<sup>nd</sup> edition. Typo. 1991.
144. Anderson ME, Meister A: Glutathione moesters. *J. Anal. Biochem*. 183: 16-20, 1989.
145. Burton G, Traber M: Antioxidants action of carotenoids. *J. Nutr.* 119: 109-11, 1989.
146. Berger SJ, Gosky D, Zberowska E: Sensitive enzymatic cycling in diabetes. *J. Diabetes* 46: 405-12, 1991.
147. Yao JK, Reddy R, Mc Elhinny LG, et al: Reduced status of plasma total antioxidant capacity in schizophrenia. *Schizophr Res*; 31(1): 1-8. 1998
148. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, et al: Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*; 29(11): 1106-14. 2000
149. Erel O: A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*; 37(2): 112-9. 2004

- 150.** Harma M, Erel O: Oxidative stres in women with preeclapsia. *Am J Obstet Gynecol*; 192(2): 656-57. 2005
- 151.** Harma M, Erel O: Measurement of the total antioxidant response in preeclampsia with a novel automated method. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*; 118(1): 47-51. 2005
- 152.** Chinard P: Photometric determination of proline and ornithine. *J Biol Chem*. 199: 61-65. 1952.
- 153.** Kodama H, Mikasa H: Biocheemical investigations on prolidase and prolinase in erythrocytes from patients with prolidase deficiency. *Clin Chim Acta*, 173:317-324,1988.
- 154.** Myara I, Charpentier C, Lemonnier A. : Optimal contions for prolidase assay by proline colorimetric determination: Application to iminodipeptiduria. *Clin Chim Acta*. 125:193-205, 1982.
- 155.** Ohhshi T, Ohno T, Arata J, Sugahara K, Kodama H. : Characterisation of prolidase I and II from erythrocytes of a control, a patient with prolidase deficiency and her mother. *Clin Chim Acta*. 187(1):1-9, 1990.
- 156.** Mock WL, Green PC. : Mechanism and inhibition of prolidase. *J Biol Chem*. 265 (32): 19606-19610, 1990.
- 157.** Ozcan Ö, Mustafa G, Osman Mİ: Prolidazın mutlak aktivitesini değerlendirmede fotometrik enzim aktivitesi ölçüm metodunun optimizasyonu. *Turkish Journal of Biochemistry*; 32 (1) ;12-16, 2007.
- 158.** Wilce MCJ, Bond CS, Dixon NE, Freeman HC, Guss JM, Lilley PE, Wilce JA. Structure and mechanism of a proline-spesific aminopeptidase from *Escherichia coli*. *Proc Nati Acad Sci USA*. 95: 3472-2477, 1998.
- 159.** Davis NC, Smith EL. Purfication and some properties of prolidase of swine kidney. *J Biol Chem*. 224: 261-275. 1956.
- 160.** Hamilton PB, Ortiz PJ: Proline and hydroxyproline: purification, reaction with ninhydrine and some properties of their N-nitrosoderivatives. *J Biol Chem*. 184 (2): 607-615. 1950.
- 161.** Erel O. : A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radikal reactions. *J. Clinical Biochemistry*: 37: 112-9, 2004
- 162.** Erel O. : A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. Clinical J. Clinical Biochemistry*. 47: 119-29, 2005.
- 163.** İyidoğan YÖ, Gürdöl F, Öner P: Serum prolidaz I aktivitesinin kemik yapım-yıkım indeksi olarak değerlendirilmesi. *İst.Tıp Fak. Mecmuası* 62: 2, 1999.
- 164.** Martin JA, Brown TD, Heiner AD, Buckwalter JA. Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 427 Suppl.:96-103. 2004.